



## Protective Effect of Astaxanthin Against Oxidative Stress-Induced Apoptosis and Inflammatory Increase in C6 Cells Induced by Hydrogen Peroxide

Ziad Joha<sup>1,a,\*</sup>, Ahmet Şevki Taşkıran<sup>2,b</sup>

<sup>1</sup>Departments of Pharmacology, School of Medicine, Cumhuriyet University, Sivas, Türkiye

<sup>2</sup>Departments of Physiology, School of Medicine, Cumhuriyet University, Sivas, Türkiye

\*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 14-08-2023 Accepted : 15-09-2023</p> <p><b>Keywords:</b> Astaxanthin Inflammation Hydrogen Peroxide Oxidative Stress Apoptosis</p>	<p>Recent findings have indicated the potential protective impacts of astaxanthin on the central nervous system (CNS). Nevertheless, the precise influence of astaxanthin on oxidative damage caused by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in glial cells, as well as its interplay with apoptotic and inflammatory mechanisms, remain unclear. As a result, the primary goal of this study was to explore how astaxanthin functions as a safeguard against glial cell damage induced by oxidative stress triggered by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, particularly focusing on its involvement in inflammatory and apoptotic pathways. The study employed C6 glioma cells as the experimental model. Cells in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group were subjected to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) treatment for 24 hours. In the astaxanthin group, cells were treated with varying concentrations of astaxanthin for 24 hours. For the astaxanthin + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group, cells were first pre-treated with different concentrations of astaxanthin for 1 hour and subsequently exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 hours. The XTT assay was utilized to evaluate cell viability. To demonstrate the antioxidative effect, total oxidant status (TOS) and total antioxidant status (TAS) measurements were conducted. TNF-<math>\alpha</math> and IL-1<math>\beta</math> levels were assessed using the ELISA method to measure anti-inflammatory effect. ELISA was also employed to measure the anti-apoptotic effect, involving the measurement of caspase 3, BAX, and Bcl-2 levels. In the group treated with both astaxanthin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, astaxanthin exhibited a notable increase in cell viability within C6 cells. Additionally, it significantly elevated the levels of TAS while decreasing the levels of TOS, indicative of reduced oxidative stress. Furthermore, astaxanthin demonstrated a significant reduction in inflammatory markers, including TNF-<math>\alpha</math> and IL-1<math>\beta</math> levels. Moreover, it led to a substantial decrease in apoptotic markers, specifically cleaved caspase-3 and Bax, while simultaneously increasing the levels of the anti-apoptotic protein Bcl-2. Astaxanthin demonstrates protective properties by engaging anti-inflammatory and anti-apoptotic pathways, countering the oxidative stress induced by hydrogen peroxide in C6 glioma cells. However, a more comprehensive investigation is required to address the potential underlying mechanisms.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 11(9): 1686-1692, 2023

## Hidrojen Peroksit ile İndüklenen C6 Hücrelerinde Oksidatif Stres Kaynaklı Apoptosis ve İnflamatuar Artışına Karşı Astaksantin Koruyucu Etkisi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 14-08-2023 Kabul : 15-09-2023</p> <p><b>Anahtar Kelimeler:</b> Astaksantin Enflamasyon Hidrojen Peroksit Oksidatif Stres Apoptoz</p>	<p>Son çalışmalar, astaksantin merkezi sinir sistemi üzerinde koruyucu etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Ancak, astaksantin hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile indüklenen oksidatif hasar üzerindeki etkileri ve apoptotik ile enflamatuar sistemlerle etkileşimi hala belirsizdir. Bu nedenle, bu çalışma astaksantin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen oksidatif stres sonrası glial hücre hasarı üzerindeki koruyucu etkisini ve bunda enflamatuar ve apoptotik yollarla etkileşimini araştırmayı amaçlamaktadır. Çalışmada C6 glioma hücreleri kullanıldı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubundaki hücreler H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 24 saat boyunca inkübe edildi. Astaksantin grubundaki hücreler farklı konsantrasyonlarda astaksantin ile 24 saat boyunca inkübe edildi. Astaksantin + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubundaki hücreler ise çeşitli konsantrasyonlarda astaksantin ile 1 saat boyunca inkübe edildikten sonra 24 saat boyunca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye maruz bırakıldı. Hücre canlılığı XTT testi kullanılarak değerlendirildi. Antioksidatif etkinin gösterilmesi için total oksidatif stres (TOS) ve total antioksidatif stres (TAS) ölçümleri yapıldı. Antiinflatuar etkinin ölçümü için ELISA yöntemi ile TNF-<math>\alpha</math> ve IL-1<math>\beta</math> ölçümleri yapıldı. Antiapoptotik etkinin ölçümü için ELISA yöntemi ile kaspaz 3, BAX ve Bcl-2 ölçümleri yapıldı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubuna kıyasla astaksantin + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubunda, astaksantin C6 hücrelerinde hücre canlılığını önemli ölçüde artırdı. Aynı zamanda, astaksantin antioksidatif stresin bir göstergesi olan TAS seviyelerini önemli ölçüde artırırken TOS seviyelerini düşürdü. Ayrıca, astaksantin TNF-<math>\alpha</math> ve IL-1<math>\beta</math> gibi enflamasyon faktörlerini önemli ölçüde azalttı. Bunun yanı sıra, astaksantin apoptotik proteinleri olan bölünmüş kaspaz-3 ve Bax seviyelerini önemli ölçüde azaltırken, anti-apoptotik Bcl-2 protein seviyelerini artırdı. Özetlemek gerekirse, astaksantin, oksidatif stres, apoptoz ve enflamasyon belirteçlerini etkili bir şekilde inhibe ederek anlamlı bir koruyucu etki sağlamaktadır. Bununla birlikte, olası temel mekanizmaları ele almak için daha kapsamlı bir araştırma gerekmektedir.</p>

<sup>a</sup> [ziadjoha@cumhuriyet.edu.tr](mailto:ziadjoha@cumhuriyet.edu.tr)

<sup>b</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8520-3760>

<sup>c</sup> [ahmettaskiran@cumhuriyet.edu.tr](mailto:ahmettaskiran@cumhuriyet.edu.tr)

<sup>d</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5810-8415>



## Giriş

Normal hücrel metabolizma sırasında oluşturulan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve diğer reaktif oksijen türleri (ROS), hücrelerin sinyal mekanizması için hayati öneme sahiptir (Fernandez-Fernandez, Almeida ve Bolaños, 2012). Ancak aşırı  $H_2O_2$  sentezi genotoksik etkilere neden olur ve hücrel bileşenlere zarar verir (Gandhi ve Abramov, 2012).

Beyin, hızlı metabolizması ve lipid bileşimi nedeniyle oksidatif zarara en hassas dokudur (Yıldızhan ve ark., 2023). Oksidatif stres, Alzheimer hastalığı (AH) ve Parkinson hastalığı (PH) gibi nörodejeneratif durumların başlıca tetikleyicilerinden biridir (Blesa ve ark., 2015). Merkezi sinir sisteminde (MSS), glial hücreler nöronları desteklerken homeostazı muhafaza ederler (Garden ve Campbell, 2016; Yıldızhan ve Nazıroğlu, 2020). Ancak glial hücrelerden olan mikroglia hücrelerinin aşırı uyarılması oksidatif stres ve nöroinflamasyona yol açarak nörodejenerasyonu tetiklediğinde bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Yıldızhan ve Nazıroğlu, 2020). Bu nedenle glial hücreler, özellikle AH ve PH gibi nörodejeneratif hastalıklar için hayati öneme sahiptir (Verkhatsky ve ark., 2014; Yıldızhan ve Nazıroğlu, 2019) Astrositler olarak bilinen homeostazisi sürdüren hücreler, sinir hücrelerini besleyerek, kan-beyin bariyerini koruyarak, sinaptik aktiviteyi kontrol ederek ve hücre metabolitlerini sindirerek fizyolojik MSS işlevini korumada önemli bir rol oynarlar (Verkhatsky ve Nedergaard, 2018). Astrositler sinir hücreleri ve diğer MSS hücre tipleri tarafından üretilen serbest radikallerin parçalanmasını ve temizlenmesini teşvik ederek MSS'yi oksidatif stres hasarına karşı korur (Cabezas ve ark., 2012). Ancak, bazı patolojik durumlarda, astrositler zararlı ROS'un ana üreticilerinden biri olarak görev yapabilir ve bu ekstra serbest radikaller mikroglia aktivasyonunu doğrudan ya da dolaylı olarak artırabilir (Sofroniew ve Vinters, 2010; Akyuva, Nazıroğlu ve Yıldızhan, 2021).  $H_2O_2$ , ROS gibi, beyin hücrelerinin düzenli metabolik süreçleri tarafından oluşturulur ve önemli iletişim yollarında yer alır. Ancak  $H_2O_2$  aynı zamanda toksikolojik etkilere sahiptir ve ciddi hücrel hasara, bunun başlıca nedeni ise aşırı radikallerin üretimine neden olmasıdır (Sahin ve Ergül, 2022). Astrosit benzeri bir hücre hattı olan C6, oksidatif stres parametreleri de dâhil olmak üzere astroasit fonksiyonunu araştırmada yaygın olarak kullanılır (Doğan ve Yıldızhan, 2021). Ayrıca, C6 hücre hattı  $H_2O_2$  gibi dış uyarıcılara hızla tepki verir, bu da oksidatif stres oluşturabilir (Sahin ve Ergül, 2022).

Astaksantin çeşitli deniz organizmalarında yaygın olarak bulunan kırmızı bir karotenoid pigmentidir ve güçlü bir biyolojik antioksidan olarak işlev görür (Lorenz ve Cysewski, 2000). Astaksantin yüksek biyoyararlanabilirlik ve güvenilirlik sergiler. Astaksantin toksisite veya zararlı etkilerine dair az veri rapor edilmiştir. Klinik bir çalışma, *Helicobacter pylori* tedavisi olarak 4 hafta boyunca yüksek dozda astaksantin (günlük 40 mg) uygulandığında herhangi bir zararlı etkinin görülmediği bildirilmiştir (Kupcinkas ve ark., 2008). Yapılan çalışmalar vücut içinde astaksantin daha dayanıklı bir bileşik haline dönüşerek, serbest radikal zincir reaksiyonlarını sonlandırdığı ve güçlü bir antioksidan olarak işlev gördüğü kanıtlanmıştır (Gao ve ark., 2021). Astaksantin, oksidatif

stresle ilişkili durumlar, kanser, inflamatuvar hastalıklar ve diyabet gibi çeşitli rahatsızlıkları engelleme ve tedavi etme özeliğine sahip olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (Gao ve ark., 2021). Farklı bir çalışmada ise astaksantin, antioksidan, anti-inflamatuvar, antitümör ve immünomodülatuar özellikleri içeren geniş bir biyolojik role sahip olduğu önerilmiştir (Pereira ve ark., 2021). Astaksantin, subaraknoid kanama rat modelinde Nrf2 sinyal yolunu kullanarak beyin hasarını hafifletme yeteneği gösterdiği (Liu ve ark., 2022), farklı bir çalışmada ise astaksantin travmatik beyin hasarı fare modellerinde bilişsel işlevi iyileştirdiği ve beyin ödemi hafiflettiği gösterilmiştir (Ji ve ark., 2017). Literatürde astaksantin hakkında bazı çalışmalar olmasına rağmen, astaksantin C6 glial hücrelerindeki oksidatif hasara yönelik kesin koruma etkileri ve temel mekanizmaları henüz net değildir. Bu nedenle, çalışmamızda astaksantin C6 glial hücrelerinde  $H_2O_2$  ile indüklenen oksidatif hasara karşı koruyucu etkisinin ve bu etkinin, inflamatuvar ve apoptotik yollarla ilişkili olup olmadığı incelendi.

## Materyal ve Yöntem

### Hücre Kültürü

C6 Glioma (CRL107) hücre hatları, American Type Culture Collection'dan temin edilmiş ve %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, ABD) içeren DMEM (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, İngiltere) ortamında kültürlenmiştir. Hücreler, %5  $CO_2$  nemli ortamda  $37^\circ C$ 'de korunmuştur. Astaksantin ve  $H_2O_2$  (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, ABD), DMEM içinde çözülmüş ve tedavi öncesinde stok çözeltileri hazırlanmıştır.

### Hücre Canlılık Testi

Hücre canlılığı, XTT testi kullanılarak değerlendirildi (Roche Diagnostic, MA, USA). C6 Glioma hücreleri, 100  $\mu L$  DMEM içinde kuyucuk başına  $1 \times 10^4$  hücre yoğunluğunda 96 kuyucuklu plakalara ekildi ve astaksantin uygulanmadan önce gece boyunca büyütüldü. Ertesi gün, nörokoruyucu etkisini değerlendirmek için dört hücre grubu hazırlandı. Kontrol grubu herhangi bir ilaç uygulanmadı.  $H_2O_2$  grubundaki hücreler 0,5 mM  $H_2O_2$  ile 24 saat boyunca tedavi edildi (Taşkıran ve Ergül, 2021). Astaksantin grubuna çeşitli konsantrasyonlarda (10, 20, 40, 80, 160  $\mu M$ ) (Karimian ve ark., 2022) astaksantin uygulanırken astaksantin+ $H_2O_2$  grubundaki hücelere 1 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda astaksantin uygulanıp ardından 0,5 mM  $H_2O_2$ 'ye maruz bırakılarak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, medyumlar alındı ve kuyucuklar fosfat tamponlu tuz çözeltisi ile iki kez yıkandı. Son adımda, tüm kuyucuklara fenol kırmızısı olmayan 100  $\mu L$  DMEM ve 50  $\mu L$  50  $\mu L$  XTT karışımı eklendi, ardından plakalar  $37^\circ C$ 'de 4 saat boyunca tutuldu. Plakalar çalkalandı ve absorbanslar, 450 nm'de bir ELISA mikropilaka okuyucusu (Thermo Fisher Scientific, Altrincham, UK) kullanılarak kaydedildi. Tüm deneyler üç kez gerçekleştirildi ve hücre canlılığı, işlenmemiş hücreler olarak kontrole kıyasla canlı hücre miktarı yüzdesi olarak ölçüldü (Sahin ve Ergül, 2022; Ataseven ve ark., 2023).

### Hücre Homojenatlarının Hazırlanması

Her gruptaki hücreler steril tüplere alındı ve ardından 2000 rpm'de yaklaşık 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantların çıkarılmasından sonra hücre pelletleri, yaklaşık 1 milyon/ml hücre yoğunluğu olacak şekilde PBS (pH 7,4) içerisinde süspanse edildi. İç bileşenleri dışarı çıkarmak için tekrarlanan don çöz işlemi uygulanmıştır. 4°C' sıcaklıkta 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Daha sonra biyokimyasal analiz için süpernatantlar elde edildi. Örneklerdeki toplam protein seviyelerinin belirlenmesi için Bradford protein analiz kiti (Merck Millipore, Darmstadt, Almanya) kullanıldı.

### TAS ve TOS ölçümü

Hücre süpernatantlarındaki TAS konsantrasyonları, daha önce Erel tarafından geliştirilen otomatik bir analiz yöntemi (Rel Assay Kit Diagnostics, Antep, Turkey) ile belirlendi. Bu yöntem, serbest radikallerin reaksiyon hızını, Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikallerinin üretimi ile başlayan serbest radikal reaksiyonlarında oluşan renkli dianisidil radikallerin absorbansını ölçerek izlemeye dayanır. Doku örneklerindeki antioksidanlar, konsantrasyonlarına orantılı olarak renk oluşumunu baskırlar. Sonuçlar, doku protein başına mikromol Trolox eşdeğerinde ifade edildi ( $\mu\text{mol Trolox Eq/mg protein}$ ) (Erel, 2004). Hücre süpernatantlarındaki TOS konsantrasyonları, daha önce Erel tarafından geliştirilen otomatik bir analiz yöntemi (Rel Assay Kit Diagnostics, Antep, Turkey) ile belirlendi. Yeterli miktarda oksidan mevcut olduğunda ferroz iyonu ferrik iyonuna oksitlenir. Bu yöntem dokudaki ferrik iyonlarının xylenol orange kullanımıyla ölçülerek TOS seviyelerinin belirlenmesine olanak sağlar. Kalibrasyon için  $\text{H}_2\text{O}_2$  kullanıldı. Analiz sonuçları, doku protein başına mikromol  $\text{H}_2\text{O}_2$  eşdeğerinde ifade edildi ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/mg protein}$ ) (Erel, 2005).

### TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Bölünmüş kaspaz 3, Bax ve Bcl-2 Seviyelerinin Ölçümü

Her gruptaki hücre süpernatantlarında, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , kesilmiş kaspaz 3, Bax ve Bcl-2 seviyeleri ELISA ticari

kitleri (YL Biont, Şanghay, Çin) kullanılarak ölçüldü. İşlem protokolleri üreticinin talimatlarına göre yapıldı.

### İstatistiksel analiz

Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak ifade edildi. Veri analizleri SPSS İstatistik Programı v.22 kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Deneysel gruplar arasındaki farkları belirlemek için posthoc Tukey testi kullanıldı ve  $P<0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### Bulgular

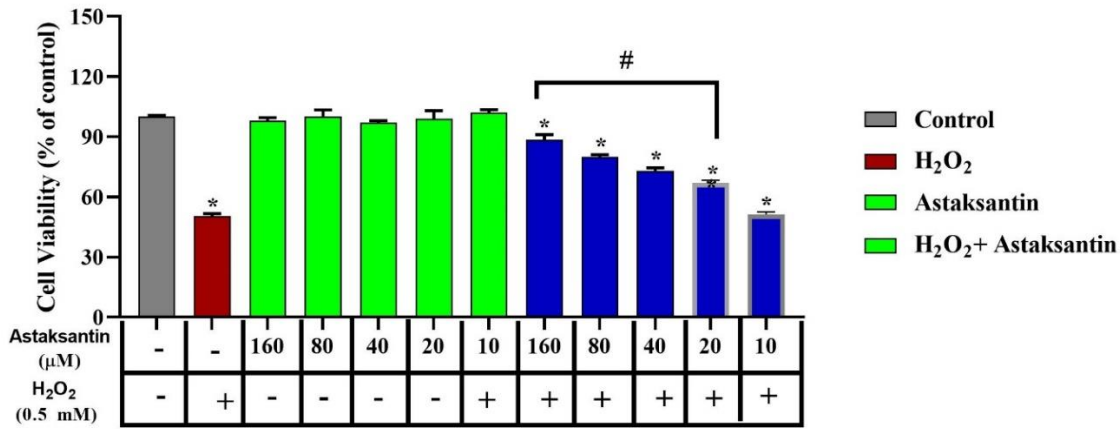
#### $\text{H}_2\text{O}_2$ Kaynaklı Oksidatif Stres Sonrası C6 hücre canlılığı üzerine astaksantin etkisi

Bu çalışmada, astaksantin C6 hücrelerinde  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile indüklenen oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerini değerlendirmek için XTT hücre canlılık testi yapıldı. Astaksantin artan dozlarının (10-160  $\mu\text{M}$ ) hem kontrol grubu hem de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile tedavi edilen grubundaki hücre canlılığına etkisi test edildi. C6 hücrelerinin 24 saat boyunca  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile inkübasyonu, kontrol hücrelerine kıyasla hücre canlılığını önemli ölçüde azalttı ( $P<0,001$ ; Şekil 1).

Ancak, 20, 40, 80 ve 160  $\mu\text{M}$  astaksantin,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile tedavi edilen C6 hücrelerinde hücre canlılığını artırdı ( $P<0,001$ ; Şekil 1). Ayrıca, astaksantin tek başına herhangi bir konsantrasyonda kontrol grubuna göre, hücre canlılığını etkilemediği görüldü ( $P>0,05$ ; Şekil 1).

#### Astaksantin $\text{H}_2\text{O}_2$ ile indüklenen oksidatif hasar sonrası TAS ve TOS seviyeleri üzerine etkisi

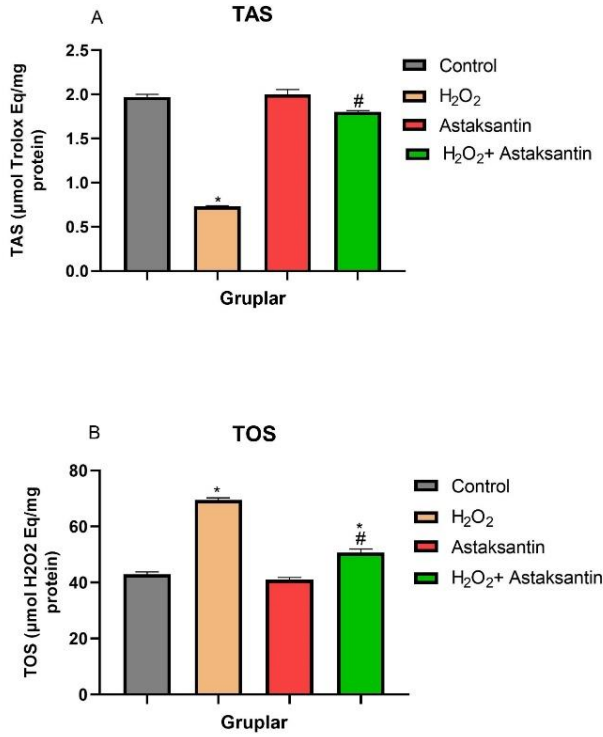
Hücreler, 40  $\mu\text{M}$  astaksantin ile 1 saat boyunca inkübe edildikten sonra 0,5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile veya  $\text{H}_2\text{O}_2$  olmadan 24 saat boyunca inkübe edildi. Kontrol grubuna kıyasla, C6 hücrelerinin 24 saat boyunca  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile inkübasyonu TAS seviyelerini önemli ölçüde azalttı ( $P<0,001$ ; Şekil 2A). Öte yandan, 40  $\mu\text{M}$  astaksantin,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile tedavi edilen hücrelere kıyasla C6 hücrelerinde TAS seviyelerini anlamlı bir şekilde yükseldi ( $P<0,001$ ; Şekil 2A). C6 hücrelerinin 24 saat boyunca  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile inkübasyonu, TOS seviyelerini kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde yükseltti ( $P<0,001$ ; Şekil 2B).



Şekil 1:  $\text{H}_2\text{O}_2$  ile C6 hücre hattında indüklenen sitotoksiste üzerine astaksantin etkisi.

Veriler ortalama  $\pm$  SEM olarak ifade edilmiştir. \* $P<0,01$ , kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; # $P<0,01$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  grubu karşılaştırıldığında.

Figure 1. Effect of astaxanthin on cytotoxicity induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  in C6 cell line. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P<0.01$ , compared to the control group; # $P<0.01$ , compared to  $\text{H}_2\text{O}_2$  group.



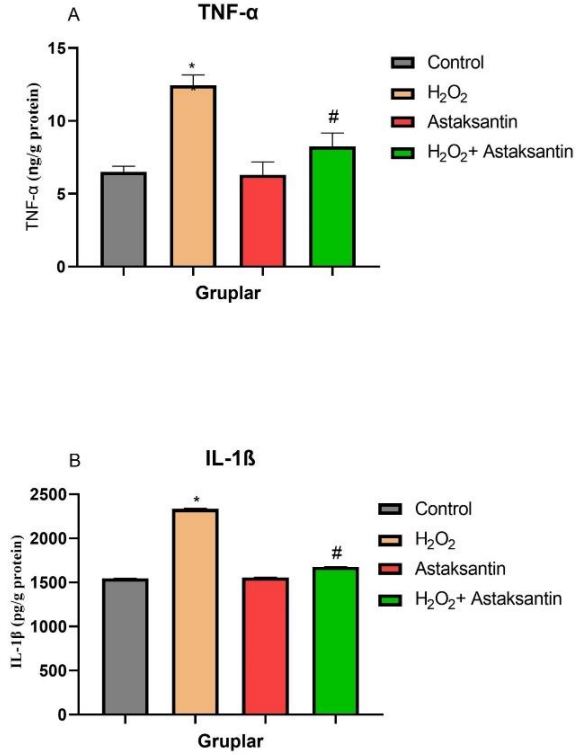
Şekil 2: Astaksantin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen oksidatif hasar sonrası TAS ve TOS seviyeleri üzerine etkisi. Veriler ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. \*P<0,05, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; #P<0,05, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu karşılaştırıldığında.

Figure 2. Effect of astaxanthin on TAS and TOS levels after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage. Data are expressed as mean ± SEM. \*P<0.05, compared to the control group; #P<0.05, compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group.

Öte yandan, 40 µM astaksantin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile tedavi edilen hücrelere kıyasla TOS seviyelerini anlamlı bir şekilde düşürdü (P<0,001; Şekil 2B). Bununla birlikte, 40 µM astaksantin tek başına, C6 hücrelerinde TAS ve TOS seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişikliğe neden olmadı (P>0,05; Şekil 2A ve B).

#### Astaksantin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen oksidatif hasar sonrası TNF-α ve IL-1β seviyeleri üzerine etkisi

ELISA ölçümleri, C6 hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen oksidatif hasar sonrası astaksantin enflamatuar belirteçler seviyeleri üzerine etkilerini değerlendirmek için gerçekleştirildi. Hücreler, 40 µM astaksantin ile 1 saat boyunca inkübe edildikten sonra 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile veya H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> olmadan 24 saat boyunca inkübe edildi. C6 hücrelerinin 24 saat boyunca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübasyonu, TNF-α ve IL-1β seviyelerini kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde yükseltti (P<0,001; Şekil 3A ve B). Öte yandan, 40 µM astaksantin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile tedavi edilen hücrelere kıyasla NF-α ve IL-1β seviyelerini anlamlı bir şekilde düşürdü (P<0,001; Şekil 3A ve B). Bununla birlikte, 40 µM astaksantin tek başına, C6 hücrelerinde NF-α ve IL-1β seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişikliğe neden olmadı (P>0,05; Şekil 3A ve B).



Şekil 3: Astaksantin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen oksidatif hasar sonrası TNF-α ve IL-1β seviyeleri üzerine etkisi. Veriler ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. \*P<0,05, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; #P<0,05, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubu karşılaştırıldığında.

Figure 3. Effect of astaxanthin on TNF-α and IL-1β levels after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage. Data are expressed as mean ± SEM. \*P<0.05, compared to the control group; #P<0.05, compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group.

#### Astaksantin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen oksidatif hasar sonrası Bölünmüş kaspaz 3, Bax ve Bcl-2 seviyeleri üzerine etkisi

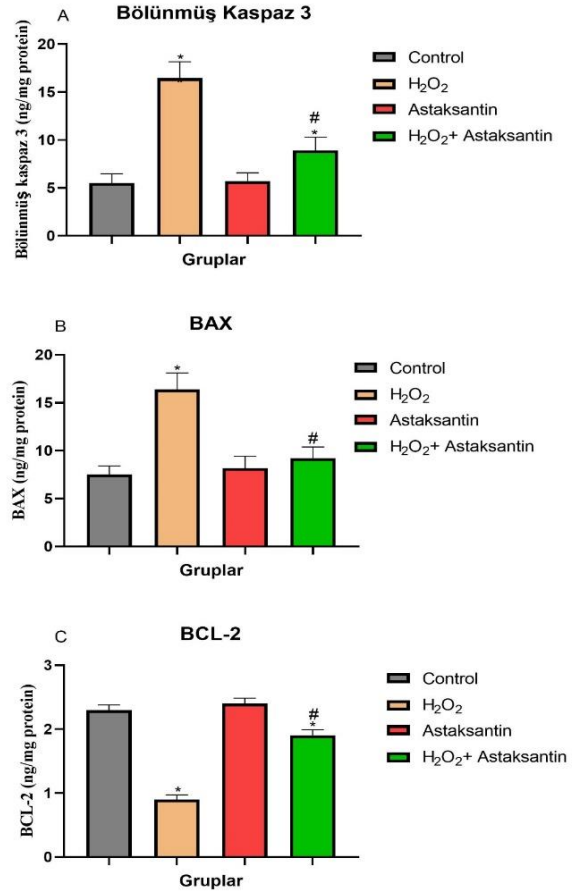
ELISA ölçümleri, C6 hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen oksidatif hasar sonrası astaksantin apoptoz belirteçleri seviyeleri üzerine etkilerini değerlendirmek için gerçekleştirildi. Hücreler, 40 µM astaksantin ile 1 saat boyunca inkübe edildikten sonra 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile veya H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> olmadan 24 saat boyunca inkübe edildi. C6 hücrelerinin 24 saat boyunca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübasyonu, bölünmüş kaspaz 3 ve Bax seviyelerini kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde yükseltti (P<0,001; Şekil 4A ve B). Öte yandan, 40 µM astaksantin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile tedavi edilen hücrelere kıyasla bölünmüş kaspaz 3 ve Bax seviyelerini anlamlı bir şekilde düşürdü (P<0,001; Şekil 4A ve B). Buna ek olarak, C6 hücrelerinin 24 saat boyunca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübasyonu kontrol grubuna kıyasla Bcl-2 seviyelerini önemli ölçüde azalttı (P<0,001; Şekil 4C). Öte yandan, 40 µM astaksantin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile tedavi edilen hücrelere kıyasla C6 hücrelerinde Bcl-2 seviyelerini anlamlı düzeyde yükseltti (P<0,001; Şekil 4C). Bununla birlikte, 40 µM astaksantin tek başına, C6 hücrelerinde kaspaz 3, Bax ve Bcl-2 seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişikliğe neden olmadı, (P>0,05; Şekil 4A, B ve C).

## Tartışma

Bu çalışma kapsamında, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen C6 hücrelerinde oksidatif stres kaynaklı apoptosis ve inflamatuvar artışına karşı astaksantin koruyucu etkisi ilk kez araştırıldı. 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 (Singh ve ark., 2019). Ayrıca, kanıtlanmış bulgular, oksidatif stresin, merkezi sinir sistemindeki nörodejeneratif hastalıkların başlangıcı ve ilerlemesi ile karmaşık bir şekilde bağlantılı olduğunu göstermektedir (Yıldızhan ve Öztürk, 2022). Demir ve arkadaşları, astaksantin ratlara uygulamasının, testis torsiyon/detorsiyon (T/D) grubuna kıyasla belirgin şekilde TAS ve CAT seviyelerinde yükselme ile birlikte MDA, TOS ve OSI seviyelerinde önemli ölçüde azalmaya neden olduğunu göstermiştir (Demir ve ark., 2021). Ayrıca, Aslankoc'un araştırması, astaksantin metotreksat grubuna kıyasla ratların serebral korteks, hipokampus ve kan dolaşımında yükselmiş TAS seviyelerine yol açtığını tespit etmiştir (Aslankoc ve ark., 2021). Bizim çalışmamızda da bu çalışmalarla uyumlu olarak, astaksantin, C6 hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen oksidatif hasar sonrasında antioksidan etki göstererek TAS seviyelerini belirgin şekilde artırdı ve oksidatif stres belirleyicisi olan TOS seviyelerini azalttı. Antioksidan sistemini güçlendirmek ve oksidatif stresi hafifletmek, astaksantin C6 hücrelerinde koruma sağladığı olası bir mekanizmayı oluşturabilir. Bu bilgilerle uyumlu olarak, mevcut çalışma astaksantin tedavisi sonrasında C6 hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen oksidatif hasarın ardından hücre ölümünde belirgin bir azalma sergiledi.

Astrositler, merkezi sinir sisteminin iltihabi yanıtında ve doğuştan bağışıklıkta önemli bir rol oynarlar. Farklı MSS bozukluklarında, pro-inflamatuvar astrositlerin aktivasyonu, sürekli olarak önemli miktarda inflamasyon mediatörlerinin salınımına ve nöronal hasara neden olur (Chen ve ark., 2020). Oksidatif stres, hem astrosit ilişkili enflamasyonun hem de astroglial aktivasyonunun yönlendirilmesinde önemli bir rol oynar. Serbest radikaller, astroglial hücreler içinde çeşitli inflamatuvar sinyal yollarını tetikleme kapasitesine sahiptir, bu da inflamatuvar faktörlerin salınımını destekler (Rizor ve ark., 2019). Bu nedenle, glial aktivasyon, sinir sistemi içinde nörodejenerasyonla yakından ilişkili olan bir enflamasyona yol açar (Chen ve ark., 2020).

TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ , immün hücreler tarafından salınan proinflamatuvar sitokinleri temsil eder. Çalışmalar, bunların MSS bozukluklarındaki katılımını göstermiş ve beyinde artan nöroinflamasyona katkıda bulunduğunu belirtmiştir (Wang ve ark., 2019). Deneysel kuru göz modelinde in vitro ve in vivo hiperozmolaritede astaksantin inflamasyon üzerine etkisini incelemek için Li ve arkadaşları ile bir araştırma gerçekleştirildi. Buna göre astaksantin uygulamasının, kuru göz kontrol grubuna kıyasla TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  protein seviyelerinde önemli bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Li ve ark., 2020).



Şekil 4: Astaksantin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen oksidatif hasar sonrası Bölünmüş kaspaz 3, Bax ve Bcl-2 seviyeleri 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.

Figure 4: Effect of astaxanthin on Cleaved caspase 3, Bax and Bcl-2 levels after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*P<0.05, compared to the control group; #P<0.05, compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group.

Yang'ın çalışması, akut serebral enfarktüs grubuna kıyasla astaksantin uygulanması ile nörolojik fonksiyonda önemli ölçüde düzelmeye yol açtığını, aynı anda beyin ödemi indeksi, serebral enfarkt alanı, serebral patolojik hasar ve beyin hücresi apoptozu gibi parametreleri azalttığını gösterdi. Ayrıca, astaksantin, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve Bax seviyelerinin azaltılması yoluyla BCL-2 protein ifadesini artmaya yol açtı (Yang ve ark., 2021).

Bu araştırma kapsamında, astaksantin uygulaması, C6 hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen oksidatif hasar sonrasında IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  seviyelerinde belirgin bir düşüşe neden oldu ve daha önceki araştırma bulgularıyla uyumluydu. Astaksantin enflamatuvar yolak modülasyonundaki etkisinin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen oksidatif hasar sonrasında C6 hücrelerinde ek bir potansiyel koruyucu mekanizma olarak hizmet edebileceği makul bir olasılıktır. Birçok araştırma, astaksantin MSS dahil çeşitli dokularda anti-apoptotik özelliklerine işaret etmektedir (Li ve ark., 2021; Taheri ve ark., 2022).

Astaksantin'in travmatik beyin hasarı sonrasında belirgin nörokoruyucu etkiler sergilediği, oksidatif stresin azaltılması ve nöronal apoptozun hafifletilmesi yoluyla ortaya çıkmıştır (Zhang ve ark., 2021). Bax ve kaspaz-3 gibi pro-apoptotik proteinlerin apoptozu aktive ettiği, buna karşılık anti-apoptotik protein Bcl-2'nin apoptozu engellediği belirtilmektedir (Ergul ve Bakar-Ates, 2020). Bu çalışma kapsamında, astaksantin uygulanması C6 hücrelerinde apoptozu hafifletme potansiyelini değerlendirmek için ELISA testleri yapıldı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grubuna kıyasla, astaksantin C6 hücrelerinde bölünmüş kaspaz-3 ve Bax seviyelerini etkili bir şekilde azaltarak ve aynı anda Bcl-2 seviyelerini yükselterek dikkate değer bir apoptoz inhibisyonu sergiledi. Bulgularımız, astaksantin'in C6 glioma hücre hattında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından indüklenen oksidatif hasar sonrasında glial hücrelerin canlılığına koruyucu bir etki gösterdiğini önermektedir. Nörodejeneratif hastalıklar bağlamında glial hücrelerin önemini göz önünde bulundurarak, astaksantin bu tür hastalıkların tedavisi için potansiyel olarak destekleyici bir terapötik ajan olarak hizmet edebilir. Yine de, bu hipotezi doğrulamak için daha kapsamlı araştırmalar gerekmektedir.

## Sonuç

Bu çalışmanın bulguları, astaksantin'in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen oksidatif hasar sonrasında glial hücre ölümünü etkili bir şekilde azalttığını göstermektedir. Astaksantin'in TOS'un etkili bir şekilde baskılanmasını ve TAS seviyelerinin dikkate değer yükselmesini göstermektedir. Ayrıca, astaksantin uygulanmasına bağlı olarak, IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  gibi enflamatuvar yolak proteinlerinin seviyelerinde belirgin bir azalma gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, astaksantin uygulanması, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile indüklenen oksidatif hasar sonrasında bölünmüş kaspaz-3 ve Bcl-2 ifadelerinde belirgin bir artışa ve aynı anda Bax protein seviyelerinin azalmasına yol açmıştır. Özetlemek gerekirse, astaksantin, oksidatif stres, apoptoz ve enflamasyon belirteçlerini etkili bir şekilde inhibe ederek anlamlı bir koruyucu etki sağlamaktadır. Bununla birlikte, olası temel mekanizmaları ele almak için daha kapsamlı bir araştırma gerekmektedir.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## Teşekkür

Yazarlar, bu çalışmanın başarılı yürütülmesi için gerekli olan temel kaynakları ve olanakları sağladığı için Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi CUTFAM Araştırma Merkezi'ne teşekkürlerini sunarlar.

## Kaynaklar

- Akyuva Y, Nazıroğlu, M. and Yıldızhan, K. 2021. Selenium prevents interferon-gamma induced activation of TRPM2 channel and inhibits inflammation, mitochondrial oxidative stress, and apoptosis in microglia. *Metabolic Brain Disease*, 36(2): 285–298. DOI: 10.1007/s11011-020-00624-0.
- Ataseven D, Taştemur Ş, Yulak F, Karabulut S, Ergul M, 2023. GSK461364A suppresses proliferation of gastric cancer cells and induces apoptosis. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 90:105610. doi: 10.1016/J.TIV.2023.105610.

- Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela, A, Jackson-Lewis VR. 2015. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9:91. doi: 10.3389/FNANA.2015.00091
- Cabezas R, El-Bachá RS, González J, Barreto, GE. 2012. Mitochondrial functions in astrocytes: Neuroprotective implications from oxidative damage by rotenone. *Neuroscience Research*, 74(2): 80–90. doi:10.1016/J.NEURES.2012.07.008.
- Chen Y, Qin C, Huang J, Tang X, Liu C, Huang K, Xu J, Guo G, Tong A, Zhou L. 2020. The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. *Cell Proliferation*, 53(3): e12781. doi: 10.1111/CPR.12781.
- Doğan M, Yıldızhan K. 2021. Investigation of the effect of paracetamol against glutamate-induced cytotoxicity in C6 glia cells. *Cumhuriyet Science Journal*, 42(4): 789–794. doi: 10.17776/csj.999199.
- Erel O. 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4): 277–285. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015.
- Erel O. 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*, 38(12):1103–1111. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008.
- Ergul M, Bakar-Ates F. 2020. 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*, 332: 109288. doi: 10.1016/J.CBI.2020.109288.
- Fernandez-Fernandez S, Almeida A, Bolaños JP. 2012. Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *The Biochemical journal*, 443(1): 3–12. doi: 10.1042/BJ20111943.
- Gandhi S, Abramov AY. 2012. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012. doi: 10.1155/2012/428010.
- Gao F, Wu X, Mao X, Niu F, Zhang B, Dong J, Liu B. 2021. Astaxanthin provides neuroprotection in an experimental model of traumatic brain injury via the Nrf2/HO-1 pathway. *American Journal of Translational Research*, 13(3): 1483 - 1493
- Garden GA, Campbell BM. 2016. Glial biomarkers in human central nervous system disease. *Glia*, 64(10): 1755–1771. doi: 10.1002/GLIA.22998.
- Ji X, Peng D, Zhang Y, Zhang J, Wang Y, Gao Y, Lu N, Tang P. 2017. Astaxanthin improves cognitive performance in mice following mild traumatic brain injury. *Brain Research*, 1659: 88–95. doi: 10.1016/J.BRAINRES.2016.12.031.
- Karimian A, Mir Mohammadrezaei F, Hajizadeh Moghadam A, Bahadori MH, Ghorbani-Anarkooli M, Asadi A, Abdolmaleki A. 2022. Effect of astaxanthin and melatonin on cell viability and DNA damage in human breast cancer cell lines. *Acta histochemica*, 124(1). doi: 10.1016/J.ACTHIS.2021.151832.
- Kupcinskas L, Lafolie P, Lignell Å, Kiudelis G, Jonaitis L, Adamonis K, Andersen LP, Wadström T. 2008. Efficacy of the natural antioxidant astaxanthin in the treatment of functional dyspepsia in patients with or without *Helicobacter pylori* infection: A prospective, randomized, double blind, and placebo-controlled study. *Phytomedicine*, 15(6–7): 391–399. doi: 10.1016/J.PHYMED.2008.04.004.
- Li H, Li J, Hou C, Li J, Peng H, Wang Q. 2020. The effect of astaxanthin on inflammation in hyperosmolarity of experimental dry eye model in vitro and in vivo. *Experimental Eye Research*, 197: 108113. doi: 10.1016/J.EXER.2020.108113.
- Li S, Gao X, Zhang Q, Zhang X, Lin W, Ding W. 2021. Astaxanthin protects spinal cord tissues from apoptosis after spinal cord injury in rats. *Annals of Translational Medicine*, 9(24): 1796–1796. doi: 10.21037/ATM-21-6356.

- Liu JQ, Zhao XT, Qin FY, Zhou JW, Ding F, Zhou G, Zhang XS, Zhang ZH, Li ZB. 2022. Isoliquiritigenin mitigates oxidative damage after subarachnoid hemorrhage in vivo and in vitro by regulating Nrf2-dependent Signaling Pathway via Targeting of SIRT1. *Phytomedicine*, 105: 154262. doi: 10.1016/J.PHYMED.2022.154262.
- Lorenz RT, Cysewski GR. 2000. Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, 18(4): 160–167. doi: 10.1016/S0167-7799(00)01433-5.
- Pereira CPM, Souza ACR, Vasconcelos AR, Prado PS, Name JJ. 2021. Antioxidant and anti-inflammatory mechanisms of action of astaxanthin in cardiovascular diseases (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 47(1): 37–48. doi: 10.3892/IJMM.2020.4783/HTML.
- Rizor A, Pajarillo E, Johnson J, Aschner M, Lee E. 2019. Astrocytic Oxidative/Nitrosative Stress Contributes to Parkinson's Disease Pathogenesis: The Dual Role of Reactive Astrocytes. *Antioxidants*, 8(8):265. doi:10.3390/ANTIOX8080265.
- Sahin B, Ergul M. 2022. Captopril exhibits protective effects through anti-inflammatory and anti-apoptotic pathways against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in C6 glioma cells. *Metabolic Brain Disease*, 37(4): 1221–1230. doi: 10.1007/S11011-022-00948-Z.
- Sofroniew M V, Vinters H V. 2010. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1): 7–35. doi: 10.1007/S00401-009-0619-8.
- Taheri F, Sattari E, Hormozi M, Ahmadvand H, Bigdeli MR, Kordestani-Moghadam P, Anbari K, Milanizadeh S, Moghaddasi M. 2022. Dose-Dependent Effects of Astaxanthin on Ischemia/Reperfusion Induced Brain Injury in MCAO Model Rat. *Neurochemical Research*, 47(6): 1736–1750. doi: 10.1007/S11064-022-03565-5.
- Taskiran A Ş, Ergül M. 2021. The Protective Effect of Hydralazine against Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-Induced Oxidative Damage in C6 Glial Cell Line. *Turkish Journal of Science and Health*, 2(1): 8-15.
- 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. doi: 10.1042/BST20140107.
- Verkhatsky A, Nedergaard M. 2018. Physiology of Astroglia. *Physiological reviews*, 98(1): 239–389. doi: 10.1152/PHYSREV.00042.2016.
- Wang Z, Zhou L, An D, Xu W, Wu C, Sha S, Li Y, Zhu Y, Chen A, Du Y, Chen Lei, Chen Ling. 2019. TRPV4-induced inflammatory response is involved in neuronal death in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *Cell Death & Disease* 10(6): 1–10. doi: 10.1038/s41419-019-1612-3.
- Yang BB, Zou M, Zhao L, Zhang YK. 2021. Astaxanthin attenuates acute cerebral infarction via Nrf-2/HO-1 pathway in rats. *Current Research in Translational Medicine*, 69(2): 103271. doi: 10.1016/J.RETRAM.2020.103271.
- Yıldızhan K, Nazıroğlu, M. 2019. Microglia and its role in neurodegenerative diseases. *Journal of Cellular Neuroscience and Oxidative Stress*, 11(2): 861–873. doi: 10.37212/JCNOS.683407.
- Yıldızhan K, Huyut Z, Altındağ F, Ahlatcı A. 2023. Effect of selenium against doxorubicin-induced oxidative stress, inflammation, and apoptosis in the brain of rats: Role of TRPM2 channel. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics (IJBB)*, 60(3): 177–185. doi: 10.56042/IJBB.V60I3.67941.
- Yıldızhan K, Nazıroğlu M. 2020. Glutathione Depletion and Parkinsonian Neurotoxin MPP<sup>+</sup>-Induced TRPM2 Channel Activation Play Central Roles in Oxidative Cytotoxicity and Inflammation in Microglia. *Molecular Neurobiology*, 57(8): 3508–3525. doi: 10.1007/S12035-020-01974-7.
- Yıldızhan K, Öztürk A. 2022. Quipazine treatment exacerbates oxidative stress in glutamate-induced HT-22 neuronal cells. *The European Research Journal*, 8(4): 521–528. doi: 10.18621/EURJ.1027423.
- Zhang XS, Lu Y, Li Wen, Tao T, Peng L, Wang WH, Gao S, Liu C, Zhuang Z, Xia DY, Hang CH, Li Wei. 2021. Astaxanthin ameliorates oxidative stress and neuronal apoptosis via SIRT1/NRF2/Prx2/ASK1/p38 after traumatic brain injury in mice. *British Journal of Pharmacology*, 178(5): 1114–1132. doi: 10.1111/BPH.15346.