

İnsan Beyin Mikrovasküler Endotel Hücrelerinde *in vitro* İskemi Reperfüzyon Modelinin Geliştirilmesi ve Hasarın Değerlendirilmesi

[Development of an *in vitro* Injury Model of Ischemia Reperfusion in Human Brain Microvascular Endothelial Cells and the Evaluation of Cell Injury]

Nur Arslan^{1,2},
Oya Sayın^{1,2,3},
Zekiye Altun⁴,
Zahide Çavdar³,
Mehtap Yüksel Eğrilmez³,
Nilgün Yener²,
Şermin Genç^{3,4},
Kürşat Genç¹,
Gülgün Oktay²,
Hüray İşlekel²,
Gül Güner^{1,2,3}

¹Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir

²Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir

³Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı (ARLAB), İzmir

⁴Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İzmir

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Doç. Dr. Nur ARSLAN

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İnciraltı-İZMİR
Tel: 0232 412 36 22
Faks: 0232 412 36 81
e-mail: nur.arslan@deu.edu.tr

Kayıt Tarihi : 30 Eylül 2009 ; Kabul Tarihi : 14 Nisan 2010
[Registered : 30 September 2009 ; Accepted : 14 April 2010]

ÖZET

Amaç: İskemi reperfüzyon sürecinde, sadece dokunun değil, endotelin de hasarı/işlev bozukluğu sürece katılarak doku hasarını artırıcı yönde etki etmektedir. Hipoksi-reoksijenasyon modeli, *in vivo* iskemi reperfüzyon hasarının *in vitro* modeli olarak kullanılmaktadır. İskemi sırasında oksijenin yanı sıra glukoz da dokulara ulaşamadığından, oksijen glukoz deprivasyon modeli *in vivo* koşullara daha yakın bir modeldir. Bu çalışmada, insan beyin mikrovasküler endotel hücrelerinde *in vivo* iskemi reperfüzyon hasarının *in vitro* modelinin geliştirilmesi ve hipoksi reoksijenasyonun yol açtığı hücre hasarının değerlendirilmesi amaçlandı.

Yöntem: İnsan beyin mikrovasküler endotel hücrelerinde hipoksi uygulaması aşamasında ortamdan glukoz da çekilerek oksijen glukoz deprivasyon hasarı oluşturuldu. Hücre hasarı laktat dehidrogenaz aktivitesi ile, reaktif oksijen türleri oluşumu ise florometrik yöntemle değerlendirildi.

Bulgular: 6 saatlik oksijen glukoz deprivasyonu süresini takiben, 18-24 saat süreyle reoksijenasyon + glukoz eklenmesi ile kontrol koşullarındaki hücrelerle karşılaştırıldığında, deney grubunda anlamlı düzeyde laktat dehidrogenaz salınımı ve hücre hasarı saptandı. Ayrıca, 6 saat oksijen glukoz deprivasyonu uygulamasını takiben reoksijenasyon + glukoz eklenmesinin 60. dakikasında reaktif oksijen türlerinin en fazla arttığı belirlendi.

Sonuç olarak, oksijen glukoz deprivasyonu + reoksijenasyon + glukoz eklenmesi ile insan beyin mikrovasküler endotel hücrelerinde anlamlı düzeyde laktat dehidrogenaz salınımı ve reaktif oksijen türlerinde artış saptanmış ve iskemi reperfüzyon hasarının *in vitro* modelinin geliştirilmesi sağlanmıştır. Bu sayede, bu hücreler üzerindeki olası koruyucu etkileri araştırılacak olan koruyucu ajanların deneysel uygulamalardaki etkisi, bu model ve süreler kullanılarak belirlenebilecektir.

Anahtar kelimeler: Oksijen glukoz deprivasyonu, insan beyin mikrovasküler endotel hücresi, reaktif oksijen türleri, iskemi reperfüzyon modeli

ABSTRACT

Aim: In the course of ischemia reperfusion, injury / functional deterioration of the endothelium contribute to tissue damaging process. Hypoxia-reoxygenation model has been used as *in vitro* model of ischemia reperfusion injury. Oxygen glucose deprivation model can be considered to mimic the *in vivo* conditions. This study aimed to develop an *in vitro* model of ischemia reperfusion injury in human brain micro vascular endothelial cells and to evaluate the cell injury caused.

Methods: Oxygen glucose deprivation injury was produced by the deprivation of glucose during the hypoxia exposure. Cell injury was assessed by lactate dehydrogenase activity, while production of reactive oxygen species was determined using a fluorometric assay.

Results: Reoxygenation plus glucose supplementation for 18 and 24 hours, after 6 hours of oxygen glucose deprivation, was observed to cause a significant lactate dehydrogenase release and cell injury. In addition, after 6 hours of oxygen glucose deprivation, reactive oxygen species were found to be maximally increased in the 60th minute of reoxygenation plus glucose supplementation.

In conclusion, by oxygen glucose deprivation + reoxygenation + glucose supplementation, a significant lactate dehydrogenase release and an increase in reactive oxygen species was determined and *in vitro* model of ischemia reperfusion injury in human brain microvascular endothelial cells was achieved. Thus, this model and the different durations of hypoxia-reoxygenation can be used in future studies to investigate the effects of protective agents.

Key words: Oxygen glucose deprivation, human brain microvascular endothelial cells, reactive oxygen species, ischemia-reperfusion model.

Giriş

İnme, akut miyokard enfarktüsü, şok gibi akut iskemik durumlarda görülen iskemi reperfüzyon (I-R) hasarı inflamasyon, oksidatif stres ve apoptotik ya da nekrotik hücre ölümünü kapsamaktadır [1-3]. Hipoksi tek başına doku hasarına neden olabilmektedir ancak, hipoksik dokunun reperfüzyon ile oksijenlenmesi bu hasarı artırmaktadır [4]. İskemi reperfüzyonun neden olduğu doku hasarında hedef organ (beyin, miyokard, böbrek gibi) parankim hücrelerinin etkilenmesinin yanı sıra, endotel işlev bozukluğu ya da hasarı da sürece katılarak doku hasarına olumsuz katkıda bulunmaktadır [5,6]. I-R, vasküler sistemde ve vasküler duvarı döşeyen endotel hücrelerinde hasara ve disfonksiyona yol açmaktadır [7]. Primatlarda oluşturulan deneysel fokal beyin iskemisi modelinde bölgesel nöronal hasarın mikrovasküler bütünlük kaybıyla anlamlı olarak korele olduğu gösterilmiştir [5]. Bu bulgular doku homeostazının sürdürülmesinde vasküler ve parankimal elemanların sıkı ilişkisinin rolü olduğunu ve I-R hasarının yol açtığı hastalıkların tedavisinde vasküler elemanların da hedef alınması gerektiğini düşündürmektedir.

Hipoksi-reoksijenasyon (H-R), I-R hasarının *in vitro* koşullardaki uygulamasıdır. Endotel hücrelerinde H-R uygulaması ile hücre hasarı geliştiğini gösteren pek çok çalışma mevcuttur [8-11]. Bu çalışmaların çoğunluğu iskemik modeli olarak hipoksiyi uygulamakla beraber, bazılarını iskemik sürecinde glukoz da hücrelere ulaşmadığından ortamdaki glukozu da uzaklaştırmaktadır (oksijen glukoz deprivasyonu-OGD) [8,9]. Masceron ve arkadaşları [8] insan koroner arter endotel hücreleri ve insan umbilikal ven endotel (HUVE) hücrelerinde H-R uygulamasında hücre canlılığında anlamlı bir kayıp oluşturamazken, oksijen glukoz deprivasyonu uyguladıklarında hücrelerin hipoksiye olan duyarlılığının arttığını gözlemlenmiştir. Therade ve arkadaşları da [9], HUVE hücrelerinde 2 saat OGD ve ardından 1 saat reoksijenasyon + ortama glukoz eklenmesi (RGE) modelini kullanmışlardır. OGD + RGE uygulaması ile reaktif oksijen türlerinin (ROT) başlangıca göre anlamlı olarak arttığını saptamışlardır.

H-R sırasında OGD uygulaması ve daha sonra reoksijenasyon sürecinde ortama glukozun da eklenmesi, vücutta hipoksi (iskemi) süreci bittiğinde ve reoksijenasyon (reperfüzyon) başladığında oksijenin yanı sıra glukoz da hücrelere ulaşabildiğinden, deneysel modeli güçlendirmek açısından önemlidir. Bu çalışmada insan beyin mikrovasküler endotel (human cerebral microvascular endothelial- HCMVE) hücrelerinde I-R modelinin *in vitro* koşullarda uygulamasının yapılması, bunun için, OGD modeli ile sitotoksitenin ve ROT oluşumundaki olası değişikliğin incelenmesi ve optimum hasar oluşturacak uygun koşulların saptanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Gereç

OGD deneyleri için Ca^{++} ve Mg^{++} içeren PBS (**fosfat tampon tuzu**: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM sod-

yum fosfat dibazik, 2 mM potasyum fosfat monobazik, pH of 7.4) (Biochrom Seromed); laktat dehidrogenaz (LDH; E.C 1.1.1.27) ölçümü için “LDH Cytotoxicity Detection Kit” (Roche Applied Science) kullanıldı. ROT ölçümü için 3'- (p-aminophenyl) florescein (APF) ve 3'- (p-hydroxyphenyl) florescein (HPF) floresan problemleri (Invitrogen) kullanıldı.

“**Oksijen glukoz deprivasyonu (OGD)**” ve “**reoksijenasyon (R) / reoksijenasyon + glukoz eklenmesi (RGE)**” uygulaması

Hücre kültürü

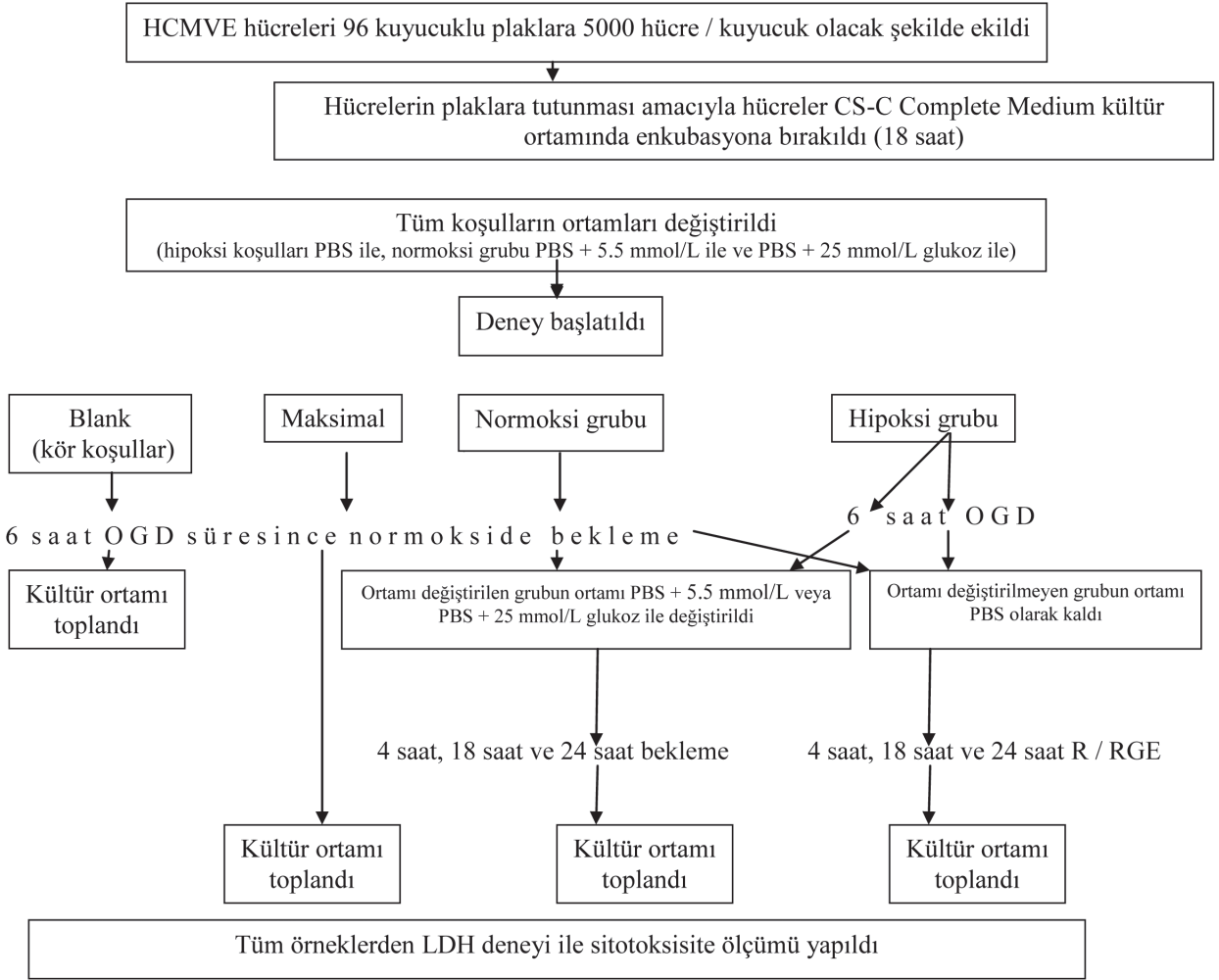
Ticari olarak üretilen insan beyin mikrovasküler endotel hücre hattı Clonetics Corporation'dan (ACBRI 376, Kirkland WA, USA) alındı. Hücreler büyüme faktörü ve %10 serum içeren kültür ortamında tutuldu (CSC Certified, CS-C Complete Medium, Cell Systems Corporation), ortam 2 günde bir değiştirildi ve hücreler 5-9 günde bir pasajlandı. Pasajlama sırasında hücrelerin kültür kabının cidarına tutunabilmesi için hücreler yeni hücre kültür kabına aktarılmadan önce hücre kültür kabı yüzeyi ekstrasellüler matriks komponentlerini içeren solusyon (CSC Certified, Attachment Factor™, Cell Systems Corporation) ile kaplandı. Deneyler, hücreler 6 ve 9. pasajlar arasındayken gerçekleştirildi.

Uygulama planı

Hipoksi (OGD) uygulamasından 18 saat önce HCMVE hücreleri 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekildi. Tüm koşullar “altılı” olarak çalışıldı. Kuyucuklara 200'er μ L kültür ortamı eklendi.

H-R hasar modeli olarak, hipoksinin yanı sıra, *in vivo* koşullara daha yakın olduğu için glukozun da ortamdaki uzaklaştırıldığı OGD modeli kullanıldı [9, 12-16]. Bu amaçla kuyucuklardaki kültür ortamı çekilerek yerine deney (hipoksi) süresince PBS konuldu. Reoksijenasyon aşamasında ise deneyler, iki farklı konsantrasyonda glukoz içeren ortamlarda yapıldı. Bu amaçla, kültür ortamı olarak 5.5 mmol/L ya da 25 mmol/L glukoz içeren PBS kullanıldı. Hem 5.5 mmol/L hem de 25 mmol/L glukoz ile deneyler ikişer kez yapıldı.

Çalışma, normoksi ve hipoksi koşulları (OGD + R/RGE grubu) olmak üzere iki koşulda yapıldı. Vücutta hipoksi (iskemi) süreci bittiğinde ve reoksijenasyon (reperfüzyon) başladığında oksijenin yanı sıra glukoz da hücrelere ulaşabildiğinden, deneysel modelin etkinliğini belirginleştirmek için, her iki koşulda da iki uygulama yapıldı. Birinci uygulamada OGD + R grubunun (ortamı değiştirilmeyen gruplar), kültür ortamı hipoksi süresi bittikten sonra reoksijenasyon aşamasının sonuna kadar (tüm deney süresince) değiştirilmedi ve PBS olarak kaldı. İkinci uygulamada ise (ortamı değiştirilen gruplar), hem normoksi hem de hipoksi koşullarındaki kuyucukların ortamı, OGD süresi (6 saat) tamamlandıktan sonra, reoksijenasyon aşamasının başlangıcında değiştirildi. Bu uygulama ile reoksijenasyon aşamasında ortama glukoz da eklenmiş oldu (RGE). Yapılan deneylerin akış planı Şekil 1'de gösterilmektedir.



Şekil 1. Sitotoksistite ölçümünde deney akış çizelgesi (OGD: oksijen glukoz deprivasyonu, R/RGE: reoksijenasyon / reoksijenasyon + glukoz eklenmesi)

Endotel hücre kültürlerinde OGD + R / RGE uygulamasının hücre hasarına etkisi laktat dehidrogenaz (LDH) testiyle [17] ve ROT ölçümü ise APF ve HPF floresan problemleri kullanılarak florometrik yöntemle değerlendirildi [18].

Modelin uygulanması

Hücrelerin ekilmesinden 18 saat sonra kuyucuklardaki hücreler mikroskopta incelendiğinde yaklaşık %80 sıkışık oldukları gözlemlendi. Tüm koşulların 200'er μ L olan ortamları çekilerek uzaklaştırıldı. Bunun yerine, hipoksinin hücreler üzerine olan etkisini artırmak için (hipoksi koşullarında hücrelerde dehidratasyon gelişmesini önleyecek minimum miktarda) her kuyucuğa 100'er μ L olmak üzere, hipoksi (OGD + R / RGE) plağına PBS, normoksi plağına ise "PBS + 5.5 mmol/L" veya "PBS + 25 mmol/L" glukoz içeren ortam eklendi. Bu aşamadan sonra normoksi plağı 37°C'deki enkubatöre konuldu. OGD + R / RGE plağı ise, hipoksi odacığın (Billups-Rothenberg Model MIC-101 Modular Incubator Chamber) alındı. Hipoksi uygulaması (%95 N_2 ve %5 CO_2 hava karışımı ile) başlatıldı ve oksijen sensörü (Billups-

Rothenberg, USA) ile ölçülen oksijen oranı %1'in altına düşüldükten sonra 5 dakika daha hipoksi uygulandı (normoksi: pO_2 : %21; hipoksi: pO_2 : %1). Beşinci dakikanın sonunda odacıktaki oksijen miktarı %1'in altında idi. Daha sonra OGD + R / RGE plağı, hipoksi odacığının içinde yerleşik olarak, 37°C'deki enkubatöre kaldırıldı. 6 saat OGD süresi dolduktan sonra hipoksi sonlandırıldı. Plaklar hipoksi odacığın çıkarıldı. Hem hipoksi (OGD + R / RGE) plağındaki "6 saat OGD", hem de normoksi plağındaki "6 saat normoksi" kuyucuklarında bulunan kültür ortamından 75'er μ L alınarak Eppendorf tüplerine aktarıldı ve ağızları kapatılarak 24 saat boyunca (deney süresince), deney tamamlandıktan sonra sitotoksistite ölçümü yapılmak üzere, +4°C'de saklandı. Ayrıca normoksi plağındaki kör kuyucuklarından (hücre içermeyen sadece kültür ortamı olan koşullar) da aynı miktarda kültür ortamı toplandı ve saklandı.

Reoksijenasyonun başlangıcında "ortamı değiştirilen grubun" hem OGD + RGE hem de normoksi plağındaki kuyucukların tamamının ortamları çekilerek atıldı. Bu kuyucuklara 5.5 mmol/L veya 25 mmol/L glukozlu PBS eklendi ve tüm plaklar 37°C'ye kaldırıldı (reoksijenasyon)

yon süreci). 6 saat hipoksiden sonra 4 saat, 18 saat ve 24 saat reoksijenasyon süreleri dolduğunda da ortamlar alındı ve +4°C'de saklandı. Reoksijenasyonun 22. saatinde maksimal (en yüksek sitotoksosite) kuyucuklarına 20'şer µL Triton X-100 eklendi. Pipetleme yapıldı ve mikroskopta bu kuyucuklardaki hücrelerin kalkmış oldukları görüldü. 24. saat reoksijenasyon süresi bitiminde maksimal kuyucuklarındaki ortamlar da toplandı. Deney süresi tamamlandığında ve tüm koşullardaki örnekler toplandığında beklenmeden LDH deneyi yapıldı.

Laktat dehidrogenaz deneyi:

Laktat dehidrogenaz enzimi plazma membranı hasara uğradığında hızla hücre kültür ortamına salınmaktadır [17]. Yöntemde ilk basamakta NAD⁺ laktatın pirüvata dönüşmesini katalizlerken NADH/H⁺'a indirgenmektedir. İkinci basamakta katalist (diaforaz) NADH/H⁺'dan H/H⁺'ı sarı tetrazolium tuzu iodotetrazolium klorüre (INT) transfer etmekte ve INT de formazana indirgenmektedir. Ölü ya da plazma membranı hasara uğramış hücrelerin sayısının artışı kültür süpernatantında LDH aktivitesinin artışına neden olmaktadır. Deneylerde LDH "Cytotoxicity Detection Kit" katalist ve boya solüsyonu kullanıldı.

Ortamların bulunduğu 96 kuyucuklu plaktaki her bir kuyucuğa katalist ve boya solüsyonları karışımından 50'şer µL bekletilmeden eklendi. Plaklar ışık görmeyen ortamda bekletildi. Kılavuzda önerildiği üzere 30-60 dakikalar arasında 492 / 630 nm'de absorbanslar ELISA Plak Okuyucu ile (Stat Fax 2100 Microplate Reader) okutuldu. Absorbansların sonucu alındıktan sonra altılı olarak çalışılmış olan her koşulun ortalaması hesaplandı. Daha sonra her koşulun sitotoksosite değeri hesaplandı. Sitotoksosite hesaplanması iki aşamada yapıldı:

1. Koşulun absorbansı (Ortalama) – Blank (kör) absorbansı (ortalama) = Koşulun net absorbansı
2. (Koşulun net absorbansı / maksimal net absorbans*) X 100 = % sitotoksosite

* Triton X-100 eklenmiş maksimal koşulundaki net absorbans değeri

"Oksijen glukoz deprivasyonu (OGD)" ve "Reoksijenasyon + glukoz eklenmesi (RGE)" uygulamaları ve ROT

Modelin uygulanması

Altı saatlik OGD uygulamasını takip eden farklı zaman aralıklarındaki reoksijenasyon sürelerine (15 dakika, 60 dakika ve 24 saat) maruz kalan HCMVE hücrelerinde ROT üretiminin ölçülmesi amaçlandı. HCMVE hücreleri 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ve her koşul 12'şerli olarak siyah 96 kuyucuklu plaklara ekim yapıldı (Her koşulda 6 kuyucuk 3'- (p-aminophenyl) florescein [APF] için, 6 kuyucuk 3'- (p-hydroxyphenyl) florescein [HPF] için). On sekiz saat sonra OGD uygulaması başlatıldı. OGD tamamlandıktan sonra hipoksi koşullarının ortamları çekilerek yerine, 25 mmol/L glukozlu PBS konuldu. 15 dakika, 60 dakika ve 24 saatlik enkubasyon-

dan sonra ROT ölçümü yapıldı. ROT ölçümleri için yapılan deneyler üç kez tekrarlandı.

Reaktif oksijen türlerinin ölçümü

Yöntem; fluoresan olmayan 3'- (p-aminophenyl) florescein (APF, Invitrogen) ve ve 3'- (p-hydroxyphenyl) florescein'in (HPF, Invitrogen) özellikle hidroksil, peroksinitrit ve hipoklorit radikalleri ile tepkimeye girmesi sonucu oluşan parlak yeşil floresansın 490 nm eksitasyon; 515 nm emisyon dalga boylarında ölçümü esasına dayanmaktadır. Deney tamamlandıktan sonra her koşula 10 µM, 2 µL APF veya HPF eklendi ve 30 dk 37°C'de inkübe edildi. Kuyucuklar 200 µL PBS ile yıkandı ve floresan ölçüm için cihaz duyarlılık ayarları plağımızdaki en yüksek sinyal alınabilecek örneğe göre ayarlanarak floresan ölçüm aralığı 15000 AU ve 25 AU olarak uygulandı. Fluoressans şiddeti 485 nm eksitasyon ve 528 nm emisyonunda multiplak okuyucuda (BIO-TEK Instruments Inc, USA) ölçüldü [18].

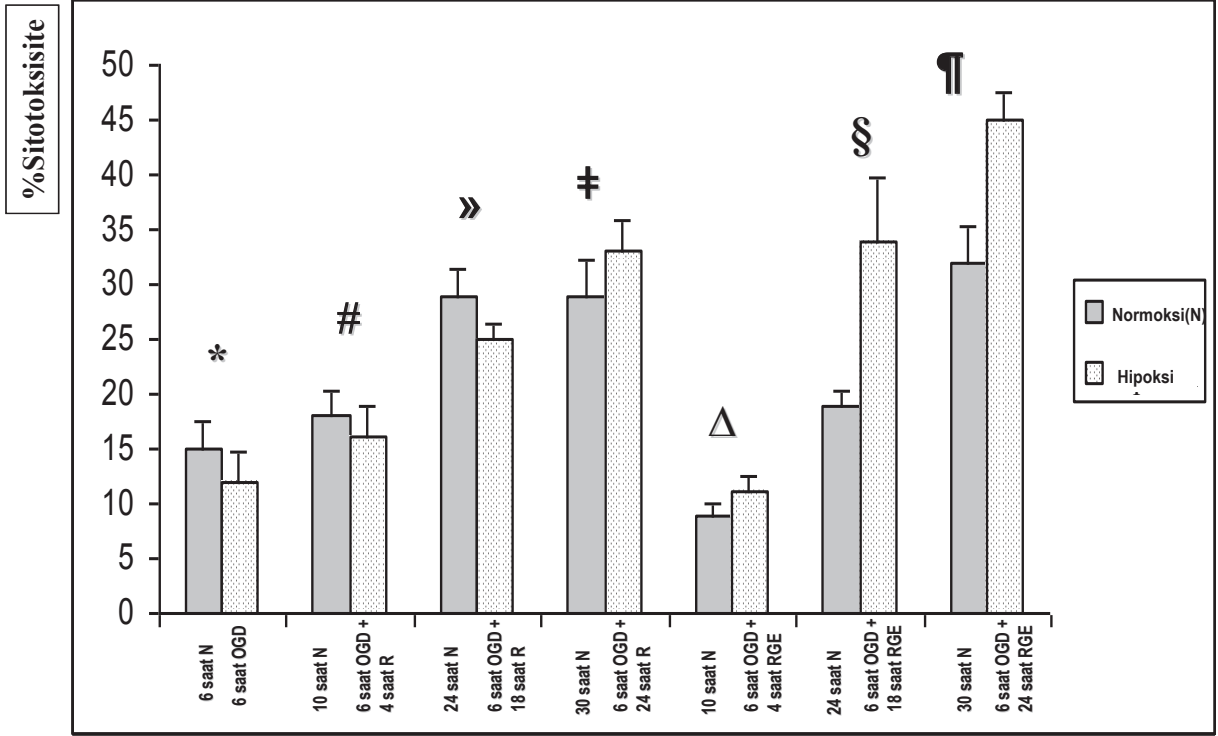
İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz, SPSS (Statistical Package of Social Science) Software 11.0'da yapıldı. Veriler ortalama ± standart sapma olarak gösterildi (Şekil 2 ve 3). İkili grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Mann Whitney-U testi kullanıldı. Grupların zaman içindeki verilerinin değişimlerinin karşılaştırılması repeated measures ANOVA ile yapıldı. p<0.05 bulunması anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

"OGD + R / RGE" uygulamasında sitotoksosite bulguları 5.5 mmol/L ve 25 mmol/L glukoz içeren ortamlarla OGD modeli uygulandı. 5.5 mmol/L glukoz içeren ortamlarda deney yapıldığında hem OGD ile hem de farklı sürelerde R/RGE uygulaması ile sitotoksitenin anlamlı olarak artmadığı görüldü.

25 mmol/L glukoz içeren ortam kullanıldığında ise, reoksijenasyon döneminin başında ortam değiştirildiğinde (RGE uygulaması ile) 18 ve 24 saatlik reoksijenasyon süresinde sitotoksitenin hipoksi koşullarında anlamlı olarak arttığı görüldü (sırasıyla p değerleri; 0.004 ve 0.006) (Şekil 2). Ortamı değiştirilmeyen grubun normoksi koşullarının (6 saat normoksi [15.5 ± 1.2], 10 saat normoksi [18.0 ± 1.2], 24 saat normoksi [29.0 ± 1.2], 30 saat normoksi R [29.5 ± 1.6]) ve hipoksi koşullarının (6 saat OGD [12.1 ± 1.4], 6 saat OGD+ 4 saat R [16.3 ± 1.5], 6 saat OGD+18 saat R [25.8 ± 0.8], 6 saat OGD+24 saat R [33.4 ± 1.4]) sitotoksosite değerlerinin zamanla değişimleri anlamlı idi (sırasıyla normoksi koşullarının değişimi p=0.019 ve hipoksi koşullarının değişimi p<0.001). Ortamı değiştirilen grupta da normoksi koşullarının (6 saat normoksi [15.5 ± 1.2], 10 saat normoksi [9.7 ± 0.5], 24 saat normoksi [19.4 ± 0.6], 30 saat normoksi [32.1 ± 1.6]) ve hipoksi koşullarının (6 saat OGD [12.1 ± 1.4], 6 saat OGD+ 4 saat RGE [11.5 ± 0.8], 6 saat OGD+18 saat RGE [34.3 ± 2.6], 6 saat OGD+24 saat RGE [45.2 ± 1.3]) sitotoksosite değerlerinin zamanla değişimleri anlamlı idi (sırasıyla p=0.003 ve p=0.001).



Şekil 2. Sitotoksiste sonuçları. 25 mmol/L glukoz + PBS ile ortamı değiştirilen ve değiştirilmeyen gruplarla yapılan deneyin %sitotoksiste değerleri (Ortalama ± standart sapma). p değeri her koşulun hipoksi ve normoksi değeri arasındaki farkı göstermektedir (p değerleri: *0.117, #0.262, »0.100, †0.055, Δ0.092, §0.004, ¶0.006). (Deneyler 2 kez uygulanmış ve birinin sonucu verilmiştir).

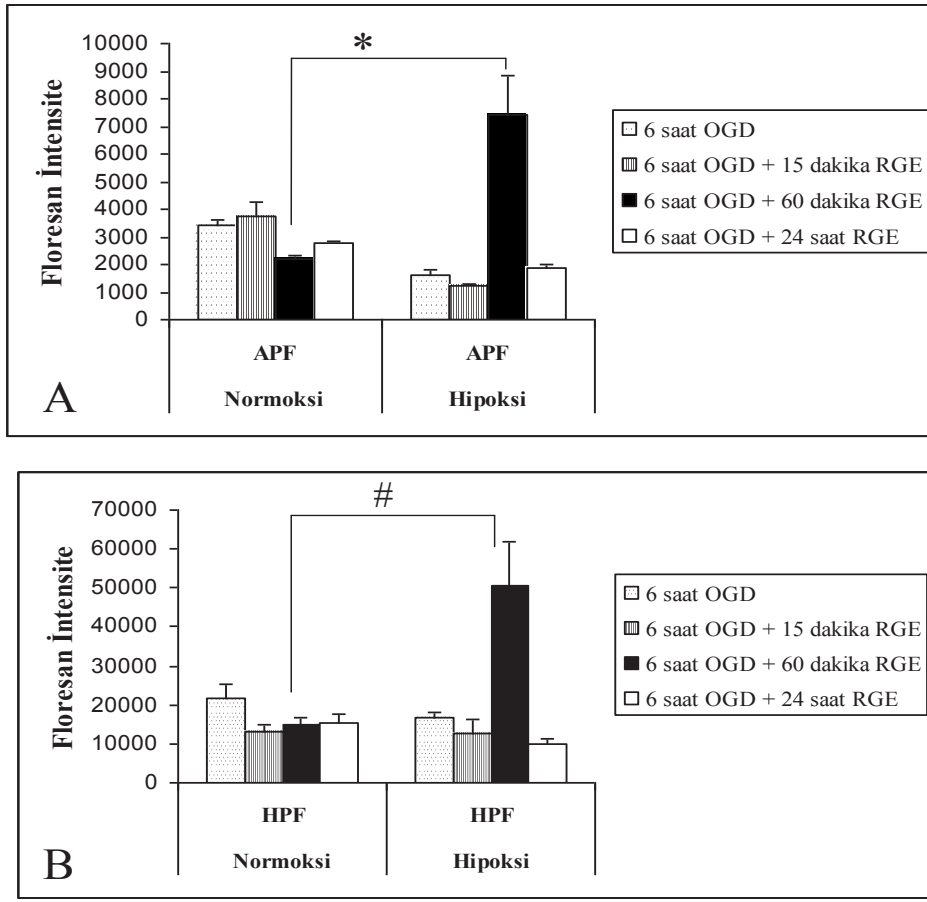
“OGD + RGE” uygulamasında ROT bulguları

HCMVE hücrelerinde 6 saat OGD uygulamasını izleyen RGE'nin 60. dakikasında APF ve HPF problemleriyle ayrı ayrı ölçümlenen ROT'un anlamlı olarak arttığı gözlemlendi (sırasıyla p değerleri; 0.004 ve 0.016) (Şekil 3). Normoksi koşullarının (6 saat OGD [3391.8 ± 545.4], 6 saat OGD+ 15 dakika RGE [3741.3 ± 1244.4], 6 saat OGD+60 dakika RGE [2208.5 ± 283.7], 6 saat OGD+24 saat RGE [2770.8 ± 245.0]) ve hipoksi koşullarının (6 saat OGD [1649.3 ± 474.8], 6 saat OGD+ 15 dakika RGE [1194.1 ± 192.6], 6 saat OGD+60 dakika RGE [7446.0 ± 3439.7], 6 saat OGD+24 saat RGE [1891.1 ± 214.3]) zaman içindeki değişimlerinin APF ile ölçümlerinde anlamlı fark saptandı (normoksi p=0.009 ve hipoksi p=0.002). HPF ile ölçümlerde ise hipoksi koşullarının zaman içindeki değişimi anlamlı idi (6 saat OGD [16733.0 ± 3543.1], 6 saat OGD+15 dakika RGE [12745.6 ± 8840.1], 6 saat OGD+60 dakika RGE [62892.5 ± 23435.7], 6 saat OGD+24 saat RGE [9902.6 ± 3252.3]) (normoksi p=0.706 ve hipoksi p=0.014).

Tartışma

Bu çalışmada *in vitro* HCMVE hücrelerinde, OGD modelinin optimum koşulları belirlenerek uygulanmıştır. Hücre hasarının tespiti için uygulanan zaman noktaları literatürdeki çalışmalar göz önüne alınarak belirlenmiş ve kendi laboratuvarımızdaki koşullara göre optimize edilmiştir. Çalışmamızda, OGD modeli ile 6 saatlik hipoksi (OGD) ve 18 ve 24 saatlik reoksijenasyon (RGE) sürelerinde normoksi koşullarındaki hücrelerle karşıla-

tırıldığında, deney grubunda anlamlı hücre hasarı saptanmıştır. HUVE hücrelerine değişen sürelerde hipoksi ve reoksijenasyon uygulanan bir çalışmada, maksimum hücre ölümü (propidyum iyodür boyaması ile), 20 saat hipoksiden sonra 10 saatlik reoksijenasyon sonunda saptanmıştır [10]. HCMVE hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise, hücreler değişen sürelerde hipoksi (4, 8 ve 12 saat) ve reoksijenasyona (1, 2, 4, 8, 12 ve 24 saat) maruz bırakılmıştır [11]. Bu çalışmada, değişen hipoksi sürelerinin hücrelerden LDH salınımını değiştirmedığı ancak artan reoksijenasyon sürelerinin LDH salınımını arttırdığı, en fazla LDH salınımının ve hücre ölümünün 6 saat hipoksi/24 saat reoksijenasyon ile olduğu belirlenmiştir. Bu zaman diliminde meydana gelen nekrotik hücre ölümü %40 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada glukoz deprivasyonu yapılmamış, bizim çalışmamızda ise hipoksiye ek olarak glukoz deprivasyonu da uygulanmış ve *in vivo* koşullara daha yakın bir hasar modeli oluşturulmuştur. Serebral endotel hücrelerinde glukoz deprivasyonu ve HR hasar modelinin kullanıldığı çalışmalar da literatürde bulunmaktadır [19,20]. Bunlardan biri, Zhang ve arkadaşlarının yaptığı ve HCMVE hücrelerinde “OGD + Reoksijenasyon” modelinin uygulandığı çalışmadır [19]. Bu çalışmada hücrelere önce 4, 6 ve 3+3 saat (1 saat aralıklı olarak 3'er saat) hipoksi uygulanmış, sonra 8 saat OGD ve ardından 20 saat reoksijenasyon uygulanmıştır. Bu çalışmada apoptotik hücre ölümü ve survivin aktivasyonu ve başlangıçta uygulanan hipoksi sürelerinin bu parametreler üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda bu çalışmadan farklı



Şekil 3. Oksijen glukoz deprivasyonu uygulanan HCMVE hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin bulguları (Ortalama ± standart sapma). A: APF ile (*p:0.004), B: HPF ile (#p: 0.016) ölçüm değerleri (Deneyler 3 kez tekrarlanmış ve birinin sonucu verilmiştir).

olarak başlangıçtaki hipoksi uygulaması kullanılmamıştır. Ayrıca çalışmamızda farklı sürelerde reoksijenasyon ve farklı konsantrasyonlarda glukoz eklenmesi ile hücre hasarı ve ROT üretimi üzerine olan etkiler incelenmiştir. Diğer bir çalışma ise Bresgen ve arkadaşlarının domuz serebral endotel hücrelerinde 24 saat hipoksi ve 4 saat reoksijenasyon uygulaması ile yaptıkları çalışmadır [20]. Bu çalışmada deneyin bir kısmında glukoz deprivasyonu da uygulanmış, sonuçlar glukoz eklenmiş kontrol hücreleriyle karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar bu çalışmada hem domuz (A9/B12) hem de rat endotel hücrelerinde (GP-8) hipoksi reoksijenasyonu takiben 0, 2 ve 24. saatlerde, kontrol grubuna göre LDH salınımında anlamlı artış saptamamışlardır. Ayrıca, hücreleri mikroskopik olarak incelediklerinde de hipoksi reoksijenasyonu takiben morfolojik değişiklik görmemişlerdir. Ancak ortam aglisemik olduğunda apoptotik hücrelerde anlamlı artış ve mitotik indekste azalma görülmüş ve agliseminin hipoksinin sitotoksik etkisinin belirginleştirdiği sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda insan serebral endotel hücreleri kullanılmış, OGD + RGE modeli uygulanmış ve bu modelde hem ROT artışı hem de LDH artışı tespit edilmiştir. Çalışmamızda, anlamlı hücre hasarı reoksijenasyon aşamasında ortama 25 mmol/L g glu-

koz eklendiğinde görülmüştür. Literatürde hasar modeli olarak OGD + RGE modelini kullanan çalışmalar yapılmıştır. HUVE hücreleri ile yapılan bir çalışmada, 2 saat süreyle OGD uygulandığında ROT değerinde artış olmazken, sonrasında 1 saatlik RGE uygulamasıyla ROT düzeyinde (başlangıca göre %115) artış saptanmıştır [9]. Hücreler oksijen ve glukoz deprivasyonu olduğunda, enzim aktivitelerinde, mitokondrial işlevlerinde, hücre iskelet yapılarında, membran transportu ve antioksidan defans sistemlerinde spesifik değişikliklere giderler. OGD sırasında hücrelerde gerçekleşen değişikliklerin hepsi reoksijenasyon hasarında rol oynayan faktörler olabilmektedir [5,9]. Hipoksi sırasında hücre fonksiyonları üzerine etkili olan transkripsiyon faktörlerinden biri “hypoxia-inducible factor 1 α ” (HIF-1 α)’dır. Hipoksi, pek çok hücrede HIF-1 α ’nın ekspresyonunu artırmakta ve bu artış da hücreyi hipoksi hasarından koruyan glukoz transporterları, glikolitik enzimler, vasküler endotelial büyüme faktörü, eritropoetin gibi bazı faktörlerin mRNA transkripsiyonunu indüklemektedir [21]. Çalışmamızda OGD uygulamasından sonra ortama glukoz eklenmeyen grupta anlamlı hücre hasarı olmaması, hipogliseminin de hipoksi gibi hücrelerde endojen savunma mekanizmaları geliştirmesiyle ilişkili olabilir.

Glukoz deprivasyonu da hücre hasarının gelişmesi için bir risk faktörüdür. Kardiyak fibroblast hücrelerinde yapılan bir çalışmada, hipoksi olmadan sadece glukoz deprivasyonu olduğunda bile hücrede ROT oluşumunun arttığı ve ortama glukoz (3 g/litre) eklenmesinden 1 saat sonra hem oksijenaz 1 ve siklooksijenaz 2 enzim ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir [22]. Bizim çalışmamızda da reoksijenasyon aşamasında ortama *in vivo* olarak fizyolojik olan dozlarda glukoz (5.5 mmol/L) eklendiğinde hücre hasarında artış olmazken, daha yüksek dozda glukoz ile (25 mmol/L) anlamlı artış saptandı. 5.5 mmol/L glukoz eklenmesi, glikolitik yolu kullanan hücre kültür ortamında normoglisemi sağlayamadığından hipoglisemi gibi hücrede endojen korunma mekanizmalarını geliştirmiş olabilir. PC12 hücrelerinde serebral inme modelinin geliştirilmesi amacıyla yapılan ve bu amaçla OGD + RGE modeli kullanılan bir çalışmada 1-8 saat OGD, 6-96 saat reoksijenasyon ve bu aşamada da 0-10 mg/mL glukoz konsantrasyonları denenmiş; 6 saatlik OGD süresini takiben 24 saatlik reoksijenasyon uygulandığında ve reoksijenasyon aşamasında ortama 4-6 mg/mL glukoz eklendiğinde optimal hasar modeli oluşturulduğu belirtilmiştir [23]. Çalışmamızda da 6 saatlik OGD süresini takiben reoksijenasyon aşamasında ortama 5.5 mmol/L (1 mg/mL) glukoz eklendiğinde anlamlı hasar saptanamazken, 25 mmol/L (4.5 mg/mL) glukoz kullanıldığında 18 ve 24. saatlerde anlamlı hasar saptanmıştır.

Reaktif oksijen türleri, hücre metabolizması sırasında ortaya çıkan ve hücre işlevlerini olumsuz yönde etkileyen maddelerdir. HR hasarında artan reaktif oksijen türlerinin hücre fonksiyon bozukluğuna yol açtığı gösterilmiştir [9]. Organ ya da hücre tipine bağlı olarak çeşitli enzimler ROT oluşumuna yol açabilmektedir [24]. Çalışmamızda HCMVE hücrelerinde 6 saat OGD uygulamasını takiben farklı reoksijenasyon süreleri uygulandığında, reoksijenasyonun 60. dakikasında ROT artışının anlamlı olduğu saptandı. Literatürde yapılan çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışmada farklı hasar modelleri ile farklı tip doku veya hücrelerde ROT artışı gösterilmiştir. Kardiyak fibroblast hücrelerinde glukoz deprivasyonu ile 30 dakikada, pulmoner arter endotel hücrelerinde hipoksi ile 20 dakikada, PC12 hücrelerinde ise, hiperoksiden sonra hipoksinin 3. saatinden itibaren ROT'un anlamlı olarak arttığı saptanmıştır [22,25,26]. Primer rat kortikal nöron hücre hattında 3 ve 5 saat hipoksinin yanı sıra glukoz deprivasyonu da sağlandığında, sadece hipoksiye göre ROT anlamlı olarak artmıştır [27]. Reoksijenasyon aşamasında ROT artışını gösteren çalışmalar da yapılmıştır. Embriyonik rat kardiyomyosit hücre hattında 24 saat hipoksi ve glukoz deprivasyonunu takiben reoksijenasyonun 60. dakikasında ROT'un arttığı gösterilmiştir [28]. Benzer şekilde, K562 eritrolösemi hücre hattında 22 saat hipoksiden sonra 1 ve 24 saat reoksijenasyon uygulandığında, ROT 1. saatte anlamlı olarak artmıştır [29]. Bulgularımız literatürde yer alan pek çok hücre hattı çalışması ile uyumludur.

Çalışmamızda ROT ölçümü reoksijenasyonun erken dakikalarından itibaren (15, 60. dakikalar ve 24. saatte) ölçülmeye başlanmış ancak, hücre hasarı için yapılan LDH testi reoksijenasyonun daha ileri saatlerinde (4, 18 ve 24. saatlerde) gerçekleştirilmiştir. ROT artışı reoksijenasyonun 60. dakikasında anlamlı iken, hücre hasarı 18 ve 24. saatlerde anlamlı bulunmuştur. Hipoksi reoksijenasyonu hasar modeli olarak kullanan pek çok çalışmada reaktif oksijen türlerinde anlamlı artış hipoksi sırasında veya hipoksiyi takiben reoksijenasyon uygulandığında dakikalar içinde veya birkaç saat içinde saptanmıştır. Millar ve arkadaşları, HUVE hücrelerinde HR hasarı uyguladıklarında öncelikle mitokondri içinde ROT artışı olduğunu, daha sonra sitoplazmada ROT artışının gerçekleştiğini ve bu artan oksijen türlerinin intrasellüler redoks dengesini değiştirdiğini ve daha sonra bazı sinyal yollarını aktive ettiklerini göstermişlerdir [30]. Therade ve arkadaşlarının yaptığı ve HUVE hücrelerinin kullanıldığı çalışmada da RGE'nin 1. saatinde ROT artışı olmuş ve bunun mitokondri kaynaklı olduğu gösterilmiştir [9]. Yapılan çalışmalarda hücre içinde artan ROT'un plazma membranında bulunan fosfolipidlere peroksidasyon yoluyla hasar verdiği ve hücre ölüm nedenlerinden birinin bu peroksidasyon olduğu gösterilmiştir [31]. Fosfolipid peroksidasyonu hücre membranının lipid yapısının bütünlüğünün bozulmasına neden olmakta ve plazma membranının geçirgenliğinde artışa yol açmaktadır. Martin ve arkadaşları HUVE hücrelerinde 24 saat hipoksiyi takiben reoksijenasyonun 5. dakikasında hücre içi ROT'un anlamlı olarak arttığını göstermişlerdir [32]. Ancak hücre lizatlarında lipid peroksidasyonunun 24 saat hipoksiyi takiben reoksijenasyonun 2. saatinde arttığını saptamışlardır. Bu çalışmada trypan blue boyası ile hücre canlılığı araştırıldığında bu sürelerde hücre ölümünde bir artış saptamamışlardır. Sonuç olarak, bu çalışmada, HCMVE hücrelerinde I-R hasarının *in vitro* deney modelinin uygulaması hedeflere uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Altı saatlik hipoksi süresinde oksijen ile beraber glukozun da ortamdan çekilmesi, daha sonra 18-24 saat reoksijenasyon + glukoz uygulaması bu hücre tipinde sitotoksisiteyi anlamlı olarak artırmaktadır. Hücre içi reaktif oksijen türlerinin anlamlı artışı ise, 6 saatlik OGD uygulamasını takiben 60. dakikadaki reoksijenasyon süresinde ortaya çıkmaktadır. Bu hasar modelinin uygulamasının geliştirilmiş olması, bu hücreleri iskemi reperfüzyon hasarından korumak için geliştirilecek koruyucu ajanların deneysel uygulamalarında önemli bir basamak oluşturacak, koruyucu ajanların etkisi bu model ve süreler kullanılarak objektif olarak belirlenebilecektir.

Açıklama

Bu proje SBAG 104S513 proje numarasıyla TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda (ARLAB) gerçekleştirilmiştir.

Kaynaklar

- [1]. Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ. (2005) Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol* 100:179–190.
- [2]. Zhang DD, Hannink M. (2003) Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1- dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol Cell Biol* 23:8137–8151.
- [3]. Husted TL, Lentsch AB. (2005) Anti-inflammatory approaches to the prevention of ischemia/reperfusion injury in solid organ transplantation. *Curr Opin Invest Drugs* 6:508 – 512.
- [4]. Granger DN, Korthuis RJ. (1995) Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Ann Rev Physiol* 57:311-332.
- [5]. Li C, Jackson RM. (2002) Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C227-241.
- [6]. Sayin O, Arslan N, Güner G. (2008) Resveratrol and cardiovascular system. *Turk J Biochem* 33;117–121.
- [7]. Karimova A, Pinsky DJ. (2001) The endothelial response to oxygen deprivation: biology and clinical implications, *Intensive Care Med* 27:19-31.
- [8]. Dhar-Mascareño M, Cárcamo JM, Golde DW. (2005) Hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C. *Free Radic Biol Med* 38(10):1311 –1322.
- [9]. Therade-Matharan S, Laemmel E, Duranteau J, Vicaut E. (2004) Reoxygenation after hypoxia and glucose depletion causes reactive oxygen species production by mitochondria in HUVEC. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:1037-1043.
- [10]. Kabakov AE, Budagova KR, Maljutina YV, Latchman DS, Csermely P. (2004) Pharmacological attenuation of apoptosis in reoxygenated endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 61:3076–3086.
- [11]. Lee SR, Lo EH. (2003) Interactions between p38 mitogen-activated protein kinase and caspase-3 in cerebral endothelial cell death after hypoxia-reoxygenation. *Stroke* 34:2704-2709.
- [12]. Ogawa S, Clauss M, Kuwabara K, Shreeniwas R, Butura C, Koga S, Stern D. (1991) Hypoxia induces endothelial cell synthesis of membrane-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9897-9901.
- [13]. Xu J, He L, Ahmed H, Chen SW, Goldberg MP, Beckmen JS, Hsu CY. (2000) Oxygen-glucose deprivation induces inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in cerebral endothelial cells. *Stroke* 31:1744-1751.
- [14]. Cimarosti H, Siqueira IR, Zamin LL, Nassif M, Balk R, Frozza R, Dalmaz C, Netto CA, Salbego C. (2005) Neuroprotection and protein damage prevention by estradiol replacement in rat hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation. *Neurochem Res* 30:583-589.
- [15]. Malagelada C, Xifro X, Minano A, Sabria J, Alvarez JA. (2005) Contribution of caspase-mediated apoptosis to the cell death caused by oxygen-glucose deprivation in cortical cell cultures. *Neurobiol Dis* 20:27-37.
- [16]. Ouyang YB, Xu L, Giffard RG. (2005) Geldanamycin treatment reduces delayed CA I damage in mouse hippocampal organotypic cultures subjected to oxygen glucose deprivation. *Neurosci Lett* 380:229-233.
- [17]. Meissner M, Stein M, Urbich C, Reisinger K, Suske G, Staels B, Kaufmann R, Jens G. (2004) PPAR activators inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 expression by repressing Sp1 dependent DNA binding and transactivation. *Circ Res* 94:324-332.
- [18]. Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagona T. (2003) Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem* 278:3170–3175.
- [19]. Zhang Y, Park TS, Gidday JM. (2007) Hypoxic preconditioning protects human brain endothelium from ischemic apoptosis by Akt-dependent survivin activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H2573-2581.
- [20]. Bresgen N, Karlhuber G, Krizbai I, Bauer H, Bauer HC, Eckl PM. (2003) Oxidative stress in cultured cerebral endothelial cells induces chromosomal aberrations, micronuclei, and apoptosis. *J Neurosci Res* 72:327-333.
- [21]. Semenza GL. (2000) Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. *J Clin Invest* 106:809-812.
- [22]. Takeda K, Lin J, Okubo S, Akazawa-Kudoh S, Kajinami K, Kanemitsu S, Tsugawa H, Kanda T, Matsui S, Takekoshi N. (2004) Transient glucose deprivation causes upregulation of heme oxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression in cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 36(6):821-830.
- [23]. Singh G, Siddiqui MA, Khanna VK, Kashyap MP, Yadav S, Gupta YK, Pant KK, Pant AB. (2009) Oxygen glucose deprivation model of cerebral stroke in PC-12 cells: glucose as a limiting factor. *Toxicol Mech Methods* 19:154-160.
- [24]. Zweier JL, Kuppusamy P, Thompson-Gorman S, Klunk D and Lutty GA. (1994) Measurement and characterization of free radical generation in reoxygenated human endothelial cells. *Am J Physiol* 266:C700-C708.
- [25]. Ruchko MV, Gorodnya OM, Pastukh VM, Swiger BM, Middleton NS, Wilson GL, Gillespie MN. (2009) Hypoxia-induced oxidative base modifications in the VEGF hypoxia-response element are associated with transcriptionally active nucleosomes. *Free Radic Biol Med* 46(3):352-359.
- [26]. Cao Z, Gao W, Tao G, Fan Y, Liu F, Gao Y. (2009) Thirty-five percent oxygen pre-conditioning protects PC12 cells against death induced by hypoxia. *Free Radic Res* 43(1):58-67.
- [27]. Guo S, Bragina O, Xu Y, Cao Z, Chen H, Zhou B, Morgan M, Lin Y, Jiang BH, Liu KJ, Shi H. (2008) Glucose up-regulates HIF-1 alpha expression in primary cortical neurons in response to hypoxia through maintaining cellular redox status. *J Neurochem* 105:1849-1860.
- [28]. Borchi E, Parri M, Papucci L, Becatti M, Nassi N, Nassi P, Nediani C. (2009) Role of NADPH oxidase in H9c2 cardiac muscle cells exposed to simulated ischemia-reperfusion. *J Cell Mol Med* 13:2724-2735.
- [29]. Giacomo V, Rapino M, Miscia S, Giulio CD, Cataldi A. (2009) Dual role of HIF-1alpha in delivering a survival or death signal in hypoxia exposed human K562 erythroleukemia cells. *Cell Biol Int* 33:49-56.
- [30]. Millar TM, Phan V, Tibbles LA. (2007) ROS generation in endothelial hypoxia and reoxygenation stimulates MAP kinase signaling and kinase-dependent neutrophil recruitment. *Free Radic Biol Med* 42:1165–1177.
- [31]. Girotti AW. (1998) Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 39:1529–1542.
- [32]. Martin SF, Chartterjee S, Parinandi N, Alevriadou BR. (2005) Rac1 inhibition protects against hypoxia/reoxygenation-induced lipid peroxidation in human vascular endothelial cells. *Vasc Pharmacol* 43:148–156.