

# Hipoksi Sonrası Erken ve Geç Reoksijenasyon İnsan Umbilikal Vasküler Endotel Hücrelerini Oksidatif Stres Açısından Nasıl Etkiler?

[How Does Early and Late Reoxygenation Following Hypoxia Affect Human Umbilical Vascular Endothelial Cells in Respect to Oxidative Stress?]

Zekiye Sultan Altun<sup>1</sup>,  
Hüray İşlekel<sup>2</sup>,  
Oya Sayın<sup>3,4</sup>,  
Mehtap Yüksel Eğrilmez<sup>3,4</sup>,  
Şermin Genç<sup>3,4</sup>,  
Kürşat Genç<sup>4</sup>,  
Zahide Çavdar<sup>3,4</sup>,  
Gülgün Oktay<sup>2</sup>,  
Gül Güner<sup>2,3,4</sup>.

<sup>1</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, İzmir, Türkiye

<sup>2</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

<sup>3</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Araştırma Laboratuvarı, İzmir, Türkiye

<sup>4</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye

## Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

Uzm. Dr. Zekiye Sultan Altun

Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü  
35340, İnciraltı/İzmir, Türkiye  
e-mail: zekiye.altun@deu.edu.tr  
Tel: +90 232 4125801  
Fax: +90 232 2785895

Kayıt Tarihi : 20 Ekim 2009 ; Kabul Tarihi : 3 Haziran 2010

[Registered : 20 October 2009 ; Accepted : 3 June 2010]

## ÖZET

**Amaç:** Hipoksi ya da hipoksi-reoksijenasyon ile indüklenen vasküler hasar miyokard enfarktüsü, renal ve serebral iskemi gibi klinikopatolojik durumlarda önemli role sahiptir. Endotel hücreleri farklı uyarılar ile ortaya çıkan vasküler hasara karşı bariyer fonksiyonu oluşturabilir ya da bu süreçte rol oynayabilir. Bu çalışmanın amacı nitrik oksit (NO), nitrotirozin, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS), süperoksit dismutaz (SOD) ve malondialdehitin (MDA) hipoksi ve hipoksi-reoksijenasyondaki rollerinin insan vasküler endotel hücrelerinde *in vitro* olarak araştırılmasıdır.

**Yöntem:** İnsan umbilikal ven endotel hücreleri normoksi (4 saat), hipoksi (4 saat), erken hipoksi reoksijenasyon (4 saat hipoksi-4 saat reoksijenasyon) ve geç hipoksi reoksijenasyon (4 saat hipoksi-24 saat reoksijenasyon) koşullarına maruz bırakıldı. SOD ve eNOS aktiviteleri, MDA, NO ve nitrotirozin düzeyleri ölçüldü.

**Bulgular:** SOD aktiviteleri, hipoksiye göre karşılaştırıldığında erken reoksijenasyonda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösterirken, hipokside normoksiye göre azalma gözlemlendi. MDA düzeyleri erken ve geç reoksijenasyonda hipoksiye göre azalırken, hipokside normoksiye göre artış gözlemlendi. NO, nitrotirozin ve eNOS düzeyleri tüm gruplarda değişmedi.

**Sonuç:** Erken fazlardan itibaren başlayan reoksijenasyon insan umbilikal vasküler endotel hücrelerinde oksidatif strese neden olmakla birlikte hipoksi sonrası erken reoksijenasyon koşulları muhtemel lipid peroksidasyonundan koruyan antioksidan SOD enzim aktivitesinde geçici artışa yol açar.

**Anahtar Kelimeler:** Endotel hücreleri, hipoksi, erken reoksijenasyon, geç reoksijenasyon, oksidatif stres

## ABSTRACT

**Objectives:** Vascular damage induced by hypoxia or hypoxia-reoxygenation has a crucial role in various clinicopathological conditions such as myocardial infarction, renal and cerebral ischemia. Endothelial cells might have a barrier function to vascular damage triggered by diverse stimuli or might be involved in this process. The aim of this study was to evaluate the roles of nitric oxide (NO), nitrotyrosine, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in hypoxia and hypoxia-reoxygenation in human vascular endothelial cells *in-vitro*.

**Methods:** Human umbilical vein endothelial cells were subjected to normoxia (4 hours), hypoxia (4 hours), early (4 hours hypoxia-4 hours reoxygenation) or late hypoxia-reoxygenation (4 hours hypoxia-24 hours reoxygenation) conditions. SOD and eNOS activity, MDA, NO and nitrotyrosine levels were measured.

**Results:** SOD activities were decreased with hypoxia with respect to normoxia. In early reoxygenation however, SOD levels showed statistically significant increase when compared to hypoxia. As compared to hypoxia, MDA levels were decreased in early reoxygenation and late reoxygenation, although insignificant, raised MDA levels were observed in hypoxia compared to normoxia. NO, nitrotyrosine and eNOS levels were unchanged in all groups.

**Conclusion:** Reoxygenation, starting from early phases leads oxidative stress in human umbilical vascular endothelial cells, however, early reoxygenation conditions following hypoxia causes a transient enhancement in antioxidant SOD enzyme activity which probably protects from lipid peroxidation.

**Key words:** Endothelial cells, hypoxia, early reoxygenation, late reoxygenation, oxidative stress

## Giriş

Hipoksi ve hipoksi-reperfüzyonun indüklediği vasküler hasar miyokard enfarktüsü, renal iskemide ve serebral iskemide gibi birçok klinikopatolojik durumda önemli rol oynamaktadır [1]. Endotel hücreleri vasküler yapıdaki fonksiyonel üniteyi oluşturmaktadır. Vasküler endotel hipoksi-reperfüzyon sırasında süperoksit, hidrojen peroksit, peroksinitrit gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) birincil kaynağı olmasının yanı sıra, hasarın hedefini de oluşturmaktadır [2,3]. Bu nedenle endotel hücre davranışları vasküler disfonksiyonun anlaşılmasında büyük önem taşımaktadır [1].

*In vivo* hipoksi-reperfüzyonun hücre modellerinden olan endotel hücre kültürü hipoksi ve reoksijenasyon (H-R) modeli, ROS aracılı hücre disfonksiyonunun anlaşılması için en uygun araçlardan birisidir [1]. Süperoksit radikali lipid membran peroksidasyonuna, protein ve antioksidan enzim aktivitelerinde değişikliğe ve gen transkripsiyonuna neden olabilir. Ayrıca hızla nitrik oksit (NO) inaktive ederek endotel disfonksiyonuna ve daha toksik radikaller olan peroksinitrit ve hidroksil gibi radikallerin oluşumu aracılığı ile makromoleküllerin, membranların ve DNA'nın hasarlanmasına yol açabilir [2].

Memeli hücrelerinde NO, L-arjininden NO sentaz (NOS) enzim ailesi aracılığı ile oluşur. NOS ailesinin endotelial (eNOS), nöronal (nNOS) ve induklenebilir (iNOS) olmak üzere üç farklı izoformu tanımlanmıştır. eNOS ve nNOS izoformları değişik tip hücrelerde yapısal olarak ekspresyon edilir ve hücre içinde kalsiyum artışıyla birlikte kalmodulin bağımlı olarak aktive edilebilirler [4]. NO hücrelerde peroksinitrit aracılı lipid oksidasyon reaksiyonları oluşturması nedeniyle hem prooksidan ve hem de lipid radikal zincir oluşumuna engel olma kapasitesiyle çift yönlü etki gösteren bir moleküldür [2]. Nitrotirozin ise peroksinitrit ile proteinlerin tirozin rezidülerinin etkileşimiyle oluşabilmekte ve NO'nin potansiyel sitotoksik etkilerini değerlendirmede bir belirteç olarak kullanılabilir [5].

Süperoksit dismutaz (SOD) önemli hücre disfonksiyon enzimleri arasında yer alır ve etkin bir şekilde süperoksit radikalini hidrojen perokside çevirir [2] SOD hücre içi yerleşimi nedeniyle oksidatif strese karşı ilk kademe savunma hattı olarak yer almaktadır, bu nedenle vasküler SOD aktivitesi, ekspresyonu veya her ikisi de çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik durumlarda değişebilir [6]. Endotelde bulunan SOD ekstraselüler NO biyoaktivitesini düzenlemekle de ilişkilidir [2]. Hipoksi-reperfüzyon aracılı vasküler hasarın endotelial oksidan/antioksidan sistem üzerindeki etkileri bugüne dek değişik deney düzenekleri, hipoksi-reoksijenasyon süreleri ve hücre kültür ortamları kullanılarak çalışılmıştır [1, 4, 7]. Vasküler endotel hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada 24 saat hipoksi 2 saat reoksijenasyonun lipid peroksidasyonunu ve NADPH bağımlı süperoksit üretimini arttırdığı saptanmıştır [7]. Koruyucu olarak C vitamininin kullanıldığı ve 4 saat hipoksi, 18 saat reoksijenasyon sonucunda

insan umbilikal ven endotel (HUVE) hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelinin ve sitokrom c salınımının azaldığı gösterilmiştir [1]. Ancak erken ve geç reoksijenasyon etkilerini, oksidan ve antioksidan sistemdeki değişiklikleri aynı anda inceleyen az sayıda kapsamlı çalışma mevcuttur.

Bu çalışmada insan umbilikal ven endotel hücrelerinde uygulanan hipoksi sonrası 4. ve 24. saatlerde uygulanan erken ve geç reoksijenasyonun oksidan sistem üzerine etkileri nitrik oksit, nitrotirozin, endotelial nitrik oksit sentaz, lipid peroksidasyon ürünü malondialdehit ve antioksidan süperoksit dismutaz aracılığıyla incelenmiştir.

## Gereç ve Yöntem

### Hücre Kültürü

İnsan umbilikal ven endotel (HUVE) hücreleri dondurulmuş (kriyoprezerve) olarak 'Clonetics Corporation'dan (Cambrex) elde edildi. Hücreler %2 fetal bovin serum, insan rekombinant vasküler endotel büyüme faktörü, bFGF, insan epidermal büyüme faktörü (hEGF), insülin benzeri büyüme faktörü-I, hidrokortizon, askorbik asit, heparin, 1 µg/ml gentamisin ve 1 µg/ml amfoterisin B içeren endotel hücre büyüme ortamında (EBM-2) (Cambrex) her iki günde bir ortamları değiştirilerek 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> inkübatör koşullarında çoğaltıldı. Ekim yoğunluğu 5,000 hücre/cm<sup>2</sup> idi. Hücreler % 80 konfluent olduğunda tripsin EDTA kullanılarak toplandı ve 1/3 oranında pasajlandı. Tüm deneylerde hücreler 5-7. pasajdan olacak şekilde kullanıldı.

### Hipoksi-Reoksijenasyonun Uygulanması ve Deney Koşulları

Hücreler dört ayrı gruba ayrıldı (Tablo 1). Birinci grupta, normoksik hücreler olup standart inkübatör şartlarında (%5 CO<sub>2</sub> / %95 hava ile) 4 saat 37°C'de inkübe edildi. İkinci gruptaki hücreler özel bir hipoksi odacığına (Modular Incubator Chamber MIC-101, Billups-Rothenberg, USA) yerleştirildi [1]. Hipoksiyi oluşturmak için bu kez %95 CO<sub>2</sub> ve %5 N<sub>2</sub> gaz karışımı hipoksi odacığının gaz girişinden verildi. Bu sırada hipoksi odacığından çıkan havanın O<sub>2</sub> miktarı oksimetre (Oxygen Analyser, Billups-Rothenberg, USA) ile ölçüldü. Oksimetre ile ölçülen gazın O<sub>2</sub> miktarı %1'in altına düştükten sonra 5 dakika daha gaz karışımı verilmeye devam edildi. 5 dakika sonunda hipoksi odacığının giriş ve çıkış borusu aynı anda kilitlendi. Hipoksi odacığına yerleştirilen hücreler de 4 saat 37°C'de inkübe edildi. Böylece hipoksi (4sH) grubu oluşturuldu. Üçüncü gruptaki hücreler 4 saat hipoksi sonrasında hipoksi odacığından çıkarılarak, standart inkübatör şartlarında (%5 CO<sub>2</sub> / %95 hava) 4 saat reoksijenasyona maruz bırakıldı. Böylece kısa süreli reoksijenasyon (4sH-4sR) koşulları oluşturuldu. Dördüncü grup hücreler ise 4 saat hipoksi sonrasında hipoksi odacığından çıkarılarak uzun süreli reoksijenasyon (4sH-24sR) koşullarını oluşturmak üzere bu kez 24 saat reoksijenasyona (%5 CO<sub>2</sub> / %95 hava) maruz bırakıldı. Tüm gruplardan gerekli inkübasyon süreleri so-

**Tablo 1.** Deney koşullarını oluşturan gruplar (n=6)

Gruplar	Süreler	
I. Normoksi	4 saat Normoksi	
II. Hipoksi (4sH)	4 saat Hipoksi	
III. Erken reoksijenasyon (4sH- 4sR)	4 saat Hipoksi -	4 saat Normoksi
IV. Geç reoksijenasyon (4sH- 24sR)	4 saat Hipoksi	24 saat Normoksi

nunda süpernatantları ve hücre lizatları yapılacak analizlere uygun olarak toplandı.

### SOD Aktivite Ölçümü

SOD aktivitesi “SOD activity assay kit” (R&D) [8] kullanılarak spektrofotometrik yöntemle 560 nm’de ölçüldü. Daha sonra SOD aktiviteleri total hücresel proteine oranlanarak U/mg protein olarak ifade edildi.

### Lipid Peroksidasyonun Ölçümü

Hücre lizatlarında lipid peroksidasyon oluşumu, tiyobarbitürik asit reaktif ürünlerin oluşumunun ölçümüne dayalı yöntemle yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) (CTO-10AS VP, Shimadzu) cihazı kullanılarak çalışıldı [9]. Hazırlanan örnekler C18 kolona (Macherey-Nagel, Duren, Germany) uygulandı. Her bir örneğin absorbansı floresan detektörde  $\lambda^{ex}=515$  nm and  $\lambda^{em}=553$  nm olacak şekilde HPLC cihazı (CTO-10AS VP, Shimadzu) kullanılarak ölçüldü. Tüm ölçümler örneklerin protein içeriklerine oranlanarak  $\mu\text{mol/mg}$  protein olarak ifade edildi.

eNOS düzeyleri hücre lizatlarında R&D “Human eNOS immunoassay” ELISA kiti kullanılarak çalışıldı. Absorbanslar 450 nm’de mikropalak okuyucuda (Synergy HT, BioTek Instrument Inc, Winooski, USA) ölçüldü. Bilinen konsantrasyonlarla elde edilmiş standart grafiğine göre konsantrasyonlar hesaplandı. Sonuçlar protein değerlerine oranlanarak eNOS pg/mg protein olarak ifade edildi.

Nitrotirozin hücre lizatlarında enzim immunoassay yöntemi kiti (Oxis) ile çalışıldı. Absorbanslar multiplak okuyucuda 450 nm’de ölçüldü. Sonuçlar protein içeriklerine oranlanarak  $\mu\text{mol/mg}$  protein olarak ifade edildi.

Nitrik oksit, hücre süpernatantlarında nitratın kadmiyum granülleri ile non-enzimatik olarak nitrite indirgenmesinin ardından, total nitritin Greiss reaktifi ile reaksiyonunun kolorimetrik olarak ölçülmesi ile belirlendi [10].

### Protein Ölçümü

Örneklerin protein konsantrasyonu biçinkonik asit (BCA) protein kiti (Sigma, Germany) kullanılarak ölçüldü [11]. Standart olarak sığır serum albümini kullanıldı.

### İstatistiksel Analiz

Araştırma sonuçlarının istatistik analizi, SPSS için Windows istatistik programının 11.0 versiyonu kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde belirtildi. Diğer testlerdeki sürekli değişkenler non parametrik Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. Tüm de-

neyler en az 3 kez tekrarlandı.  $p<0.05$  ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

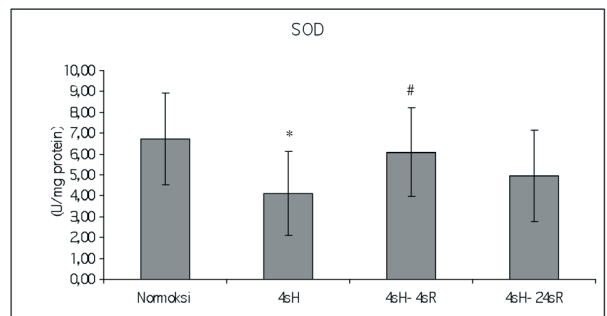
### Bulgular

4sH grubunda SOD aktiviteleri normoksi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldı ( $p=0.025$ ). 4sH-4sR grubunda 4sH grubuna göre SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış saptandı ( $p=0.025$ ) (Şekil 1) (Tablo 2).

Malondialdehit (MDA) düzeyleri normoksi grubuna göre 4 saat hipoksi grubunda artış gösterdi ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. MDA düzeyleri 4sH-4sR ve 4sH-24sR gruplarında 4sH grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma gösterdi ( $p=0.021$ ,  $p=0.014$ ) (Şekil 2) (Tablo 2). Gruplar arasında eNOS aktivitesi açısından fark saptanmadı (Tablo 2).

Nitrik oksit konsantrasyonu 4sH, 4sH-4sR ve 4sH-24sR grubunda normoksi grubuna karşı artış gösterdi ( $p=0.197$ ,  $p=0.039$ ,  $p=0.039$ ). 4sH-4sR ve 4sH-24sR grubunun NO düzeyleri 4sH grubuna göre artış gösterdi ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. 4sH-24sR grubunun NO düzeyleri 4sH-4sR grubuna göre hafif azalma gösterdi ancak fark istatistiksel olarak anlamsızdı (Tablo 2).

Nitrotirozin değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi. 4sH ve 4sH-4sR grubunda normoksi grubu ile karşılaştırıldığında artış gözlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. 4sH-4sR ve 4sH-24sR grubunun nitrotirozin değerleri 4sH grubuna göre azalma gösterdi ancak istatistiksel anlamlı değildi (Tablo 2).



**Şekil 2.** HUVE hücrelerinde deney gruplarında SOD aktivitelerinin gösterilmesi. Her bir bar en az 3 bağımsız deneyin ortalama  $\pm$  standart sapma değerlerini ifade etmektedir (n=6).

\* $p<0.05$  normoksi grubuna göre karşılaştırıldığında,

# $p<0.05$  4 saat hipoksi grubuna göre karşılaştırıldığında.

**Tablo 2.** Deney gruplarında analiz edilen parametreler

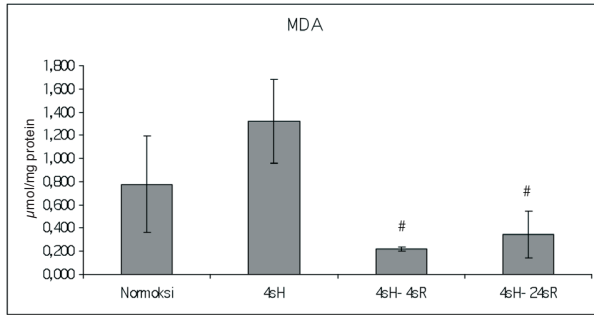
Parametreler	Gruplar (n=6)			
	Normoksi	4sH	4sH-4sR	4sH-24sR
MDA ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	0.777 $\pm$ 0.42	1.322 $\pm$ 0.36 <sup>b,c</sup>	0.214 $\pm$ 0.02	0.346 $\pm$ 0.2
Nitrik Oksit ( $\mu\text{mol}$ )	2.1 $\pm$ 1.30	3.76 $\pm$ 1.48	5.56 $\pm$ 3.07 <sup>a</sup>	3.99 $\pm$ 2.14 <sup>a</sup>
Nitrotirozin ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	1.222 $\pm$ 0.326	1.262 $\pm$ 0.419	1.409 $\pm$ 0.582	1.151 $\pm$ 0.271
Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz (U/mg protein)	3735 $\pm$ 834	3386 $\pm$ 565	3372 $\pm$ 534	3651 $\pm$ 667
Süperoksit Dismutaz (U/mg protein)	6.73 $\pm$ 2.2	4.13 $\pm$ 2.0 <sup>ab</sup>	6.08 $\pm$ 2.1	4.96 $\pm$ 2.2

Değerler ortalama ve standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. Normoksi, 4sH; 4 saat hipoksi, 4sH-4sR; 4 saat hipoksi-4 saat reoksijenasyon, 4sH-24sR; 4 saat hipoksi-24 saat reoksijenasyon gruplarını ifade etmektedir.

a-  $p < 0.05$  normoksi grubu ile karşılaştırdığında,

b-  $p < 0.05$  4sH- 4sR grubu ile karşılaştırdığında,

c-  $p < 0.05$  4sH- 24sR grubu ile karşılaştırdığında.



**Şekil 2.** HUVE hücrelerinde deney gruplarında MDA düzeylerinin gösterilmesi. Her bir bar en az 3 bağımsız deneyin ortalama  $\pm$  standart sapma değerlerini ifade etmektedir (n=6).

#  $p < 0.05$  4 saat hipoksi grubuna göre karşılaştırıldığında.

## Tartışma

Literatürde endotel hücrelerinde hipoksi sonrası reoksijenasyonun erken ve geç dönemde antioksidan SOD, nitrik oksit sistemi ve lipid peroksidasyonu üzerindeki etkilerinin ayrı ayrı değerlendirildiği çeşitli çalışmalar bulunmakla birlikte [7, 12], erken ve geç reoksijenasyonda oksidan ve antioksidan sistemin bir arada değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Fizyolojik koşullarda reaktif oksijen ürün miktarı yani  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve  $\text{OH}$ , ksantin oksidaz gibi ROS oluşturan enzimler ile SOD ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi ROS'u yakalayan enzimler arasındaki düzenleyici denge ile göreceli stabil düzeylerde tutulmaktadır [13]. Anoksi reoksijenasyon gibi patolojik durumlarda ROS oluşumu artmaktadır. ROS birikimi lipid peroksidasyonu ile oksidatif stres belirteçi olan MDA aşırı üretimi ve SOD ve GPx'in tüketilmesi ile azalmasına yol açabilmektedir [13]. SOD ve GPx ROS'nin detoksifikasyonunda anahtar rol almaktadır. Bu nedenle bu çalışmada hipoksi reoksijenasyona maruz kalan HUVE hücrelerinde ROS yakalayıcısı olarak SOD'ı ve lipid peroksidasyon hasarını değerlendirmek için MDA'yi belirledik. Bu ça-

lışmada endotel hücrelerine sadece hipoksi uygulanması reoksijenasyona göre belirgin lipid peroksidasyon hasarına yol açmıştır. Endotel hücrelerinde değişik hipoksi ve reoksijenasyon süreleri ile farklı oksidatif stres yanıtlarının meydana geldiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Martin ve ark. [7] 24 saat hipoksi ardından 2 saat reoksijenasyon koşullarında lipid peroksidasyonunda artışa rastlamışlardır. Bir başka çalışmada endotel hücrelerinde 1.5 saat anoksiyi izleyen 5 saat reoksijenasyonda MDA düzeyleri artmış, SOD ve NO konsantrasyonu azalmıştır [14]. Bizim çalışmamızda, hipoksi koşuluna kıyasla, erken ve geç reoksijenasyonda MDA düzeylerinin azalması, hipoksi sonrası erken reoksijenasyon döneminde artan SOD aktivitesine bağlı olarak antioksidan kapasitenin güçlenmesi sonucunda lipid radikal zincir reaksiyonlarının kısmen önlenmesi ile açıklanabilir. Reoksijenasyonda SOD aktivite artışı bu dönemde artan serbest radikallerin SOD enziminin aktivitesini uyarması sonucu ortaya çıkmış olabilir. Önceki çalışmamızda, benzer deney düzeneğinde iskemi reperfüzyon sürecinde özellikle iskemi sonrası reoksijenasyon sırasında ROS üretiminin meydana geldiği, ayrıca reperfüzyonda artan ROS düzeylerinin, antioksidan bir enzim olan glutatyon peroksidaz aktivite artışına yol açabildiği gösterilmiştir (yayınlanmamış veri). Bizim ve diğer çalışmaların değişik yöndeki sonuçları deney düzeneklerindeki ve reoksijenasyon sürelerindeki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir.

Literatürde endotel hücrelerinin hipoksi reoksijenasyonu NO sistemi açısından değerlendirildiğinde, NO sistemi ile ilgili farklı bulgulara rastlanmaktadır. Li ve ark.[14] endotel hücrelerinde 1.5 saat anoksiyi izleyen 5 saat reoksijenasyonda MDA düzeylerini artmış, SOD ve NO konsantrasyonunu azalmış olarak bulmuşlardır. Farklı bir çalışmada ise ECV340 endotel hücrelerinin kısa süreli reoksijenasyonu ile (30 dk hipoksi 30 dk reoksijenasyon) NO ve eNOS ekspresyon artışı saptanmıştır [15]. HUVE hücrelerine 8 saatlik hipoksi uygulama-

sı sonrasında eNOS protein ekspresyonu ve beraberinde NO artışı saptanmıştır. Bizim çalışmamızda hipoksi, kısa ve uzun süreli reoksijenasyonda eNOS, nitrotirozin ve NO düzeyleri açısından gruplar arasında belirgin farklar gözlenmesi de, zamana bağımlı olarak bu parametrelerin paralel değişimleri birbirlerini destekler niteliktedir. NO yüksek miktarda üretildiğinde süperoksit radikali ile reaksiyona girerek peroksinitrite dönüşmekte ve hücre hasarında önemli rol oynamaktadır [16]. Peroksinitrit ise proteinlerle reaksiyona girerek protein rezidülerini okside etmektedir. Nitrotirozin oluşumu peroksinitrit aracılı protein modifikasyonunu temsil eder ve diğer ROS aracılı modifikasyonlardan farklıdır. HUVE hücrelerinde yapılan bir çalışmada 3 saatlik anoksi ve 2 saatlik reoksijenasyon sonrasında endotelin konsantrasyonunda artma ve NO konsantrasyonunun azalması ile endotel hücrelerinin vazokonstriktif ve vazodilatör fonksiyonu düzenleyerek endotel hücre disfonksiyonuna ve hasarına yol açtığı öne sürülmüştür [13]. Çalışmamızda NO'nun ve nitrotirozin miktarının hipoksi döneminden başlayarak reoksijenasyonda giderek artması hipoksi reoksijenasyon hasarında NO sisteminin endotel hücre disfonksiyonunda rol oynadığını göstermektedir.

Sonuç olarak, insan umbilikal ven endotel hücrelerinde oksidan stres hipoksi ile birlikte başlamakta, erken reoksijenasyonda olasılıkla antioksidan enzim SOD aktivitesinin artmasına bağlı olarak lipid peroksidasyonu kısmen önlenmektedir. Bu bulgular insan vasküler endotel hücrelerinde hipoksiyi takiben özellikle erken reoksijenasyon fazında oksidatif stresin ve antioksidan cevabın belirginleştiğini önermektedir.

## Teşekkür

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Başkanlığı tarafından finansal olarak desteklenmiştir (DEU proje no: KB.SAG.060). Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Lipid peroksidasyon ölçümleri sırasında HPLC cihazında verdiği teknik destekten ötürü Dr. Memduh Bülbül'e teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

- [1] 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.* 38:1311-22.
- [2] Li JM, Shah AM. (2004) Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 287:R1014-30.
- [3] Fraile ML, Conde MV, Sanz L, Moreno MJ, Marco EJ, Lopez de Pablo AL. (1994) Different influence of superoxide anions and hydrogen peroxide on endothelial function of isolated cat cerebral and pulmonary arteries. *Gen Pharmacol.* 25:1197-205.
- [4] Polyarchou C, Papadimitriou E. (2005) Antioxidants inhibit human endothelial cell functions through down-regulation of endothelial nitric oxide synthase activity. *Eur J Pharmacol.* 510:31-8.
- [5] Alonso D, Serrano J, Rodriguez I, Ruiz-Cabello J, Fernandez AP, Encinas JM, Castro-Blanco S, Bentura ML, Santacana M, Richart A, Fernandez-Vizarrá P, Uttenthal LO, Rodrigo J. (2002) Effects of oxygen and glucose deprivation on the expression and distribution of neuronal and inducible nitric oxide synthases and on protein nitration in rat cerebral cortex. *J Comp Neurol.* 443:183-200.
- [6] Faraci FM, Didion SP. (2004) Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:1367-73.
- [7] Martin SF, Chatterjee S, Parinandi N, Alevriadou BR. (2005) Rac1 inhibition protects against hypoxia/reoxygenation-induced lipid peroxidation in human vascular endothelial cells. *Vascul Pharmacol.* 43:148-156.
- [8] Zhao Y, Kiningham KK, Lin SM, St Clair DK. (2001) Overexpression of MnSOD protects murine fibrosarcoma cells (FSa-II) from apoptosis and promotes a differentiation program upon treatment with 5-azacytidine: involvement of MAPK and NFkappaB pathways. *Antioxid Redox Signal.* 3:375-86.
- [9] Lykkesfeldt, J. (2001) Determination of malondialdehyde as thiobarbituric acid adduct in biological samples by HPLC with fluorescence detection: comparison with ultraviolet-visible spectrophotometry. *Clin Chem.* 47:1725-1727.
- [10] Schmidt W, Wolf G, Calka J, Schmidt HH. (1995) Evidence for bidirectional changes in nitric oxide synthase activity in the rat striatum after excitotoxically (quinolinic acid) induced degeneration. *Neuroscience.* 67:345-56.
- [11] Wiechelmann KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. (1988) Investigation of bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem.* 175:231-237.
- [12] Granger DN. (1999) Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation.* 6:167-78.
- [13] Yin J, Luo XG, Yu WJ, Liao JY, Shen YJ, Zhang ZW. (2010) Antisense oligodeoxynucleotide against tissue factor inhibits human umbilical vein endothelial cells injury induced by anoxia-reoxygenation. *Cell Physiol Biochem.* 25:477-90.
- [14] Li S, Jiang H, Li Y, Wu D, Zhang L, Zhang L, Cheng J. (2002) A study on the protective mechanism of yisheng injection against the anoxia-reoxygenation injury to endothelial cells. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 33:215-9.
- [15] Luo WB, Dong L, Wang YP. (2002) Effect of magnesium lithospermate B on calcium and nitric oxide in endothelial cells upon hypoxia/reoxygenation. *Acta Pharmacol Sin.* 23:930-6.
- [16] Xu J, He L, Ahmed SH, Chen SW, Goldberg MP, Beckman JS, Hsu CY. (2000) Oxygen-glucose deprivation induces inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in cerebral endothelial cells. *Stroke.* 31:1744-51.