T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RESVERATROLÜN HİPOKSİ-REOKSİJENASYON İLE İNDÜKLENEN *IN VITRO* ENDOTEL HÜCRESİ HASARINA ETKİSİNİN VE Nrf2'NİN OLASI ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

NUR ARSLAN

TIBBİ BİYOKİMYA

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2012

Tez kodu: DEU.HSI.PhD-2005970002

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RESVERATROLÜN HİPOKSİ-REOKSİJENASYON İLE İNDÜKLENEN *IN VITRO* ENDOTEL HÜCRESİ HASARINA ETKİSİNİN VE Nrf2'NİN OLASI ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

TIBBİ BİYOKİMYA

DOKTORA TEZİ

NUR ARSLAN

Danışman öğretim üyesi: Prof. Dr. GÜL GÜNER AKDOĞAN

Bu araştırma SBAG 104S513 proje numarasıyla TUBİTAK ve 2006.KB.SAG.040 proje numarasıyla DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir

Tez kodu: DEU.HSI.PhD-2005970002

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen ve pozitif enerjisi ile beni her konuda motive eden tez danışmanım Prof. Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN'a, tez izleme aşamalarında öneri ve katkıları ile tez çalışmalarımı destekleyen tez izleme komitesindeki değerli hocalarım Prof. Dr. Halil Resmi ve Prof. Dr. Kürşad Genç'e,

Eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini aktaran Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yol gösteren ve benim pratik ve teorik eğitimime katkıda bulunan ARLAB üyeleri ve proje arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca beni her konuda destekleyen aileme ve doktora eğitimim sırasında doğan ve büyüyen, yaşam kaynağım biricik oğlum Levent'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nur ARSLAN

İzmir, 2011

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tıbbi Biyokimya doktora öğrencisi Nur ARSLAN **"RESVERATROLÜN HİPOKSİ-REOKSİJENASYON İLE İNDÜKLENEN *IN VITRO* ENDOTEL HÜCRESİ HASARINA ETKİSİNİN VE Nrf2'NİN OLASI ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI"** isimli doktora tezini 11.01.2012 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

BAŞKAN
Prof. Dr. Gül Güner Akdoğan
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

ÜYE
Prof. Dr. Taner Onat
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

ÜYE
Prof. Dr. Canan Çoker
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

ÜYE
Prof. Dr. Kemal Kürşad Genç
Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Sinirbilimler Anabilim Dalı

ÜYE
Prof. Dr. Halil Resmi
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

Başlık **Sayfa no**

İÇİNDEKİLER i
TABLO DİZİNİ iii
ŞEKİL DİZİNİ iv
KISALTMALAR vi
ÖZET 1
ABSTRACT 3

1. GİRİŞ VE AMAÇ 5
2. GENEL BİLGİLER 7
2.1. İskemi-Reperfüzyon Hasarı 7
2.2. "Hypoxia Inducible Factor-1α" (HIF-1α) 8
2.2.1. Hipoksi ve uyardığı sinyal yolakları 8
2.2.2. HIF yapısı 9
2.2.3. Oksijen konsantrasyonu ve HIF 10
2.3. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri 11
2.3.1. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu 11
2.3.2. ROS: etkilediği sinyal yolakları ve hastalıklarla ilişkisi 12
2.3.3.Antioksidan sistem 15
2.4. Nrf2 / Keap-1 / ARE Sinyal Yolağı 17
2.4.1. Nrf2 / Keap-1 / ARE yapısal özellikleri 17
2.4.2. Keap-1/Nrf2 etkileşimi 20
2.4.3. Nrf2/ARE sinyal yolağının aktivasyonu 21
2.4.4. Nrf2/ARE sinyal yolağı tarafından aktive / inhibe edilen genler 23
2.4.5. Hastalıklar ve Nrf2 25
2.4.6. Hipoksi reoksijenasyon hasarı, oksidatif stres ve Nrf2 26
2.5. Resveratrol 28
2.5.1. Yapısal özellikleri 28
2.5.2. Kaynakları 29
2.5.3. Diyetle alınan resveratrolün vücuttaki metabolizması 29
2.5.4. Etkilediği sinyal ileti yolları ve hastalıklar üzerine etkileri 35

3. GEREÇ VE YÖNTEM 39

3.1. Araştırmanın tipi 39

3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı 39

3.3. Araştırmanın evreni ve örneklemi/çalışma grupları 39

3.4. Çalışma materyali 40

3.5. Araştırmanın değişkenleri 40

3.6. Veri toplama araçları 41

3.6.1. Hücrelerin çözülmesi 41

3.6.2. Hücre sayımı ve tripan mavisi canlılık testi 42

3.6.3. Hücrelerin pasajlanması 43

3.6.4. Deneysel çalışmalar 44

3.7. Araştırma planı ve takvimi 59

3.8. Verilerin değerlendirilmesi 59

3.9. Araştırmanın sınırlılıkları 60

3. 10. Etik Kurul onayı 60

4. BULGULAR 61

5. TARTIŞMA 68

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 81

7. KAYNAKLAR 83

8. EKLER 103

TABLO DİZİNİ

Başlık	**Sayfa no**
Tablo 1. "Hypoxia inducible factor" (HIF) hedef genleri	8
Tablo 2. ARE bölgesine bağlanan Nrf2 indükleyici gruplar ve etki mekanizmaları	22
Tablo 3. Nrf-2/ARE sinyal yolağı tarafından aktive edilen genler	24
Tablo 4. Resveratrol tarafından aktive veya inhibe edilen sinyal yolakları	37
Tablo 5. Resveratrolün reaktif oksijen türlerinin oluşumu üzerine etkisinin değerlendirildiği deney koşulları	48
Tablo 6. HCMVE hücrelerinde OGD uygulamasının HIF-1α indüksiyonu üzerine etkisinin değerlendirildiği deney koşulları	50
Tablo 7. Biovision hücre lizatı hazırlama kitinin içeriği	51
Tablo 8. Ayırıcı jelin (%7.5) hazırlanması	54
Tablo 9. Paketleyici jelin (%4) hazırlanması	55
Tablo 10. Resveratrolün Nrf2 ekspresyonu üzerine etkisinin araştırıldığı deney koşulları	59
Tablo 11. Farklı süreler boyunca oksijen glukoz deprivasyonu uygulanan koşulların hücre lizatlarının ortalama protein düzeyleri	61
Tablo 12. HCMVE hücrelerinde OGD + RGE uygulaması ile ölçülen reaktif oksijen türleri değerleri	63
Tablo 13. HCMVE hücrelerinde OGD + RGE uygulaması ile reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve resveratrolün koruyucu etkisi	64
Tablo 14. Farklı süreler boyunca resveratrol (10 μM) ile inkube edilen koşulların hücre lizatlarının ortalama protein düzeyleri	66

ŞEKİL DİZİNİ

Başlık	Sayfa no
Şekil 1. HIF-1α yapısı.	9
Şekil 2. HIF-1α'nın aktivasyonu ve inhibisyonu.	10
Şekil 3. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu	12
Şekil 4. Hidrojen peroksit metabolizması ve antioksidan enzimler	16
Şekil 5. Nrf2 molekülünün yapısı.	18
Şekil 6. a) Keap-1 molekülü. **b)** Keap-1'de yer alan sistein rezidüleri	19
Şekil 7. Nrf 2 ve Keap-1 interaksiyonu mekanizması	21
Şekil 8. Resveratrolün *trans* ve *cis*-izomerlerinin yapısı	28
Şekil 9. Ağızdan alınan resveratrolün vücuttaki dağılımı ve atılması	30
Şekil 10. Resveratrolün hücre içine alınması, hücre yüzeyi ve hücre içindeki reseptörlerine bağlanması	31
Şekil 11. Resveratrol ve konjugatlarının hücre dışına çıkarılması	33
Şekil 12. Çalışmamızda oluşturulan deney grupları	39
Şekil 13. HCMVE hücrelerinin faz-kontrast mikroskobik görüntüsü	43
Şekil 14. Hipoksi-reoksijenasyon modelinin reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu üzerine etkisinin incelendiği deney akış çizelgesi	46
Şekil 15. Resveratrolün OGD + RGE modelinde reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu üzerine etkisinin incelendiği deney akış çizelgesi	49
Şekil 16. HIF-1α ve Nrf2 protein ekspresyonlarının Western blot yöntemi ile değerlendirilmesi akış şeması	51
Şekil 17. HIF-1α ve Nrf2 protein ekspresyonlarının gösterilmesinde kullanılan Western blot yönteminin uygulama basamakları	58
Şekil 18. HIF-1α protein ekspresyonlarının gösterilmesinde kullanılan koşulların protein miktarlarının hesaplandığı BSA standart kalibrasyon eğrisi	61
Şekil 19. Hipoksi ile indüklenen HIF-1α transkripsiyon faktörü ekspresyonu	62
Şekil 20. Oksijen glukoz deprivasyonu uygulamasının HCMVE hücrelerinde reaktif oksijen türleri oluşumu üzerine etkisinin grafikle gösterilmesi	63
Şekil 21. HCMVE hücrelerinde OGD hasarında ROS oluşumu ve RSV'nin koruyucu etkisinin grafikle gösterilmesi.	65
Şekil 22. Nrf2 protein ekspresyonlarının gösterilmesinde kullanılan koşulların protein miktarlarının hesaplandığı BSA standart kalibrasyon eğrisi	66

Şekil 23. RSV uygulamasını takip eden farklı saatlerde elde edilen sitoplazmik örneklerde Nrf2 protein ekspresyonu 67

Şekil 24. Kontrol grubu ve farklı sürelerde 10 μM resveratrol ile muamele edilen grupların Nrf2 Western blot spotlarının dansitometrik analizi. 67

KISALTMALAR

Ahr	"Aryl hydrocarbon receptor" (Aril hidrokarbon reseptör)
APF	3'- (p-aminofenil) floresin
ARE	"Antioxidant response element" (Antioksidan yanıt elemanı)
CNC	Cap'n'Collar ailesi
DGR	"Double glycine repeat" (Çift glisin tekrarı)
EpRE	"Electrophile response element" (Elektrofil yanıt elemanı)
HIF-1α	"Hypoxia inducible factor" (Hipoksi ile indüklenebilir faktör)
HPF	3'- (p-hidroksifenil) floresin
H-R	Hipoksi reoksijenasyon
HRE	"Hypoxia response element" (Hipoksi yanıt elemanı)
I-R	İskemi reperfüzyon
IVR	"Intervening region" (Ara bölge)
Keap-1	"Kelch-like ECH associated protein 1" (Kelch benzeri ECH ilişkili protein)
Maf	"Musculoaponeurotic fibrosarcoma"
MMP	Matriks metalloproteinaz
OGD	Oksijen glukoz deprivasyonu
Neh	"Nrf2-ECH homology" (Nrf2-ECH homolojisi)
NF κB	"Nuclear factor kappa B" (Nukleer faktör kappa B)
NF-E2	"Nuclear transcription factor erythroid 2p45"
Nrf2	"NF-E2-related factor 2" (NF-E2 ilişkili faktör)
RGE	Reoksijenasyon + glukoz eklenmesi
ROS	"Reactive oxygen species" (Reaktif oksijen türleri)
RSV	Resveratrol
Sirt 1	Sirtuin 1

RESVERATROL'ÜN HİPOKSİ-REOKSİJENASYON İLE İNDÜKLENEN *IN VITRO* ENDOTEL HÜCRESİ HASARINA ETKİSİNİN ve Nrf2'NİN OLASI ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Nur ARSLAN, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
35340, İnciraltı, İzmir

ÖZET

Giriş ve amaç: Merkezi sinir sisteminin iskemik hastalıklarında parankimde olduğu gibi endotel hücresinde de çok sayıda biyokimyasal ve fonksiyonel değişiklikler ortaya çıkar. Bu araştırmanın temel amacı, resveratrolün insan serebral mikrovasküler endotel (HCMVE) hücrelerini *in vitro* ortamda oksidatif hasara karşı koruyup korumadığını incelemek ve resveratrol endotel hücrelerini koruyorsa, bu etkinin Nrf2 (Nuclear transcription factor erythroid 2p45-related factor 2) yolu ile mi olduğunu araştırmaktır. Araştırmada denenen ve kullanılan iskemi reperfüzyonun *in vitro* modeli, oksijen glukoz deprivasyonu ve reoksijenasyon + ortama glukoz eklenmesi (OGD + RGE) uygulamasıdır.

Gereç ve yöntem: HCMVE hücrelerine OGD (6 saat) + RGE (15, 60 dakika ve 24 saat) uygulaması yapıldı ve bu süreler sonunda reaktif oksijen türleri APF (3'- (p-aminofenil) floresin) ve HPF (3'- (p-hidroksifenil) floresin) floresan probları ile değerlendirildi. Resveratrolün reaktif oksijen türleri oluşumu üzerine etkilerini araştırmak üzere hücrelere farklı dozlarda resveratrol (0.1, 1, 10, 50 ve 100 μM) ile 1 saat pre-inkubasyon uygulandı. Resveratrolün Nrf2 aktivasyonu üzerine olan etkisini değerlendirmek için hücreler 10 μM resveratrol ile 1, 3, 6, 9 ve 24 saat sürelerle inkube edildi.

Bulgular: HCMVE hücrelerinde 6 saat OGD uygulamasını izleyen RGE'nin 60. dakikasında APF ve HPF problarıyla ayrı ayrı ölçümlenen reaktif oksijen türlerinin anlamlı olarak arttığı gözlendi (sırasıyla p değerleri: 0.004 ve 0.016). Resverarolün kullanılan tüm dozlarının 6 saat OGD uygulamasını izleyen RGE'nin 60. dakikasında reaktif oksijen türleri üretimini anlamlı olarak azalttığı saptandı (p: 0.004). Ayrıca, resveratrolün HCMVE hücrelerinde birinci saatte sitoplazmada Nrf2 ekspresyonunu artırdığı, 3. saatten itibaren bandın azalarak 9. saatten itibaren kaybolduğu saptandı.

Sonuçlar: Bu çalışmada OGD + RGE uygulanan HCMVE hücrelerinde resveratrolün, incelenen koşullarda, reaktif oksijen türleri oluşumunu azalttığı saptanmıştır. Ayrıca, resveratrolün HCMVE hücrelerinde Nrf2 protein ekspresyonunu da, incelenen koşullarda artırdığı, literatürde ilk kez gösterilmiştir.

Anahtar sözcükler: Oksijen glukoz deprivasyonu, insan serebral mikrovasküler endotel hücresi, reaktif oksijen türleri, Nrf2, resveratrol

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF RESVERATROL ON *IN VITRO* ENDOTHELIAL CELL INJURY INDUCED BY HYPOXIA AND REOXYGENATION AND OF THE POSSIBLE ROLE OF Nrf2

Nur ARSLAN

Dokuz Eylül University, Health Sciences Institute, 35340, Inciraltı, İzmir

SUMMARY

Introduction and aim of study: The ischemic diseases of the central nervous system witness several biochemical and functional changes in the endothelial cells as well as in the parenchyma. The aim of this investigation is to investigate whether resveratrol protects human cerebral microvascular endothelial cells (HCMVE) against oxidative injury exerted by an *in vitro* model of ischemia-reperfusion: "oxygen- glucose deprivation (OGD) and reoxygenation + glucose supplementation (RGS)" and in case of positivity, to study further if this effect is mediated by Nrf2 (Nuclear transcription factor erythroid 2p45-related factor 2)

Materials and methods: HCMVE cells were submitted to OGD (6 hours) + RGS (15, 60 min and 24 hr) and at the end of the incubation periods, the reactive oxygen species were assessed using the fluorescent probes, APF (3'- (p-aminophenyl) florescein) and HPF (3'- (p-hydroxyphenyl) florescein). The effects of resveratrol on the formation of reactive oxygen species were investigated by pre-incubation for one hour with different doses of resveratrol (0.1, 1, 10, 50 ve 100 μM). In order to assess the effect of resveratrol on Nrf2 activation, cells were incubated for different periods (1, 3, 6, 9, and 24 hours) with 10 μM resveratrol.

Results: The analysis with APF and HPF probes showed statistically significant increases in the 60-min RGE (p= 0.004 and 0.016, respectively), following the 6-hour OGD application to the HCMVE cells. At the 60th minute of RGS following 6-hour OGD, resveratrol significantly decreased (p: 0.004), the production or reactive oxygen species, at all doses applied. In addition, resveratrol increased, at 60 minutes, the Nrf2 expression- the Nrf2 band attenuated starting with the 3rd hour, while completely disappearing at the 9th hour.

Conclusions: This study showed that resveratrol decreases the production of reactive oxygen species in the HCMVE cells submitted to OGD + RGS, under the condition studied. In addition, it has been shown for the first time that resveratrol increases the expression of Nrf2 protein, in the HCMVE cells, under these conditions.

Key words: Oxygen-glucose deprivation, human cerebral microvascular endothelial cells, reactive oxygen species, Nrf2, resveratrol

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İskemik dokunun reperfüzyonu, damar endotelinde ve hedef organ parankiminde hasar oluşturan enflamatuvar bir yanıta yol açmakta ve hipoksik hasarı şiddetlendirmektedir. İskemi-reperfüzyon (I-R) sürecindeki doku hasarı birkaç mekanizma ile ortaya çıkmaktadır. ATP üretiminin azalması sonucu Na^+/K^+ ATPaz pompasının çalışmaması, NADPH oksidaz aktivitesindaki artış ile reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species-ROS) üretiminin artması, mitokondriyal parçalanma sonucu kaspaz gibi proapoptotik proteinlerin aktivasyonu, hasarlı bölgeye gelen nötrofillerdeki miyeloperoksidaz aktivitesi ile ROS üretiminin daha da artması –tüm bu olaylar- bu bölgede DNA, lipid ve protein hasarı yaparak nekrotik veya apoptotik hücre ölümüne neden olur (1,2).

Fizyolojik koşullarda ROS ve antioksidan sistem arasında bir denge bulunmaktadır. Hücrelerimizde bulunan bazı büyüme faktörleri, hormonlar ve nörotransmitterler ROS'u ikinci mesajcı olarak kullanırlar. Buna karşın, ROS'un fazla üretimi bu dengeyi bozar ve bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır. Hücrelerimiz ve dokularımız oksidatif strese maruz kaldığında ilk aşamada kendi antioksidan güçlerini devreye sokar. Antioksidan sistem, enzimatik antioksidanlar (superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz) ve enzimatik olmayan antioksidanlar (C vitamini, E vitamini, glutatyon, karotenoidler, flavonoidler) olarak iki gruba ayrılır.

Resveratrol, stilben fitoaleksin ailesine ait olan ve doğada bulunan az sayıda bitkinin kendisini zararlı çevre şartlarına karşı korumak için ürettiği polifenolik bir bileşiktir. Son on yılda hakkında en fazla araştırma yapılan antioksidan moleküldür. Resveratrolün antikanser, kardiyoprotektif, anti-enflamatuvar, antioksidan ve sitoprotektif etkileri bulunmakta ve bu etkilerini çok sayıda sinyal ileti yolunu aktive ederek gerçekleştirmektedir (3). Resveratrol, antioksidan ve sitoprotektif etkilerinin bir kısmını Nrf2'yi (Nuclear transcription factor erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2) aktive ederek göstermektedir. Nrf2, hücrenin oksidatif strese adaptif yanıtında merkezi rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür.

Resveratrolün I-R (*in vivo*) ve hipoksi-reoksijenasyon (H-R) (*in vitro*) hasarında hücre koruyucu etkisi pek çok hücrede gösterilmiştir. Ayrıca farklı hasar modellerinde ve pek çok farklı hücre hattında (PC12 hücreleri, akciğer epitel hücreleri, astrositler, hepatositler, keratinositler, vasküler düz kas hücreleri, koroner arter endotel hücreleri) RSV'nin Nrf2'yi aktive ettiği de saptanmıştır (4-10). Resveratrolün I-R hasarında Nrf2 üzerine etkisi *in vivo* yapılan bir çalışmada araştırılmıştır. Bu çalışma da ratlarda yapılmış ve RSV verilmesinin

enfarkt bölgesini azalttığı; ayrıca, kortikal doku homojenatı örneklerinde MDA düzeyini azalttığı, SOD aktivitesini artırdığı, Nrf2 ve HO-1 mRNA ve protein ekspresyonlarını artırdığı gösterilmiştir (11). Ancak, RSV'nin I-R veya H-R modellerinde endotel hücresinde Nrf2 aktivasyonu yaptığına dair bir araştırma bulunmamaktadır.

Bu araştırmanın temel amacı, serebral mikrovasküler endotel hücrelerinde H-R hasarı oluşturmak ve RSV'ün endotel hücrelerini H-R hasarına karşı koruyup korumadığını incelemek; RSV endotel hücrelerini koruyorsa, bu etkinin Nrf2 yolu ile mi olduğunu araştırmaktır. Bu amaçla önce H-R hasarı oluşturulacaktır. Ortamın hipoksik kaldığının hücre düzeyinde gösterilmesi amacıyla HIF-1α (hypoxia-inducible factor-1α) protein ekspresyonu düzeyi ölçülecektir. H-R hasarının hücreler üzerindeki etkisi ROS ölçümü ile değerlendirilecek, ayrıca farklı dozlarda uygulanan RSV'nin ROS oluşumunu azaltıp azaltmadığı araştırılacaktır. Daha sonra RSV'nin Nrf2 ekspresyonu üzerine olan etkisi de değerlendirilecektir.

Antioksidan etkileri çeşitli hücrelerde ve sistemlerde gösterilmiş resveratrolün serebral mikrovasküler endotel hücre hasarını önlemede de olumlu etkileri olabileceği düşünülmektedir. Araştırmanın hipotezi, "*in vitro* insan serebral mikrovasküler endotel hücrelerinde oluşturulan H-R hasar modelinde, RSV hücreleri ROS düzeyini azaltarak ve Nrf2 ekspresyonunu arttırarak oksidatif strese karşı korumaktadır" şeklinde formüle edilmiştir. Bu araştırmadan elde edilecek olan verilerin oksidatif stres durumunda endoteli koruyacak tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ışık tutacağı öngörülmektedir. Serebral I-R hasarını önlemede olumlu etkilerinin saptanması durumunda özellikle yüksek riskli hastalarda RSV kullanımının söz konusu olabileceği düşünülmektedir (12).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi-Reperfüzyon Hasarı:

İskemik dokunun reperfüzyonu, damar endotelinde ve hedef organ parankiminde hasar oluşturan enflamatuvar bir yanıta yol açmaktadır. Dokunun reperfüzyonunun sağlanması sonucunda hipoksik hasar şiddetlenmektedir. Hasarlı dokuya göç eden enflamatuvar hücrelerin reperfüzyon hasarına katılmalarının yanı sıra, reaktif oksijen ya da nitrojen ürünlerinin oluşumuyla da reperfüzyon hasarı oluşmaktadır.

İskemi sırasında görülen hücre ölümü pek çok hücresel ve moleküler mekanizmalar yoluyla olur. Örneğin inme (stroke) esnasında beyin dokusu iskemisinin ilk birkaç dakikasında oksidatif metabolizmanın çalışmaması nedeniyle ATP üretimi azalır. Bu durumda Na^+/K^+ ATPaz pompası çalışmaz ve hücre membranında depolarizasyon ortaya çıkar. Voltaj-kapılı kalsiyum kanalları aktive olur, hücre içine kalsiyum girişi sağlanır. Beyin hücrelerine eksitatör aminoasit olan glutamat salınır. Glutamat artışı kalsiyum girişini daha da artırır. Birkaç saat içinde fosfolipaz, proteaz ve endonukleaz gibi diğer enzimler de aktive olurlar (1,13). Bu arada NADPH oksidaz aktivitesi ile reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species-ROS) üretimi artar. ROS artışını, mitokondriyal disfonksiyon ve parçalanma ve kaspaz gibi proapoptotik proteinlerin aktivasyonu izler. İskemik dokuda artan ROS nedeniyle, buraya gelen nötrofiller de miyeloperoksidaz aktivitesi ile ROS artışına katkıda bulunurlar (2). Sonuç olarak, birkaç gün veya hafta sonra apoptotik hücre ölümü gerçekleşir. Bu etkilerine ek olarak, ROS artışı hücrelerde DNA, lipid ve protein hasarı yapar. DNA ve hücre membran hasarı nekrotik hücre ölümü ile sonuçlanır (1,13). Superoksit dismutaz 2 (Mn-SOD), iskemi sürecinde hücreyi ROS hasarından koruyan en önemli savunma enzimidir. Bu enzim, STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) adı verilen bir transkripsiyon faktörü tarafından indüklenir. İskemi sırasında STAT3 aktivitesinin azalması, Mn-SOD savunmasını zayıflatır ve hücre hasarı derinleşir (14).

İskemi reperfüzyon (I-R) hasarında hedef organ parankim hücrelerinin etkilenmesi doku hasarını oluşturmakla birlikte, endotel fonksiyon bozukluğu ya da hasarı da sürece katılarak doku hasarına olumsuz katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle, doku homeostazının sürdürülmesinde vasküler ve parankimal elemanların sıkı ilişkisinin rolü olduğu ve I-R hasarının tedavi yaklaşımlarında vasküler elemanların da hedef alınması gerektiği düşünülmektedir.

2.2. "Hypoxia Inducible Factor-1α" (HIF-1α)

2.2.1. Hipoksi ve uyardığı sinyal yolakları:

Hipoksik koşullarda vücutta iki ana sinyalizasyon sistemi devreye girer: AMPK (AMP activated protein kinase) ve HIF "hypoxia-inducible factor" (Hipoksi ile indüklenebilir faktör) yolakları (15). Hücre içi ATP düzeyi düştüğünde AMPK yolağı aktive olur, katabolik süreçleri hızlandırırken anabolik süreçleri inhibe eder. HIF ise tüm memeli hücrelerinde hipoksiye hücresel yanıtta anahtar rol oynar (16).

HIF-1 memeli hücrelerinde ilk kez eritropoetin (EPO) düzenleyicisi olarak identifiye edilmiştir. Kanda oksijen konsantrasyonu azaldığında böbreğin interstisyel fibroblastlarından hızla EPO salınır, böylece eritrosit yapımı artar ve kan yoluyla daha fazla oksijen taşınır. EPO üretimini artıran çok sayıda faktör olmakla beraber, sadece hipoksi durumunda EPO genine bağlanan protein 1992 yılında Semenza ve Wang tarafından tanımlanmış olan HIF-1'dir (17).

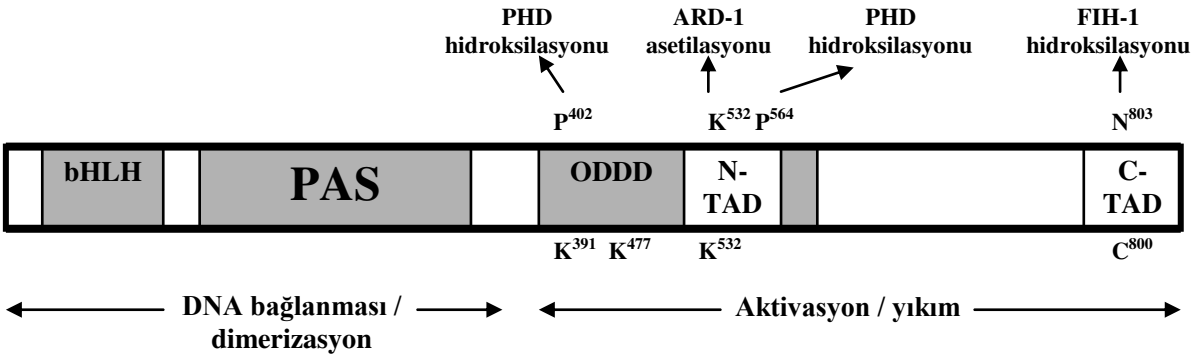
Normoksi koşullarında HIF-1α, HIF-1β ile dimer oluşturarak sitoplazmada bulunur. Hipoksi geliştiğinde ise, nukleusa girer ve 100'ün üzerinde gen içeren bir bölge olan hipoksi yanıt elemanı "hypoxia response element" (HRE) bölgesine bağlanır (Tablo 1) (18). Bu genler hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerde kritik rol oynarlar. HIF-1α yaşam için gerekli bir proteindir. Yapılan çalışmalarda HIF-1$\alpha^{-/-}$ fare embriyolarının gelişmelerinin gestasyonun ortasında durakladığı, kardiyovasküler defektler ve eritropoezisin azalması sonucu öldükleri saptanmıştır (19,20). Bu bulgular dolaşım sistemini oluşturan her üç komponentin de gelişiminin HIF-1 molekülüne bağımlı olduğunu kanıtlamaktadır (21).

Tablo 1. "Hypoxia inducible factor" (HIF) hedef genleri (18).

Sistem	**Hedef gen**
Eritrosit üretimi	Eritropoetin
Demir metabolizması	Transferin, transferin reseptörü, seruloplazmin
Kan damarlarının oluşumu ve dinamik düzenlenmesi	Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), adrenomedullin, endotelin-1, nitrik oksit sentaz-2, heme oksijenaz 1
Glukoz ve enerji metabolizması	Glukoz transporter 1, 3, hekzokinaz 1, 2, fosfofruktokinaz, aldolaz A, C, gliseraldehid 3 fosfat dehidrogenaz, fosfogliserat kinaz 1, piruvat dehidrogenaz kinaz 1 (PDK1), laktat dehidrogenaz (LDH)
Hücre proliferasyonu, diferansiasyonu ve yaşayabilirliği	İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 1 ve 3 Transforming büyüme faktörü β3, p21, Nip3, cyclin G2
pH düzenlenmesi	Karbonik anhidraz 9 ve 12

2.2.2. HIF yapısı:

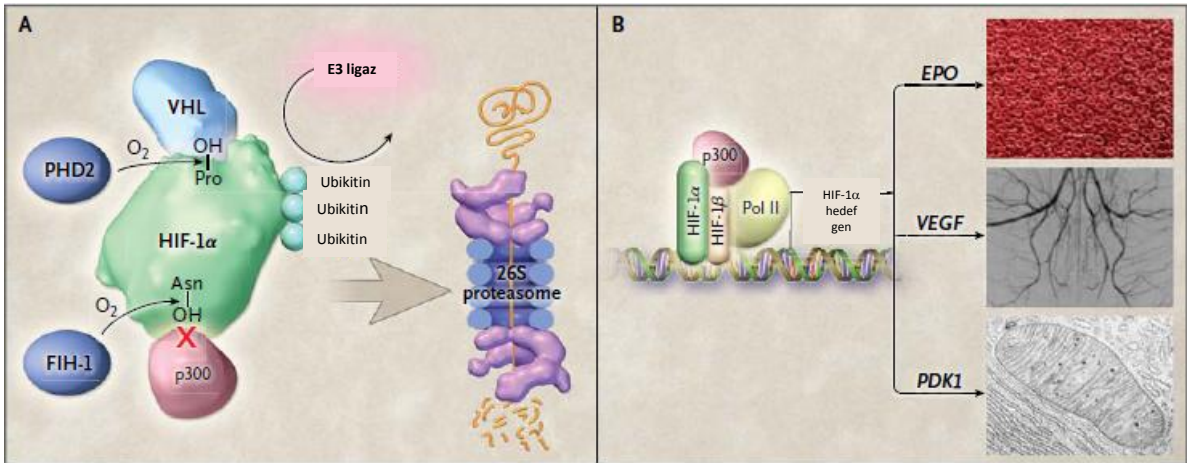
HIF iki komponentten oluşan heterodimerik bir proteindir (Şekil 1) (22). Her bir HIF molekülü yapısal bir subünit olan HIF-1β ve her ikisi de hipoksi ile indüklenen HIF-1α veya HIF-2α'dan birisini içerir. HIF-1β subüniti oksijene duyarlı değildir, transkripsiyonda başka rolleri bulunmaktadır. Buna karşın HIF-α subünitleri yüksek oranda hipoksi ile indüklenirler (Şekil 1). HIF-1 α'nın "Oxygen-Dependent Degradation Domain"i (oksijen bağımlı yıkılım bölgesi-ODDD) proteinin stabilitesini sağlar. Bunu da prolin 402 ve 564'ün "Prolyl Hydroxylase Domain (PHD)" ile hidroksilasyonuyla ve lizin 532'nin "ARrest Defective-1 protein (ARD1)" ile asetilasyonuyla gerçekleştirir. ARD1 proteini "von Hippel-Lindau (VHL) E3 ligaz" kompleksine bağlanır ve ubikitinasyona uğrar. α subüniti iki transaktivasyon domaini içerir. Bunlar C-terminal domaini (C-TAD) ve N-terminal domaini (N-TAD)'dir. β subüniti ise sadece bir TAD içerir. CBP/p300'ü de içeren çok sayıda ko-aktivatör, proteinin C-TAD bölgesine bağlanarak transaktivasyonunu sağlar. HIF-1 α fosforillenir ve transkripsiyonel aktivitesi artar. HIF-1 α'nın transkripsiyonel aktivitesi, C-TAD kısmında bulunan asparagin 800 bölgesini "Factor Inhibiting HIF-1 (FIH-1)"'nın hidroksillemesi ile negatif olarak düzenlenir. Bu durumda ko-aktivatör CBP/p300'ün bağlanması engellenmiş olur. Sistein 800'ün S-nitrozillenmesi CBP/p300 ile interaksiyonu artırır ve transaktivasyonu uyarır. Her iki subünitin de transkripsiyonel aktivitesi SUMOliyasyon (small ubiquitin like modifier ile bağlanma) ile negatif olarak düzenlenir.



Şekil 1. HIF-1α yapısı.

2.2.3. Oksijen konsantrasyonu ve HIF:

Hipoksik koşullar olmasa bile hücreler sürekli HIF-α proteinini sentezler ve yıkıma uğratırlar (21) (Şekil 2).



Şekil 2. HIF-1α'nın aktivasyonu ve inhibisyonu. Ortamda yeterli miktarda oksijen bulunduğunda (resim A) "prolyl hydroxylase domain 2" (PHD2), HIF-1α'nın prolin rezidüsünü hidroksillemek için (pro-OH) oksijen kullanır. von Hippel–Lindau (VHL) proteini, üzerinde pro-OH taşıyan HIF-1α'ya bağlanır ve ubikitin E3 ligazı da buraya çeker ve proteazomal yıkıma uğrar. "Factor inhibiting HIF-1" (FIH-1) de ortamdaki oksijeni kullanarak HIF-1α'yı asparagin rezidüsünden hidroksiller (Asn-OH). Asn-OH içeren HIF-1α'ya koaktivatör protein p300 bağlanamaz. Bu şekilde HIF-1α'nın gen transkripsiyonunu aktive etmesinin önüne geçilmiş olur. Hipoksik koşullarda (resim B) Pro ve Asn rezidülerinin hidroksillenmesi inhibe olur. Bu durumda HIF-1α birikmeye başlar, HIF-1β ile dimerize olur, p300'ü de bağlar ve bu üçlü yapı "hypoxia response element" (HRE)'e bağlanır. Bu bağlanma, RNA polimeraz II'nin çok sayıda hedef genin transkripsiyonunu aktive etmesi ile sonuçlanır. Bu genler arasında eritrosit üretimini sağlayan EPO; kan damarlarının oluşumunu sağlayan VEGF; piruvatın asetil CoA'ya dönüşümünü ve böylece oksidatif metabolizmayı inhibe eden PDK1 ve glikolitik metabolizmayı devam ettiren LDH da bulunmaktadır (21).

HIF-1 α, normoksi durumunda (%21 oksijen) hızla degrade olurken, ortamdaki oksijen konsantrasyonu %5'e düştüğünde yıkımı yavaşlar (23,24) (Şekil 2). Bu nedenle HIF ölçümü *in vitro* çalışmalarda hipoksik koşulların sağlandığının göstergesi olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda da ortamın hipoksik kaldığının hücre düzeyinde gösterilmesi amacıyla HIF-1α protein ekspresyonu düzeyi ölçülmüştür.

2.3. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri (Reactive oxygen species: ROS)

2.3.1. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu

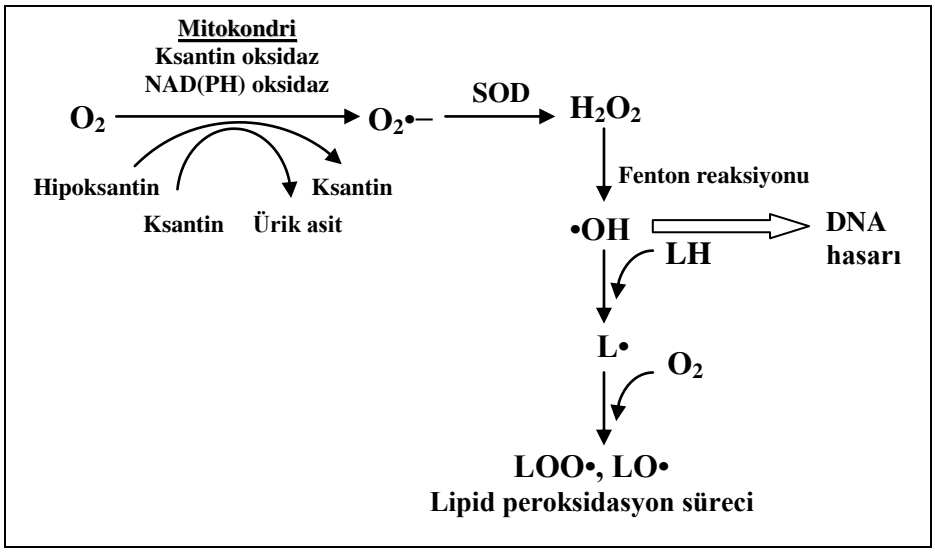
Vücut, kaçınılmaz olarak sürekli toksik kimyasallar, serbest radikaller, karsinogenler ve ksenobiyotik metabolitleri de içeren çok sayıda çevresel etkene maruz kalmaktadır. Bu etkenler, kanser, diyabet, ateroskleroz, Alzheimer hastalığı ve kronik artrit gibi pek çok kronik dejeneratif hastalığın patogenezinde rol oynamaktadırlar.

Serbest radikaller, atomik veya moleküler orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron içeren moleküller veya molekül parçaları olarak tanımlanırlar (25). Bu eşleşmemiş elektron veya elektronların varlığı serbest radikallere önemli derecede reaktivite kazandırır. Serbest radikaller, serbest oksijen radikalleri ve serbest nitrojen radikalleri olarak ikiye ayrılabilir. Oksijenden türeyen radikaller (ROS) canlı sistemler tarafından oluşturulan en önemli radikal türleridir ve moleküler oksijenin indirgenmesinden kaynaklanan fazlaca biyoaktif, kısa ömürlü molekülleri içerir. Moleküler oksijen (dioksijen) özel bir elektronik konfigürasyona sahiptir ve kendisi de bir radikaldir. Dioksijene bir elektron eklenmesiyle superoksit anyon radikali (O_2•−) oluşur (26) (Şekil 3). Reaktif oksijen türleri aerobik metabolizmanın son ürünleridir ve superoksidin başlıca oluşum yeri, hücre mitokondrisinde elektron transportu sırasında meydana gelen sızmalardır. Bunun dışında, memeli hücrelerinde ROS'un diğer enzimatik kaynakları; araşidonik asiti metabolize eden lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzimleri, sitokrom P450, ksantin oksidaz, NADPH oksidazlar, eşleşmemiş nitrik oksit sentaz, peroksidazlar ve diğer hemoproteinlerdir. Elektron transport zincirindeki elektronların %1-3'ü, oksijenle birleşerek su oluşturmak yerine sızarak superoksit meydana getirmektedir. Bu sızma özellikle kompleks I ve III yoluyla olmaktadır. Superoksit anyonu metabolik işlemler sonucu ya da fiziksel radyasyon sonucu oluşabilir ve "primer ROS" olarak adlandırılır. "Primer ROS", direkt olarak veya enzim / metallerle katalizlenen reaksiyonlarla diğer moleküllerle etkileşime geçer ve "sekonder ROS" moleküllerini oluşturur (27) (Şekil 3).

Normal koşullar altında süperoksit molekülü spontan olarak ya da süperoksit dismutaz enziminin katalizi ile H_2O_2'e dönüşmektedir. Peroksizomlar H_2O_2 birikimini önlemek ve yıkımını artırmak için katalaz enzimi içerirler. H_2O_2'in eşleşmemiş elektronu olmadığı için aslında bir radikal değildir. Ancak, ortamda ağır metallerin bulunması durumunda, $O_2^{\bullet-}$ radikali ve H_2O_2, Fe gibi metallerle reaksiyona girerek hidroksil radikalini (•OH) oluşturur. Hidroksil radikali hidroksit iyonunun nötral formudur, yüksek reaktiviteye sahiptir ve son derece kısa bir yarı ömrü vardır. Hidroksil radikalinin en önemli kaynağı *in vivo* koşullarda

gerçekleşen Fenton reaksiyonudur. Reaksiyon kimyasal olarak geçiş metaline (örneğin; Fe^{2+}) bağımlı, hidrojen peroksidin dekompozisyonudur ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$) (Şekil 3).

Başka bir reaktif oksijen radikali, canlı sistemlerde de oluşabilen peroksil radikalidir (ROO•). Hidroperoksil (perhidroksil, HOO•) superoksidin protonlanmış halidir ve yağ asidi peroksidasyonunu başlatabilir. Hücre membranında bulunan poliansature yağ asitlerinin perokside olması membran fonksiyonlarını ve sinyal iletimini bozar.



Şekil 3. Reaktif oksijen türlerinin oluşumu (27).

2.3.2. Reaktif oksijen türleri: etkilediği sinyal yolakları ve hastalıklarla ilişkisi

Fizyolojik koşullarda "ROS" ve "antioksidan sistem" arasında bir denge bulunmaktadır. Hücrede bulunan bazı büyüme faktörleri, hormonlar ve nörotransmitterler ROS'u ikinci mesajcı olarak kullanırlar. Ancak ROS'un fazla üretimi (kimyasallar, UV, iyonize radyasyon, bakteri-virus enfeksiyonları) vücudun dengesini bozar; hücresel proteinlere ve lipidlere zarar verebilir ve DNA'da eklentiler oluşturarak karsinojenik aktiviteyi başlatabilir (28). Sadece ROS değil, ortaya çıkan okside lipid ürünleri de (malondialdehid [MDA] ve 4-hidroksinonenal) protein ve DNA hasarı yapar. Bu durum "oksidatif stres" olarak adlandırılır (26).

Yaşlanma ve nörodejeneratif hastalıklar: Yaşlanma sürecinde oksidatif stresin önemli etkilerinin olduğu bilinmektedir. Mitokondri, hücrenin yaşaması ve ölmesinde anahtar rol oynar. Hücrede biriken ROS, mitokondri hasarına ve fonksiyon göstermeyen

mitokondrilerin yığılmasına neden olur. Normalde vücut bu hasarlı mitokondrileri "mitofaji" adı verilen otofajik bir yıkım süreciyle ortadan kaldırır. Bu şekilde sağlıklı mitokondriler belirli bir sayıda tutulur. Ancak yaşla beraber mitofaji azalır (29). "Ubikitin-ligaz Parkin" mitofajiyi uyaran bir proteindir, yaşla beraber azalması Parkinson hastalığına yol açan mekanizmalardan biri olarak kabul edilmektdir. Oksidatif stres kaslarda da otofajiyi uyarır ve kas atrofisi ile giden amiyotrofik lateral sklerozun (AML) patogenezinde oksidatif stresin söz konusu olduğu düşünülmektedir.

Yaşla beraber azalan mitofaji nedeniyle biriken hasarlı mitokondrilere ek olarak hasarlanmış sitoplazmik komponentlerin de ortadan kaldırılması gerekir. Bu süreçte de ROS, mitokondri membranındaki "permeability transition pore (PTP)" larının açılmasına, mitokondri içindeki sitokrom *c*'nin dışarı sızmasına buna bağlı olarak da apoptoz yoluyla hücre ölümüne neden olur (30).

Diyabet: Yapılan hayvan ve insan çalışmalarında ROS artışı ile insülin direncinin ilişkili olduğu saptanmıştır (31). Aslında insülinin hücre yüzey reseptörüne bağlanması ile H_2O_2 üretiminde artış olur ve insülin salgılanmasının devamı için milimolar düzeyde ROS gereklidir. Ancak, yüksek glukoz seviyeleri mitokondride yapısal değişikliklere neden olur ve mitokondriden H_2O_2 salınımı artırır (32,33). ROS artışı da diyabet patogenezinde rol oynayan nukleer faktor kappa B (NF κB) ve aktivatör protein 1 (AP-1)'i uyarır. Bu durumda, proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına ek olarak NF κB, serin/treonin kinazları uyararak fosforilasyon yolu ile insülin reseptörlerini etkiler ve insülin sinyal yolağını bloke eder (34).

Kanser: Oksidatif stres ve DNA mutayonu karsinogeneziste kritik bir basamaktır ve pek çok kanser türünde oksidatif DNA ürünlerinin arttığı gösterilmiştir (26). İnsanlarda demir ile indüklenmiş oksidatif stresin kolorektal kanserin temel belirleyicisi olduğu düşünülmektedir. Alkol, yanlış beslenme, stres, UV ışınlarına maruz kalma, obesite ve enfeksiyonlar ile hücrelerimizde artan ROS, TNF-α'yı uyarır. TNF-α, NF κB'nin en güçlü aktivatörüdür (35). NF κB'nin uyarılması, 500'den fazla genin aktive olmasına, enflamatuvar sitokinlerin üretilmesi ve salınmasına neden olur. Kısa vadede enflamatuvar yanıta yol açan bu süreç, yıllar içinde organ hasarı ve karsinogenez gibi kronik hastalıklarla sonuçlanır (36,37). c-Myc, K-Ras ve Wnt sinyal yolakları aracılı malign dönüşüm sürecinde de ROS artışının etkisi olduğu saptanmıştır (38-40). ROS, ICAM-1 üretimini ve matriks metalloproteinaz (MMP) aktivasyonunu artırır ve tümor gelişimine katkıda bulunur. Ayrıca

ROS'un NADPH oksidaz (Nox) ailesinin üyelerini stimüle ederek tümör hücre motilitesini artırdığı gösterilmiştir (41).

Vücutta üretilen ROS'un yanı sıra bazı bakteriler de ROS üreterek karsinogeneze katkıda bulunur. Gastrik kanser gelişiminde önemli rol oynayan *Helicobacter pylori* çok fazla miktarda O_2•− üretir. Mide içinde gerçekleşen zincirleme reaksiyonlar ile enflamasyon (gastrit) ve daha sonra mide kanseri gelişir (42).

Kardiyovasküler hastalıklar ve iskemi: Reaktif oksijen türlerinin NF κB ekspresyonunu artırması kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde de önemlidir. Aterosklerotik damarlarda NF κB ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (43). Ayrıca, aterosklerotik lezyonların intima ve media tabakalarında, düz kas ve endotel hücrelerinde, makrofajlarında NF κB'nin nukleer translokasyonu gösterilmiştir (44). ROS'un yanı sıra okside LDL de NF κB ekspresyonunu artırarak ateroskleroz gelişiminde önemli rollerden birini oynamaktadır (45). NF κB, ayrıca, IL-6 üretimini uyararak anjiyotensin II artışına neden olur. Anjiyotensin II, hipertansif etkilerinin yanı sıra ateroskleroz gelişiminde de rol oynar (45). Ateroskleroz gelişiminde H_2O_2 tarafından aktive edilen bir diğer faktör de PPAR'dır (peroxisome proliferators activated receptors). Okside LDL'nin aterosklerotik plakların köpük hücrelerinde PPAR ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (46). Endotel, vasküler tonusun devam ettirilmesinde, trombosit aktivasyonunda, tromboz ve ateroskleroz gelişiminde önemli rol oynar. Koroner arterlerde ROS artışı ve SOD azalmasının, asetilkolin vazodilatasyon yanıtında azalmaya neden olduğu ve bunun da endotel disfonksiyonu ile sonuçlandığı saptanmıştır (47). Endotelin vazodilatasyonu gerçekleştirememesi kalp iskemisi ve anjina pektoris ile sonuçlanır. Bir antioksidan olan C vitamini verilmesi endotelin vazodilatasyon işlevini düzeltir, bu da patogenezde ROS'un önemini göstermektedir (47). ROS artışı vasküler okside LDL'nin ve endotel hücrelerinde adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır, bu süreç enflamatuvar hücre infiltrasyonu, MMP aktivasyonu ve damar yeniden yapılanması ile sonuçlanır (45). ROS aynı zamanda, vasküler düz kas hücrelerinin plak içine migrasyonunu ve plak stabilitesinin korunması için kollajenin yapılanmasını düzenler.

Miyokardiyal iskemi sürecinde ortaya çıkan ROS, reperfüzyon sürecindeki hasarın en önemli sorumlusudur. ROS, hücreler üzerinde direkt etkisinin yanı sıra, enflamasyonu artırıcı etkisi ile de hasar yapmaktadır. Örnek olarak H_2O_2 tarafından aktive edilen anjiyotensin II, vasküler düz kas hücrelerinde Akt aktivasyonu yapar ve bu süreç düz kas hücre proliferasyonu ile sonuçlanır (48).

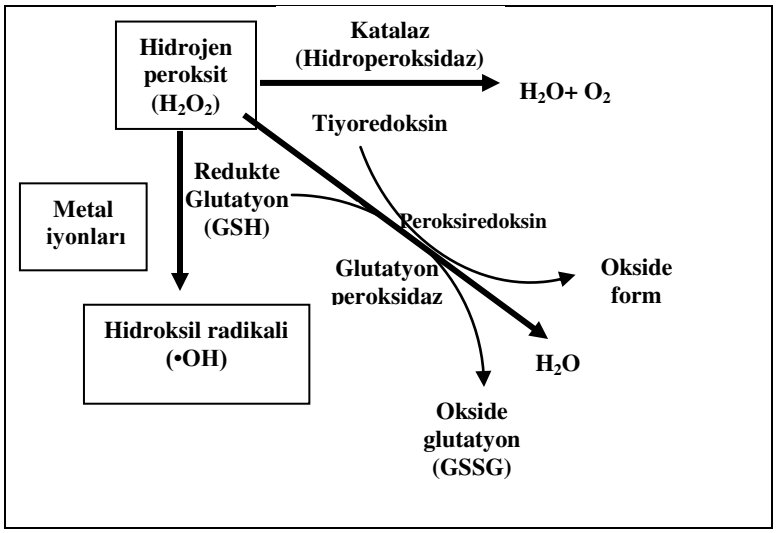
2.3.3.Antioksidan sistem

Hücre ve doku oksidatif strese maruz kaldığında ilk aşamada kendi antioksidan güçlerini devreye sokar. Bu amaçla sinyal iletimi, proliferasyon ve immunolojik savunma reaksiyonlarında rol oynayan 100'ün üzerinde gen aktive olur. Enzimatik antioksidan savunma sisteminde superoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz (CAT) yer alır. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise askorbik asit (C vitamini), tokoferol (E vitamini), glutatyon (GSH), karotenoidler, flavonoidler ve diğerleridir.

Superoksit dismutaz ailesi üç benzer yapıdaki enzimden oluşur. SOD1 (CuZn-SOD) sitoplazmada, SOD2 (Mn-SOD) mitokondri matriksinde ve SOD3 (EC-SOD) ekstrasellüler aralıkta bulunur ve süperoksitin hidrojen peroksite dönüşümünü katalizler (49). SOD2, O_2•−'nin düzeyini ve mitokondri içinde kalmasını kontrol eder ve hücresel homeostazisin sağlanması için anahtar rol oynar. Yapılan çalışmalarda "SOD2 knockout" farelerin doğumdan hemen sonra öldükleri ve bu farelerde kalp anomalileri, metabolik asidoz, iskelet kası ve karaciğerde yağ depolanması saptandığı bildirilmiştir (50).

Hidrojen peroksit iki ana yol ile yıkılır: Katalaz (H_2O ve O_2 oluşur) ve peroksidazlar (H_2O oluşur) (Şekil 4). Glutatyon peroksidaz, H_2O_2'i, redükte glutatyonu (GSH) glutatyon disülfite (GSSG) okside ederek suya çevirir. Glutatyon disülfit daha sonra pentoz fosfat şantı ile tekrar okside glutatyona dönüşür. Mitokondri ve diğer organeller ROS'u detoksifiye etmek için başka sistemler de içerirler (glutaredoksin, tiyoredoksin, tiyoredoksin redüktaz ve peroksiredoksinler) (49).

Glutatyon, hücrede en fazla bulunan antioksidan moleküldür. Glutatyonun oksidatif strese karşı rolleri şu şekilde sıralanabilir (26): a) glutatyon peroksidaz ve glutatyon transferaz gibi antioksidan enzimlerin kofaktörüdür (Şekil 4) b) plazma membranında aminoasit transportunda rol alır c) hidroksil radikali ve oksijeni direkt olarak temizler; hidrojen peroksit ve lipit peroksitlerini ise glutatyon peroksidazın aktivasyonu sırasında detoksifiye eder d) en önemli antioksidanlardan ikisi olan C ve E vitaminlerini aktif formlarına dönüştürmek üzere rejenere eder. Bu amaçla, tokoferol radikalini E vitaminine indirger, semihidroaskorbatı askorbata çevirir.



Şekil 4. Hidrojen peroksit metabolizması ve antioksidan enzimler (51).

Antioksidan sistemde ve sinyal iletiminde önemli görevleri olan diğer bir enzim hem oksijenaz 1 (HO-1)'dir. Bu enzim, oksijen ve NADPH'ı kullanarak toksik ve prooksidan olan hem'i antioksidan biliverdine dönüştürür. Biliverdin de biliverdin redüktaz ile bilirubine dönüşür. Bu enzim vücutta her yerde olabilmesine karşın, özellikle karaciğer Kupffer hücrelerinde, akciğerde ve dalakta bulunur. Yapılan çalışmalarda "HO-1 knockout" farelerde anemi, bilirubin düşüklüğü ve dokularda demir birikimi saptanmıştır. HO-1'in indüklenmesi kalp ve beyni I-R hasarından ve dokuları şiddetli sepsisten korumaktadır, ayrıca dokuların ve mitokondrinin onarımında rol oynamaktadır (52-54).

Doğada bulunan antioksidanlar kimyasal yapılarına göre çok sayıda gruba ayrılırlar: a) flavanoid polifenoller (yeşil çayda bulunan epigallokateşin-3 gallat, elmada bulunan *quercetin*), b) non-flavanoid polifenoller (üzümde bulunan resveratrol, zerdeçalda bulunan *curcumin*), c) fenolik asitler (biberiyede bulunan *rosemarinic acid*), d) organosulfur bileşikleri (brokolide bulunan *L-sulforaphane*, sarımsakta bulunan *thiosulfonate allicin*) (55). Bu bileşikler antioksidan etkilerini serbest radikalleri direkt olarak yakalayarak veya endojen hücresel antioksidan molekülleri indükleyerek gösterirler. Bu moleküllerden en önemlisi redoks sensitif bir transkripsiyon faktörü olan Nrf2'dir (Nuclear transcription factor erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2).

2.4. Nrf2 / Keap-1 / ARE Sinyal Yolağı

Nrf2, hücrenin oksidatif strese adaptif yanıtında merkezi rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Normalde Nrf2, Keap-1 (Kelch-like ECH associated protein 1) ile inaktif kompleks halinde bulunur. Oksidatif hasar olduğunda, Keap-1'in IVR bölgesindeki S grupları arasında disulfit bağı oluşur. Keap-1'de konformasyonel değişiklik ortaya çıkar ve Nrf2'yi tutamaz. Serbest kalan Nrf2 nükleusa transloke olur. Nükleusta Maf (**m**usculo**a**poneurotic **f**ibrosarcoma) ile heterodimer oluşturarak ARE bölgesine (Antioxidant response element, electrophile response element [EpRE], Maf recognition element) bağlanır. Nrf2'den ayrılan Keap-1 ubikitin ile birleşir ve 26S proteazom aracılığı ile yıkılır.

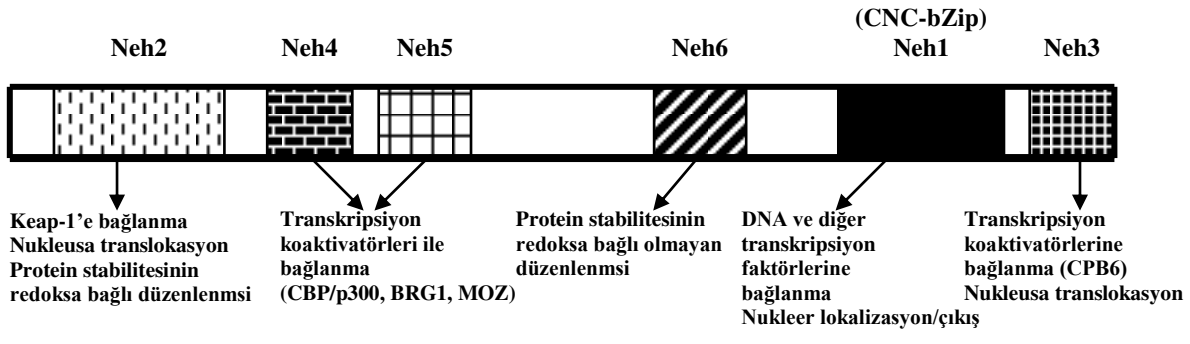
2.4.1. Nrf2 / Keap-1 / ARE yapısal özellikleri

Nrf2, Cap'n'Collar ailesine (CNC) ait olan bir transkripsiyon faktörüdür. CNC proteinleri böcekler, balıklar, kuşlar, sürüngenler ve memelilerde (insan dahil) iyi korunmuş olan, ancak bitki ve mantarlarda bulunmayan, bZip bölgesi (basic region leucine zipper [LLLLLL]) içeren bir transkripsiyon faktörü ailesidir (56). Bu ailenin ortak özelliği DNA bağlayan bölgelerinin N-terminal ucunda 43 aminoasitlik bir CNC bölgesinin korunmuş olmasıdır. CNC ailesinin üyeleri olan transkripsiyon faktörlerinin önemli gelişimsel ve homeostatik görevleri bulunur, hücresel strese adaptif yanıtta kritik rol oynarlar (56).

Memelilerde bu aileye ait altı faktör bulunmaktadır: p45, Nrf1, Nrf2, Nrf3, Bach1 ve Bach2 (57). Bunlar aynı zamanda NF E2 alt ailesini oluştururlar. *Caenorhabditis elegans*'ta bulunan SKN-1 (Skinhead family member 1) ve *Drosophila melanogaster*'de bulunan CNC de bu ailedendir. Memelilerde bulunan CNC ailesinin üyeleri farklı dokularda eksprese olurlar ve farklı işlevler yürütürler. NF E2 alt ailesinin tüm üyeleri düzenleyici aktif dimerler oluşturabilirler, ancak kendilerine bağlanan transkripsiyon faktörüne göre ARE aracılı genlerin ekspresyonunu artırabilir (p45, Nrf1, Nrf2, Nrf3) veya inhibe edebilirler (Bach1 ve Bach2) (56). Bu nedenle, bunların fazla üretimi veya azlığı hücresel düzeyde veya tüm organizmada farklı etkiler gösterebilir (58). CNC ailesinin üzerinde en çok araştırma yapılan üyesi, elektrofilik ksenobiyotikler ve oksidatif strese karşı hücrenin transkripsiyonel yanıtında orkestra şefi görevi üstlenen Nrf2'dir (58).

İnsanlarda Nrf2 molekülü 67.8 kDa ağırlığındadır, 605 aminoasit rezidüsü ve altı adet sistein rezidüsü içerir. Nrf2 molekülünün iyi korunmuş altı adet bölgesi bulunur (Neh1-6) (Şekil 5) (59). Bu bölgelerin özellikleri şu şekilde özetlenebilir:

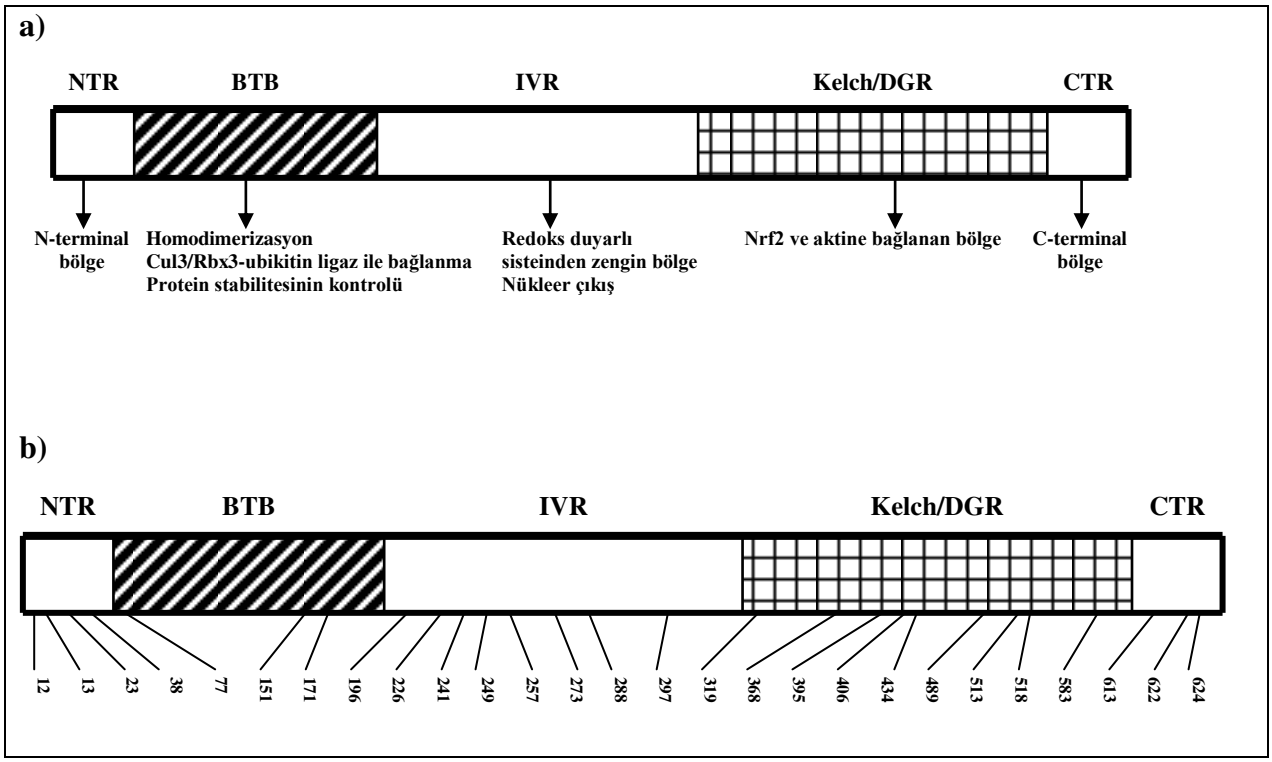
- **Neh1** (**N**rf2-**E**CH **h**omology; ECH: Nrf2'nin tavuk analoğu), "CNC homology region and basic leucine zipper" (CNC-bZip) bölgesi içerir. Nrf2 molekülünün hidrofobik bölgesidir, dimerizasyondan ve ARE bölgesine bağlanmadan sorumludur. Nrf2 molekülünün ARE bölgesine bağlanabilmesi için bZip (LLLLLL) içeren bir başka molekülle dimer oluşturması gereklidir. Bu moleküller arasından en fazla çalışılanlar "small Maf" ailesi ve Jun proteinleridir (60). Maf proteini bZip bölgesi ile Nrf2'nin bZip bölgesi fermuar şeklinde birleşerek dimer oluştururlar. Nrf2 molekülü nükleusa transport (NLS: nuclear localization signal) ve nükleustan çıkış (NES: nuclear export signal) sinyallerini de Neh1 bölgesinde taşır.
- **Neh2** (N-terminal bölge) ve Neh3 (C-terminal bölge) de iyi korunmuş bölgelerdir. Keap-1, Nrf2 molekülündeki Neh2 bölgesinin 40. rezidüsündeki serine (S40) bağlanır ve ubikitin ile birleşir. Neh2 bölgesinde bulunan DLG (Leu-Trp-Arg-Gln-Asp-Ile-Asp-Leu-Gly) ve ETGE (Leu-Asp-Glu-Glu-Thr-Gly-Glu) motifleri Keap-1 ile bağlanan bölgelerdir. DLG ve ETGE bölgeleri arasında yedi adet lizin rezidüsü bulunmaktadır. Bu lizin rezidülerinin Keap-1 ve Nrf2 moleküllerinin doğru bağlanmasını kontrol etmekten sorumlu oldukları düşünülmektedir.
- **Neh3, Neh4** ve **Neh5**, Nrf2 molekülünün transaktivasyon bölgeleridir ve histon asetiltransferazlarla birleşirler.



Şekil 5. Nrf2 molekülünün yapısı.

İnsan Keap-1 molekülü 69.7 kDa ağırlığındadır; 625 aminoasit ve 27 sistein rezidüsü içerir. Bu rezidülerin büyük bir kısmı Nrf2'yi aktive edecek oksidan ve elektrofilik bileşiğin tanınması için sensör görevi görür. Keap-1 molekülünün beş bölgesi bulunur (Şekil a).

- **NTR,** N-terminal bölge
- **BTB** (**b**road complex–**t**ramtrack–**b**ric-a-brac), Keap-1 molekülünün dimerizasyonu ve Cul3-E3-ligaz ile bağlanması bu bölgenin işlevidir. Bu bölgede bulunun C151 rezidüsü Keap-1 molekülünün fonksiyonları açısından kritik önem taşır. Bu bölgenin kaybı veya modifikasyonu durumunda molekülde konformasyonel değişiklikler olur ve Cul3-E3-ligaz ile bağlanma gerçekleşemez. Ayrıca, bu bölge oksidatif stres durumunda molekülün sensor görevini gördüğünden, bu bölgedeki bozukluklar Nrf2/Keap-1/ARE sinyal yolağının çalışamamasına neden olur.
- **IVR** (**i**nter**v**ening **r**egion), oksidasyona ve Nrf2'nin NES motifine duyarlı olan sisteinden zengin bölgedir. Bu şekilde Nrf2'yi sitoplazmada tutar.
- **Kelch / DGR** (**d**ouble **g**lycine **r**epeat)**,** Keap-1 molekülünün, hücre iskeletindeki aktine ve/veya miyozin VIIa'ya tutunduğu, ayrıca Nrf2 ile birleştiği bölgedir.
- **CTR,** C-terminal bölge



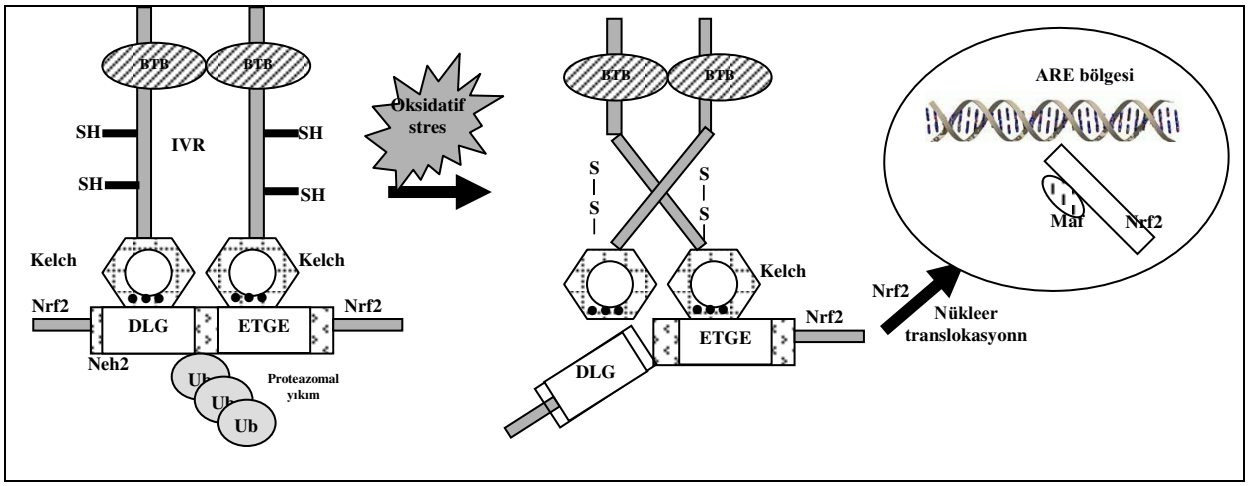
Şekil 6. a) Keap-1 molekülü. **b)** Keap-1'de yer alan sistein rezidüleri (61)

2.4.2. Keap-1/Nrf2 etkileşimi:

Keap-1 üzerindeki Kelch /DGR bölgesi ile, Nrf2 molekülündeki Neh2 bölgesinin 40. rezidüsündeki serine (S40) bağlanır. Keap-1 Nrf2'nin aktivitesini hem onu sitoplazmada tutarak pasif yolla, hem de Cullin-3-based-E3 ligaz kompleksi yoluyla poliubikitinlerin hedefi haline getirerek ve böylece proteazomal yıkımını sağlayarak aktif yolla bloke eder (62, 63).

Hücredeki redoks sensörünün Keap-1 molekülü olduğu düşünülmektedir. Keap-1 molekülündeki sistein rezidülerinin bir kısmı reaktiftir. Hücre strese maruz kaldığında Keap-1 molekülünde bulunan bir veya daha fazla sayıdaki reaktif sistein rezidüleri arasında disülfit bağı oluşur. Bu durumda Keap-1'in yapısında konformasyonel değişiklik ortaya çıkar ve Nrf2 molekülünü bırakır (64). Yapılan inaktivasyon çalışmalarında aralarında disülfit bağı oluşturan ve bu şekilde Keap-1'de yapısal değişiklik oluşturarak Nrf2'nin serbest kalmasını sağlayan en önemli yapıların IVR bölgesindeki C273 ve C288 sistein rezidüleri olduğu saptanmıştır (65). Keap-1 molekülünde bulunan sistein rezidülerinin direkt modifikasyonları (rezidüler arasında disülfit bağı oluşması, sisteinin serin veya tirozin ile yer değiştirmesi vb) ile Keap-1 ve Nrf2 molekülleri arasındaki interaksiyon regüle edilir (61,66). Ancak bu regülasyon sadece sistein rezidülerinin modifikasyonları ile değil, başka faktörlerle de kontrol edilebilmektedir. Örnek olarak, fare deneylerinde Keap-1 molekülünün her subünitinde 0.9 Zn^{2+} iyon bulunduğu; metal katyonun C273 ve C288 rezidülerindeki sülfür ile interaksiyona (etkileşime) girdiği ve bunların ayrışması ile Keap-1 molekülünün Nrf2'yi bıraktığı gösterilmiştir (67).

Nrf2 / Keap-1 bağlanma modeline "menteşe-mandal" modeli de denilmektedir. İki molekül birbirine bağlandığında (kilitli iken, mandal) Nrf2 iki motifiyle (DLG motifi ve ETGE motifi) her iki Keap-1 molekülünün Kelch bölgesinde bulunan arginin triadı (Arg380, Arg415, Arg483) ile birleşir (68). Nrf2 molekülünü Keap-1'e bağlayan asıl bölge ETGE motifidir. DLG ise çok daha zayıf olarak bağlanır. Oksidatif hasar olması durumunda Keap-1'de konformasyonel değişiklik olduğunda, Nrf2 molekülünün DGL motifi Keap-1'den ayrılır, bu durumda ETGE motifi bağlı kalmış olduğundan Nrf2 molekülü Keap-1'e asılı kalır (menteşe) (Şekil 7).



Şekil 7. Nrf 2 ve Keap-1 interaksiyonu mekanizması. Nrf2 molekülünün Neh2 bölgesinde bulunan DLG ve ETGE motifleri her bir Kelch bölgesinde yer alan arginin triadı (Arg380, Arg415, Arg483) (şekilde üç nokta ile gösterilmiştir) ile birleşir. DLG ve ETGE motifleri arasındaki Neh2 bölgesinde yedi lizin rezidüsü bulunur ve bunlar ubikitin ile birleşme için substrat görevi görür (64,68,69).

Ubikitinasyon için; hedef lizin rezidüsünün epsilon amino grubu ile E2 enziminin katalitik bölgesi arasında iletişim gereklidir (69). Bu nedenle, Neh2 bölgesinde DGL ve ETGE motifleri arasında bulunan yedi lizin rezidüsünün, Nrf2'nin Keap-1 aracılı E3 ligaz tarafından ubikitinasyonu için bir hedef bölge olduğu düşünülmektedir (Şekil 7) (68,69). Bunun yanı sıra, DGL motifi Keap-1'e bağlanma görevinin yanı sıra içerdiği aminoasitlerin özellikleri nedeniyle de ubikitinasyonda önemli görevler üstlenmektedir. DGL motifinde bulunan Met-17, Val-32 aminoasitlerinde delesyon olduğunda, Nrf2'nin Keap-1'e bağlanmasında bir sorun olmamakta ancak, molekülün ubikitin yollu yıkımı gerçekleşememektedir (70). Bu nedenle, DGL motifinin Keap1'e bağlanmaktan daha çok ubikitinasyon için var olduğu, ayrıca lizin rezidüleri içeren alfa-heliks yapısının korunması için anahtar görevi gördüğü düşünülmektedir (68).

2.4.3. Nrf2/ARE sinyal yolağının aktivasyonu

Hücre oksidatif strese maruz kaldığında, Nrf2, Keap-1'den ayrılır. Sitoplazmada serbest Nrf2 miktarı artar ve belirli bir konsantrasyona ulaşıldığında Nrf2 molekülleri nukleusa transloke olarak DNA'da ARE bölgesine bağlanır (Şekil 7). ARE, oksidatif strese maruz kalan hücrelerde detoksifiye edici enzimlerin ve antioksidan moleküllerin genlerinin transkripsiyonel aktivasyonunu sağlayan bir bölgedir. Birçok antioksidan enzimin promotor bölgesinde ARE bulunur. DNA üzerinde 5′_A/GTGAC/TnnnGCA/G_3′ (nükleus) nukleotid

sekansını içeren bölge ARE bölgesidir (71) ve ilk kez 1980'lerin sonlarına doğru tanımlanmıştır (72).

Birbirinden yapısal olarak farklı olan çok sayıdaki molekül ARE bölgesini aktive edebilir. ARE bölgesinin indükleyicileri toplam 10 ana gruba ayrılabilir (Tablo 2) (57). Bunlara ek olarak, bazı faktörler de ARE bölgesine bağlanabilir: hem kompleksi, okside lipoproteinler, $OH^{\bullet}$, CO, $NO^{\bullet}$, $ONOO^{-}$/ONOOH, O_3, HOCl, kısa dalga boylu UV ışınları, iskemi/reperfüzyon, hiperoksi ve gerilme stresi. Sayılan bu moleküllerin ortak özellikleri elektrofil özellikte olmaları (bu nedenle ARE sıklıkla EpRE "electrophile response element" olarak da adlandırılır) ayrıca, proteinlerin -SH gruplarını alkilleyerek veya okside ederek proteinlerde modifikasyon yapmalarıdır (57).

Tablo 2. ARE bölgesine bağlanan Nrf2 indükleyici gruplar ve etki mekanizmaları (57).

İndükleyici grupları	**Moleküller**		**Etki mekanizmaları**
	Ksenobiyotikler ve metabolitleri	**Endojen bileşikler**	
Difenoller, kinonlar, fenilendiaminler	tBHQ, BHT, BHA, zerdeçal, resveratrol, kuersetin, etoksikuin, probukol, epigallokateşin-3-gallat	Dopamin, 4-hidroksiestrol, 2-hidroksiestradiol, 4-hidroksiestradiol, estradiol-3,4-kinon	Kinonlar Keap-1'deki SH-gruplarına bağlanır veya okside eder, hücre içi H_2O_2 üretimini artırır
Michael alıcıları	EPA, DHA, krotonik aldehit, metilakrilat, metil propionat	4-hidroksi-2,3-nonenal, PGA_2, 15d-PGJ_2, J_2-izo-prostan	Keap-1'deki SH- gruplarına bağlanır
İzotiyosiyanatlar	Sulforafan, 3-morfolino-propil izotiyosiyanat	-	Keap-1'deki SH- gruplarına bağlanır
1,2-ditiyol-3-tionlar	1,2-ditioltiyon, oltipraz, 5-(parametoksipfenil)-1,2-ditiyol-3-tiyon	-	Hücre içi H_2O_2 üretimini artırır
Hidroperoksitler	*tert*-butil hidroperoksit, cumol hidroperoksit, H_2O_2	H_2O_2, lipid hidroperoksitler	Keap-1'deki SH- gruplarını okside eder
Trivalan arsenik bileşikleri	As_2O_3, AsO^{-}_2, As^{3+}, $CH_3As(OH)_2$	-	Keap-1'deki SH- gruplarına bağlanır, hücre içi H_2O_2 üretimini artırır
Ağır metal iyonları	Cd^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Au^{1+}, Hg^{2+}, Pb^{2+}	-	Hücre içi H_2O_2 üretimini artırır
Komşu dimerkaptanlar	(±)-2,3-dimerkapto-1-propanol, 1,2-etan ditiyol	-	Saptanmamıştır
Karotenoidler	3-hidroksi-β-damaskon, likopen	-	Saptanmamıştır
Selenyum içeren bileşikler	Ebselen, dialkil diselenitler, seleninik asid, fenil selenol	-	Saptanmamıştır

tBHQ: tert-butilhidrokinon; BHT: butilhidroksitoluen; BHA: butilhidroksianizol; EPA: eikopentaenoik asit; DHA: dokosaheksoenoik aist; PGA_2: prostaglandin A_2; 15d-PGJ_2: 15- deoksi-prostaglandin J_2.

Nrf2 molekülünün kendisi de Nrf2 mRNA sentezini uyararak yeni Nrf2 molekülü sentezini uyarır (73). Böylece, hücrenin bir toksik ajanla karşılaşması durumunda bu sinyal yolağının daha güçlü şekilde çalışmasını sağlamış olur.

Keap-1/Nrf2 kompleksinin klasik olarak hücre iskeletine tutunduğu bilinmektedir. Ancak, Lo ve Hannik (74) tarafından yeni yapılan bir çalışmada, Nrf2/Keap-1/fosfogliserat mutaz 5 (PGAM5) kompleksinin mitokondri dış membranında yerleştiği gösterilmiştir. Hücre içinde bulunan Nrf2 molekülünün küçük bir kısmı Nrf2/Keap-1/PGAM5 kompleksi oluşturarak mitokondri membranına yerleşir. Mitokondri fonksiyonlarında yetersizlik olduğunda bu sinyalin hızla nukleusa iletilmesi açısından bu yerleşimin kritik rol oynadığı düşünülmektedir.

PKC (Protein kinaz C), JNK (c-Jun N terminal kinaz), ERK (Ekstracellular signal regulated protein kinase), PI3K (Fosfatidil inozitol 3 kinaz) ve p38MAP kinaz, Nrf2 aktivasyonunu regüle ettiği bilinen sinyal yollarıdır (75). Örneğin Nrf2'nin PKC ile fosforillenmesi Keap-1'den ayrılmasını kolaylaştırmaktadır (76). *In vitro* çalışmalarda PI3K'ın inhibisyonunun Nrf2'nin nükleusa translokasyonunu engellediği ve ARE bölgesindeki genlerin ekspresyonlarını azalttığı gösterilmiştir (77). Bu *in vitro* çalışmaların sonuçlarının *in vivo* koşullarda da değerlendirilmesi ve bu sonuçlara göre Nrf2 yolağını hedef alan ilaçların geliştirilmesi için pek çok yeni çalışma gereklidir.

2.4.4. Nrf2/ARE sinyal yolağı tarafından aktive / inhibe edilen genler

Memeli hücrelerinde yüzlerce ARE bağlantılı gen bulunmaktadır. Çok farklı çalışmalar toplu olarak incelendiğinde, redoks duyarlı Nrf2 / Keap-1 / ARE sinyal yolağının, genlerimizin %1-10'unu regule ettikleri düşünülmektedir (57,78). Oksidatif stres olmasa da, Nrf2 bazal olarak aktivitesini devam ettirir ve böylece hücrenin antioksidan savunma sisteminin hem bazal hem de indüklenebilir aktivitesini kontrol etmiş olur (79,80).

Nrf2 / ARE yolağı tarafından düzenlenen genler pek çok enzimin, düzenleyici veya yapısal proteinlerin sentezlenmesinde görev alırlar (Tablo 3). Yapılan genomik çalışmalarda elde edilen verilere göre Nrf2 yolağının aktive ettiği genlerin sağladığı işlevler şu şekilde özetlenmektedir (75):

- Oksidanları direkt olarak inaktive eden enzimlerin uyarılması
- Glutatyon sentezi ve rejeneresyonunun artırılması
- NADPH sentezinin stimüle edilmesi

- "Multidrug response transporter" ların uyarılması ile toksinlerin hücreden dışarı atılmasının kolaylaştırılması
- Hasarlı proteinlerin tanınması, onarılması veya uzaklaştırılması
- Diğer transkripsiyon faktörlerinin, büyüme faktörlerinin, reseptörlerin ve moleküler şaperonların ekspresyonlarının düzenlenmesi
- Sitokin aracılı enflamasyonun inhibe edilmesi

Tablo 3. Nrf-2 / ARE sinyal yolağı tarafından aktive edilen genler (57,81).

Gen	Fonksiyonu
HO-1	Hem yıkımında anahtar enzim, biliverdin oluşumu, anjiyogenez ve vaskuler hücre korunması
NQO1	Kinonun hidrokinona reduksiyonunu katalizler, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynar, membran fosfolipidlerini (koenzim Q'nun reduksiyonu yoluyla) hasardan korur
GST	Detoksifiye edici enzim, GSH konjugasyonunu katalizler
GCLC	GCL'nin katalitik subünitidir, glutatyon sentezinin hız kısıtlayıcı enzimidir
GCLM	GCL'nin düzenleyici subünitidir
xCT	Sistin-glutamat transporter'ıdır, hücre içi sistin düzeyinin idamesini sağlar, bu yollarla GSH sentezinde hız sınırlayıcı rol oynar
AKR	Toksik aldehitleri detoksifiye eder, hücreyi karbonil stresten korur
GR	GSH/GSSH dönüşümünde ve GSH siklusunda anahtar enzimdir
TrxR	Trx'in disülfid formunun redüksiyonu
Trx	Redoks homeostazisini devam ettirmek için redukte Trx okside Prx ile reaksiyona girer
Prx 1	Peroksitleri temizler ve redoks homeostazisini devam ettirir

AKR, Aldo-keto reduktaz; ARE, "antioxidant response element"; GCL, glutamat-sistein ligaz; GCLC, glutamat-sistein ligaz katalitik subüniti; GCLM, glutamat-sistein ligaz düzenleyici subüniti; GR, glutatyon reduktaz; GSH, glutatyon; GSSG, disulfide glutatyon; GST, glutatyon -S-transferaz; HO-1, hem oksijenaz-1; NQO1, "NAD(P)H: kinon oksidoredüktaz 1"; Nrf2, "nuclear factor E2-related factor"; Prx, peroksiredoksin; ROS, reaktif oksijen ürünleri; TrxR, tioredoksin reduktaz; xCT, sistin-glutamat transporter.

Nrf2 /Keap-1 / ARE sinyal yolağı pek çok genin transkripsiyonunu indüklemesine rağmen bazılarını da inhibe etmektedir. Bu transkripsiyon faktörlerinin başında NF κB gelmektedir. NF κB'nin inhibisyonu, çok geniş bir proinflamatuvar gen grubunun ekspresyonunun azalması ile sonuçlanır. Örnek olarak, lipopolisakkarit ile stimüle edilen insan monositlerinde yapılan çalışmalarda akut enflamasyonla ilişkili olan 88 genin %90'ının NF κB aracılı olarak indüklendiği saptanmıştır (82). Bu nedenle, Nrf2 / Keap-1 / ARE sinyal yolağının uyarılması akut enflamatuvar yanıtın şiddetini ve daha sonra ortaya çıkacak kronik patolojik sürecin yoğunluğunu azaltacaktır (57). NF κB dışında, karaciğer hücrelerinde Nrf2

aktivasyonunun lipit ve kolesterol biyosentezi ve metabolizmasındaki bazı enzimlerin gen ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (78).

2.4.5. Hastalıklar ve Nrf2

Reaktif oksijen türleri pek çok hastalığın patogenezinde rol oynar. Nrf2 hücrenin oksidatif strese adaptif yanıtında merkezi rol oynadığından, *nrf2*$^{-/-}$ memeliler oksidatif hasara açıktırlar (58). *nrf2*$^{-/-}$ farelerle yapılan deneylerde, kimyasallarla veya ksenobiyotiklerle oksidatif hasar oluşturulduğunda doku hasarının fazla olduğu, enflamasyonun arttığı, DNA, lipit ve protein oksidasyon ürünlerinde artış olduğu ve bu hayvanlarda kanser gelişiminin fazla olduğu saptanmıştır (83-86). Oksidatif stres sadece kanserle değil, başka malign olmayan hastalıklarla da ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda, astım, amfizem, pulmoner fibrozis, akut akciğer yaralanması gibi akciğer hastalıkları modellerinin *nrf2*$^{-/-}$ farelerde daha şiddetli ortaya çıktığı saptanmıştır (87,88). Parkinson hastalığı ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda da Nrf2'nin koruyucu etkisi belirlenmiştir (89,90). Bunlara ek olarak, kolit modeli uygulanan *nrf2*$^{-/-}$ farelerde hastalığın ve enflamasyonun daha şiddetli olarak ortaya çıktığı, antioksidan gen düzeylerinin belirgin olarak azaldığı saptanmıştır (91). Ateroskleroz ve metabolik sendrom geliştirilen orta yaş grubundaki farelere, insülin direncinin tedavisi için Nrf2'yi aktive eden rosiglitazon verildiğinde, antioksidan enzimlerin vasküler ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir (92). Bu deneysel çalışmalardan yola çıkılarak, Nrf2 aktivasyonunun hem hastalıklardan korunmada hem de tedavide etkili olabileceği görüşü ortaya atılmaktadır (58).

İnsanlarda Nrf2'nin etkinliğini azaltabilecek polimorfizmler pek çok hastalığın gelişimiyle ilişkilidir. Nrf2 aktivitesini azaltan polimorfizmlerin vitiligo (93), kronik gastrit ve peptik ülser hastalığı (94), ülseratif kolit (95) ve ARDS (adult respiratory distress syndrome) (96) ile ilişkisi gösterilmiştir. Özellikle cilt, akciğer, mide, kolon gibi dış etkenlere sıklıkla maruz kalan organların hastalıklarında Nrf2 polimorfizmlerinin hastalık şiddeti ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Nrf2 genindeki hastalıklarla ilişkili polimorfizmlerin allelik sıklıkları Avrupa'lılarda %20, Asya'lılarda %40 ve Amerika'lılarda %55 bulunmuştur (96). Bu durumda, toplumda antioksidan yanıtta yetersizliğe genetik olarak yatkın pek çok birey bulunmaktadır ve bu bireyler oksidatif stresten kaynaklanan çok sayıda hastalık için risk taşımaktadır (58). Bu bireyler, Nrf2 aktivitesini stimüle eden farmakolojik ajanlardan en fazla fayda görecek hastalar olacaktır.

2.4.6. Hipoksi reoksijenasyon hasarı, oksidatif stres ve Nrf2

Hipoksi sırasında oksidatif hasar oluşum mekanizması paradoksaldir. ROS, sadece oksijenin fazla olduğu durumlarda değil oksijen azlığında da üretilir. Hipoksideki hücreler ATP üretimi için metabolizmalarını anaerobik glikolize kaydırırlar. Ancak, çok düşük oksijen basıncında bile, trikarboksilik asit siklusu ve elektron transport zinciri yoluyla da ATP'nin oksidatif üretimi az da olsa devam eder. Mitokondriyal elektron transport zincirinden kaçan elektronlar ROS oluşumunu devam ettirir. Fizyolojik koşullarda NADPH elektron transport zincirinin son elektron alıcısıdır ve bu reaksiyonun katalizinde ksantin dehidrogenaz enzimi ile işbirliği yapar. Ancak, reperfüzyon sürecinde, ksantin oksidazın aşırı birikimi ile, hipoksantin-ksantin reaksiyonu sonucunda elektronlar son alıcı olarak (NADPH yerine) O_2'e aktarılır ve superoksit radikali ortaya çıkar. Ayrıca reoksijenasyon ile dokuya yüksek oranda oksijen desteğinin ulaşması sonucu ROS oluşumunda aşırı bir artış olur (13).

Reperfüzyon sürecinde bölgeye gelen enflamatuvar hücreler de ROS artışına katkıda bulunurlar (97). Aktive nötrofiller fagositik vakuollerinde NADPH oksidaz enzimi yoluyla superoksit üretirler; bu da hidroksil radikaline dönüşür. Lökositlerde bulunan miyeloperoksidaz enzimi de H_2O_2 ve klorin reaksiyonunu katalizler ve ortaya oldukça reaktif bir ürün olan sodyum hipoklorit çıkar (98,99). Ayrıca, nötrofillerden salınan süperoksit endotelde ksantin oksidaz aktivitesini artırır ve bu da süperoksit üretiminin artmasına neden olur. Yapılan çalışmalar, I-R hasarında ksantin oksidazın önemli rolü olduğunu ve bu hasar modelinde ksantin oksidaz inhibitörü olan allopurinol verildiğinde kalp, karaciğer, böbrek ve ince barsakta süperoksit üretiminin azaldığını göstermektedir (100-103). I-R hasarı sırasında ortaya çıkan oksidan moleküller sinyalleme yollarını aktive ettirir ya da proteinlerin ve lipid membranların hasarına neden olur. I-R hasarı hem akut hem de kronik hastalık gelişimi ile sonuçlanır (104,105).

Literatürde, pek çok çalışmada, I-R hasarı (*in vivo*) ve H-R hasarı (*in vitro*) modellerinin farklı hücre tiplerinde Nrf2 mRNA ve protein düzeyini arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca bu hasar modellerinde koruyucuların Nrf2 üzerine etkileri de çalışılmıştır. Çin'de yapılan bir çalışmada, H9c2 kardiyomiyosit hücrelerine H-R hasarı uygulandığında, hasar öncesi "Danshen-Gegen (DG) decoction" bitki karışımı eklenen grupta Nrf2 ve HO-1 ekspresyonlarının arttığı ve bu grupta apoptozun düşük düzeyde olduğu saptanmıştır (106). H-R hasarı uygulanan fare nöroblastom hücrelerinde (N2A) Nrf2 protein ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu Nrf2 artışının da insanlardaki otozomal resesif non-sendromik mental

retardasyondan sorumlu protein olan cereblonun miktarını arttırdığı saptanmıştır (107). İsrail'de yapılan bir çalışmada, fare hepatosit hücre kültürüne H-R hasarı uygulandığında SOD enziminin hem mRNA hem de protein ekspresyonunu arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada SOD enzimi siRNA ile inhibe edildiğinde hücrelerde apoptozun arttığı, Nrf2, HO-1 ve GSH mRNA ve protein düzeylerinin azaldığı saptanmıştır (108). Sonuç olarak, hepatosit hücrelerini H-R hasarından koruyan mekanizmalardan birinin SOD tarafından uyarılan Nrf2 yolağı olabileceği yorumu yapılmıştır (108). A549 insan akciğer kanser hücrelerine 4 saatlik hipoksiden sonra 30 dakika reoksijenasyon uygulandığında Nrf2'nin nukleusa geçerek ARE bölgesine bağlandığı, bu bölgenin aynı zamanda tümor hücre büyümesinde önemli bir faktör olan peroksiredoksin 1 (Prx 1) molekülünün gen bölgesine komşu olduğu ve bu bağlanma ile Prx 1 ekspresyonunun da arttığı gösterilmiştir (109). Sonuç olarak, bu çalışmada Nrf2-Prx 1 aksının kemoterapötik ajanların geliştirilmesinde önemli bir tedavi yolu olacağı yorumu yapılmıştır (109).

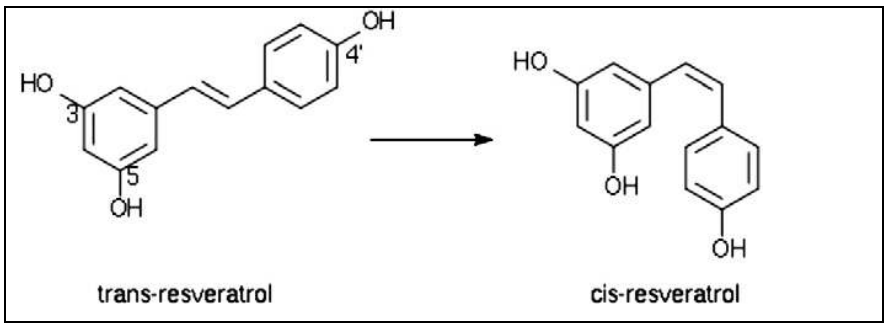
2.5. Resveratrol

Resveratrol (3,5,4′-trihidroksistilben) (RSV), doğada az sayıda bitki tarafından stres karşısında üretilen ve son 20 yılda hakkında en fazla araştırma yapılan antioksidan moleküldür. İlk kez 1940 yılında bitkilerde bulunan bir molekül olarak tanımlanmış ve yaklaşık yarım yüzyıl boyunca bitkilerin fungal enfeksiyonlardan korunması ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Ancak, Jang ve arkadaşlarının 1997'de yayınlanan araştırmalarında RSV'nin kanseri önleyici etkileri gösterilmiştir (110). Aynı yıl, vazorelaksasyon yaparak ve aterosklerotik plak gelişimini önleyerek kardiyoprotektif etkiler de gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Tüm bunlara ek olarak, Howitz ve arkadaşları, yaptıkları *in vitro* araştırmada RSV'nin mantarlarda yaşam süresinin uzattığını göstermişlerdir (111). Günümüzde RSV ile yapılmış olan 4000'den fazla araştırma makalesi bulunmaktadır ve bunların %95'ten fazlası son 10 yılda yapılmıştır.

2.5.1. Yapısal özellikleri:

Polifenoller; flavonoidler, antosiyaninler, fenolik asitler, lignanslar ve stilbenleri kapsayan bir antioksidan ailesidir (112). Tümü fenil alanin türevidir ve reaktif hidroksil grubu olan aromatik halka içerirler. Stilben fitoaleksin ailesi bitkileri UV ışınlarına, fungal enfeksiyonlara ve yaralanmalara karşı koruyan ve tümü RSV (fıstık ve üzümde bulunur) ve pinosilvin (ananasta bulunur) türevi olan 11 ayrı molekülü içerir (112).

RSV, doğada iki formda bulunur: *trans* ve *cis*-izomerleri (Şekil 8). *Trans*-izomeri doğada daha fazla bulunur; muhtemelen nonplanar şeklinden dolayı, *cis*-izomerinden daha aktiftir ve daha stabildir. UV ve yüksek pH ile *trans* izomeri *cis* izomerine dönüşürken görünür ışık ve düşük pH'da *cis* izomeri *trans* izomerine dönüşmektedir. Bu iki izomerin, molekülün vücutta dağılım ve metabolizmasını nasıl etkilediği bilinmemektedir.



Şekil 8. Resveratrolün *trans* ve *cis*-izomerlerinin yapısı

2.5.2. Kaynakları

Resveratrol ve analogları (piseatannol, pterostilben) üzüm *(Vitis vinifera)*, yer fıstığı *(Arachis hypogea)* ve "berries" (yabanmersini, cranberry) grubu meyveler gibi yaklaşık 72 bitki türü tarafından üretilirler ve insan diyeti ile tüketilirler. Resveratrolün ilk olarak üzümde var olduğu saptanmıştır. 1970'li yılların başlarında çok et tüketilen bir ülke olan Fransa'da kardiovaskuler hastalık sıklığının beklenenden az olduğu gözlemlenmiş ve bu durumun tüketilen kırmızı şarabın koruyucu etkisine bağlı olduğu sonucuna varılmıştır (Fransız paradoksu). Daha sonraki yıllarda Çin'de çay olarak içilen ve Çin ve Japon tıbbında cilt enfeksiyonları ile kalp-damar hastalıklarında kullanılan *Polygonum cuspidatum* (Ko-jo-kon: Itadori çayı) bitkisinin kurutulmuş köklerinde RSV bulunduğu tespit edilmiştir.

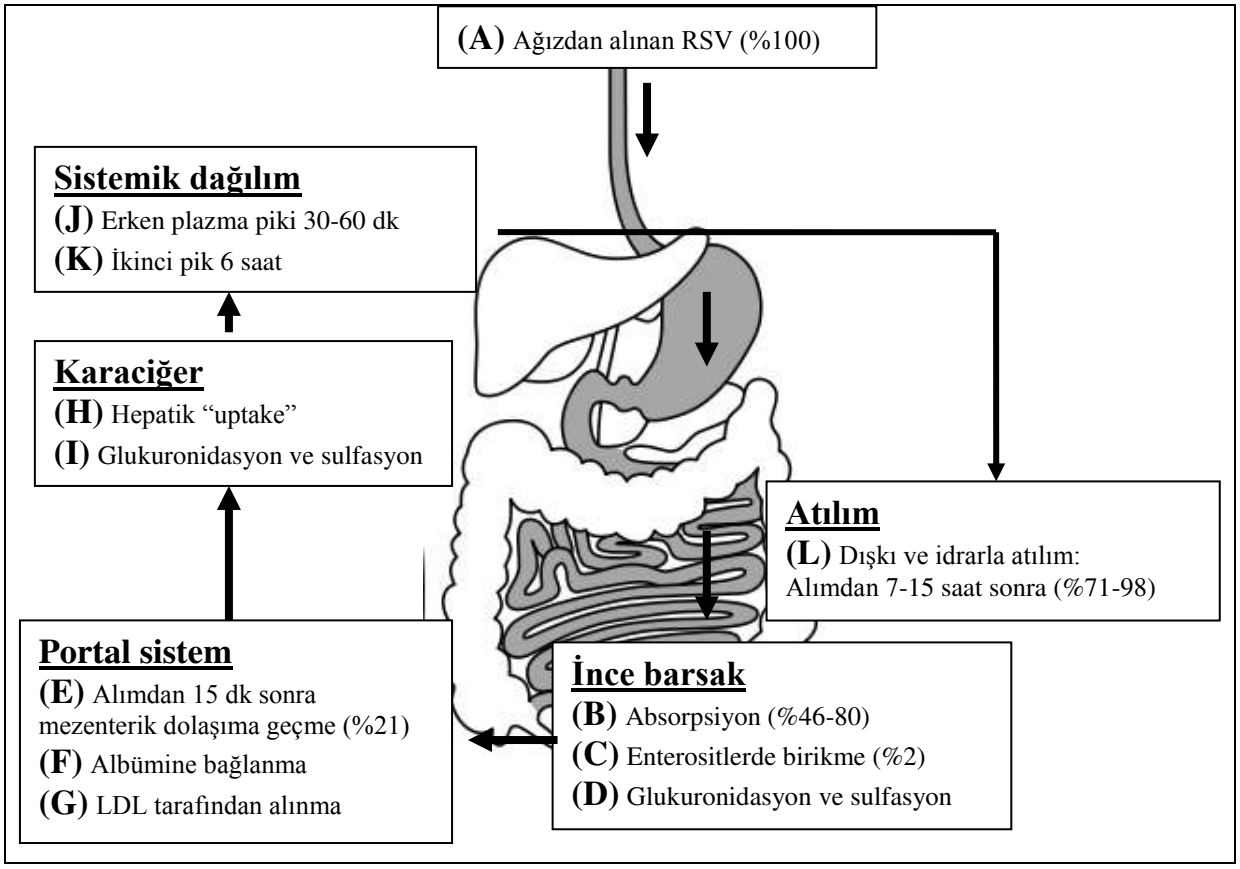
2.5.3. Diyetle alınan resveratrolün vücuttaki metabolizması

Ağızdan alınan RSV'nin emilimi, vücutta dağılımı ve biyoyararlanımı ile ilgili çok sayıda *in vitro* hücre kültürü, *ex vivo* izole ince barsak modelleri ve *in vivo* hayvan ve insan çalışmaları yapılmıştır. İnsan vücudundaki metabolizması ile ilgili pek çok bilgi bu verilerlerle topluca ortaya konmaktadır (113).

2.5.3.1. Emilim ve karaciğere taşınma

Ağızdan alınan RSV'nin fare ince barsak modelinde %46, farelerde %77-80 ve insanlarda %70 oranında absorbe edildiği gösterilmiştir (113,114) (Şekil 9). Emilim daha çok jejunumdan, az miktarda da ileumdan olmaktadır. Resveratrolün %2'si barsaklarda kalmakta ve emilmemektedir. İnsan duodenum örneklerinde ve insan Caco-2 intestinal hücre hattında yapılan çalışmalarda enterositlere alınan RSV'nin glukuronidasyon (*trans*-resveratrol-3- O-glukuronit) veya sulfasyon (*trans*-resveratrol-3-sulfat) ile konjuge forma dönüştürüldüğü ve sulfat konjugasyonunun RSV'nin ana yolağı olduğu gösterilmiştir (115). Konjuge RSV kana absorbe edilir veya intestinal lümene salınır.

Farelerde yapılan çalışmalarda RSV'nin mezenterik dolaşıma %21 oranında geçtiği saptanmıştır. Portal sistemde RSV albuminle ve LDL ile bağlanır ve daha sonra karaciğere alınır. Karaciğerde glukuronidasyon veya sulfasyon ile konjuge forma dönüştürülür.



Şekil 9. Ağızdan alınan resveratrolün vücuttaki dağılımı ve atılması (113,114).

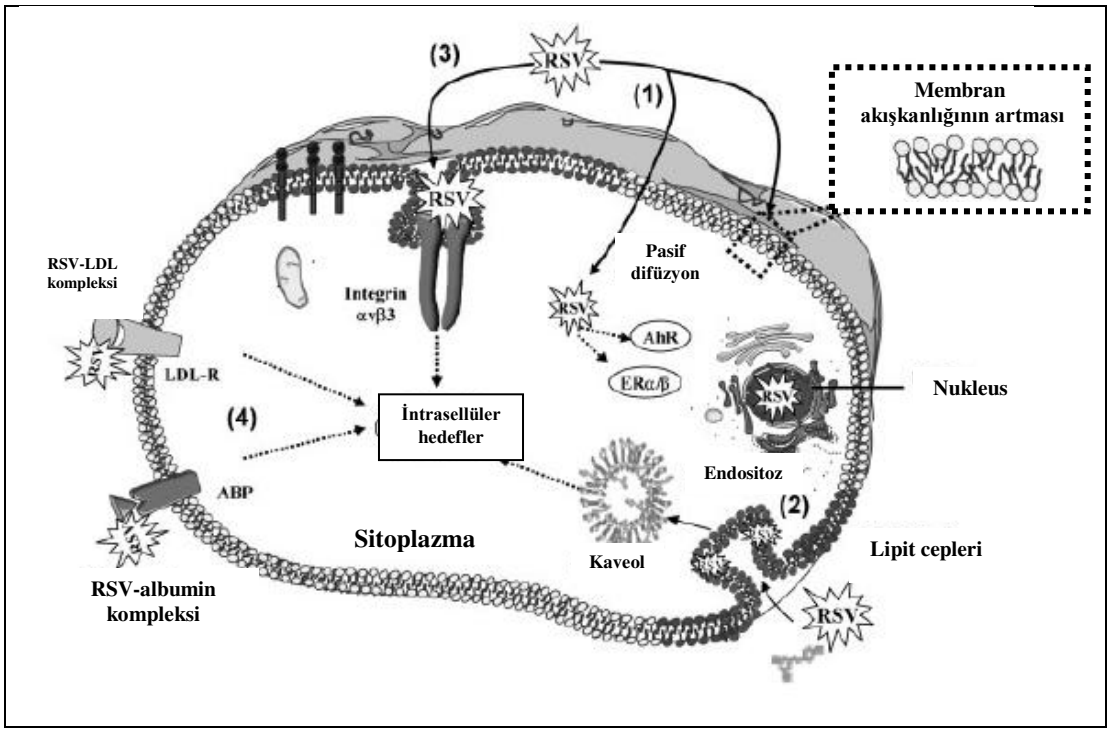
2.5.3.2. Resveratrolün hücre içine alınması

Resveratrolün hücre içine alınmasıyla ilgili bilgiler pek çok *in vitro* çalışma bulgularının birleştirilmesi yoluyla oluşturulmaktadır. Resveratrolün hücre yüzeyinde bir reseptörü olduğuna dair bir veri bulunmamaktadır (116). Hepatoblastoma HepG2 hücreleriyle yapılan çalışmalarda RSV'nin karaciğere iki mekanizma ile alındığı saptanmıştır: Düşük konsantrasyonda aktif taşıyıcılar, yüksek konsantrasyonda ise pasif difüzyon (117) (Şekil 10). Pasif difüzyonun büyük oranda membranın lipid kompozisyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir (118). Membranlarda bulunan lipidlerin özellikleri membranın akışkanlığını belirlemektedir. Membran akışkanlığı, hücre membranının reseptör, transport, fagositoz ve hücre büyümesi gibi fonksiyonlarında önemli roller oynamaktadır. Yapılan *in vitro* çalışmalarda kültür ortamında etanol ile çözünmüş olan RSV'nin membran akışkanlığını etkilediği ve hücre içine alınmasının arttığı saptanmıştır (119).

Resveratrol hücre içine, membrandan difüzyonla direkt alınabileceği gibi, lipid "raft"ları (cepleri) içinde de alınır ve bu taşınma sırasında o bölgede membran akışkanlığı

azalır (Şekil 10). Bu yöntemde RSV plazma membranına gelir, membran hücre içine doğru invajine olur ve RSV bu bölgede kalacak şekilde membrandan koparak hücre içine alınır. Bu oluşan membranla sarılı yapıya "caveolae" (kaveol) denir. Bu şekilde endositozla RSV hücre içine alınmış olur (118). Yang ve arkadaşları hepatosellüler kanser hücrelerinde yaptıkları çalışmada caveolin-1 (Cav-1) proteininin bu yapıyı oluşturan en önemli faktör olduğunu ve RSV'nin Cav-1 ekspresyonunu artırarak hücre içine taşınmasını kolaylaştırdığını saptanmışlardır (120).

İntegrinler, transmembran glikoprotein ailesidir ve hücre dışındaki kısımları reseptör görevi görür. Hücre içinde kalan bölgeler ise hücre iskeleti ile bağlantılıdır. İntegrin αvβ3, çok sayıda molekülün reseptörüdür. Lin ve arkadaşlarının insan meme kanseri hücre hattında yaptıkları çalışmada RSV'nin integrin αvβ3 molekülüne bağlanarak hücre içine alındığı, ERK1/2 yolağını aktive ettiği ve kanser hücrelerinde apoptozu uyardığı saptanmıştır (121).



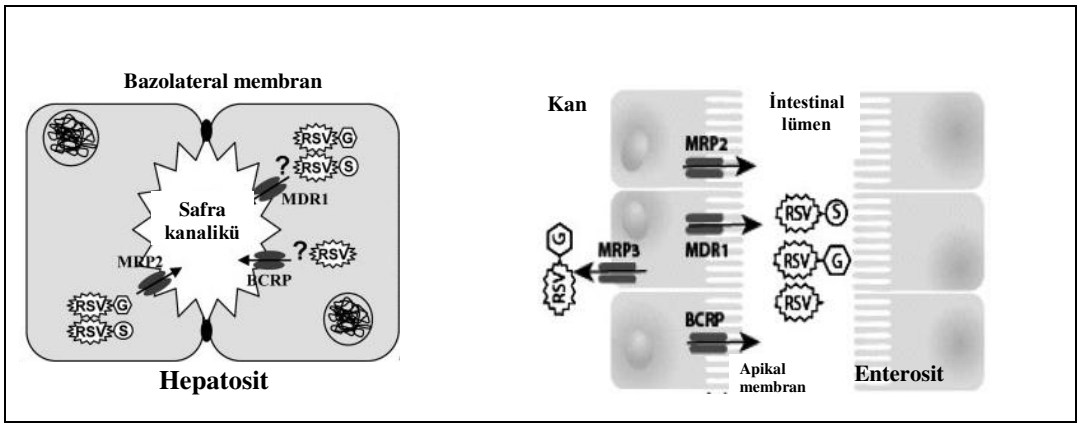
Şekil 10. Resveratrolün hücre içine alınması, hücre yüzeyi ve hücre içindeki reseptörlerine bağlanması (118). Resveratrolün hücre içine alınma yolları: (1) Pasif düfüzyon (2) Lipid cepleri yoluyla endositoz (3) lipid cepleri içinde integrin αvβ3 gibi reseptörlere bağlanma (4) Resveratrolün albumin veya LDL ile bağlanması hem hücre içine alınmasında hem de dağılımında önemli rol oynar. AhR ve ER: resveratrolün hücre içi reseptörleri.

2.5.3.3. Resveratrolün hücre içi reseptörlere bağlanması

Resveratrolün hücre içi reseptörleri ile ilgili veriler sınırlıdır (118). Resveratrolün hücre içinde taşınmasını sağlayan moleküllerden birisi AhR (aryl hydrocarbon receptor)'dir. Resveratrol, AhR'ne bağlanmak için digoksin ile yarışır ve AhR'nin nukleusa translokasyonunu sağlar. Ayrıca RSV yapısal olarak insan östrojen hormonuna benzer (fitoöstrojen) ve hücre içi östrojen reseptörlerine (ER-α ve ER-β) bağlanabilir (122). Ancak, reseptöre afinitesi östradiolden 7000 kat daha azdır (122). Hambrock ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, RSV'nin sulfanilüre reseptörüne bağlandığını, bu bağlanma için glibenklamid ile yarıştığını ve apoptozu indüklediğini göstermişlerdir (123). Resveratrol aynı zamanda prostat kanserinin gelişimi için önemli bir molekül olan androjen reseptörüne de bağlanabilmektedir (124).

2.5.3.4. Resveratrolün hücre dışına çıkarılması

Karaciğerde konjuge forma dönüştürülen RSV'nin dolaşıma verilebilmesi için hücre dışına çıkarılması gereklidir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda, ortamın sıcaklığının RSV'nin hepatositlerin dışına taşınma hızını etkilediği gösterilmiştir; 37^{o}C'de taşınma 4^{o}C'den dört kat daha hızlıdır. Bu da taşıyıcı aracılı sürecin transporter'lar yoluyla olduğunu düşündürmektedir (118). Resveratrol, ABC taşıyıcı ailesi tarafından hücre dışına çıkarılmaktadır. Bunlar arasında en önemlileri MRP (multidrug resistance-associated ptotein) ve BCRP (breast cancer resistance protein-ABCG2)'dir. CaCo2 barsak hücre hatlarında yapılan çalışmalarda, RSV-sulfatın hücrelerin apikal yüzlerinde bulunan MRP2 taşıyıcısı ile intestinal lümene taşındığı gösterilmiştir (115) (Şekil 11). Benzer şekilde hepatositlerde de MRP2 aracılığı ile RSV konjugatları lümene salınmaktadır (125) (Şekil 11). İntestinal hücrelerde MRP2'ye ek olarak apikal membranda MDR1 ve BCRP taşıyıcıları da lümene konjugatları taşırlar. MRP3 ise bazolateral membranda bulunur ve kana RSV glukuronidlerini taşır (Şekil 11).



Şekil 11. Resveratrol ve konjugatlarının hücre dışına çıkarılması (118). RSV-S (Resveratrol sulfat), RSV-G (Resveratrol glukonat)

2.5.3.5. Resveratrolün dolaşımda taşınması ve dokulara transportu

Resveratrol suda eriyebilirliği zayıf olan bir moleküldür. Bu nedenle hidrofilik konjugatlarına dönüşümü kana geçişini, vücutta dağılımını ve atılımını kolaylaştırır. Ayrıca plazmada yüksek konsantrasyonda kalabilmesi için de bağlı olması gereklidir. Resveratrol dolaşımda serum proteinleri, yağ asitleri ve lipoproteinlere bağlanır (118). Albümin pek çok molekül için iyi bir taşıyıcı plazma proteinidir. Yapılan çalışmalarda RSV'nin albumine bağlandığı ve bu şekilde plazma konsantrasyonunun sabit bir düzeyde tutulduğu saptanmıştır (126). Resveratrol albuminin yanı sıra daha az oranda hemoglobine de bağlanabilmektedir. Ancak kandaki hemoglobin düzeyi albuminden daha fazla olduğu için bu bağlanma da RSV'nin taşınması açısından önemlidir. Termodinamik çalışmalarda, RSV'ün albüminle hidrofobik etkileşime girdiği, hemoglobinle ise hidrojen bağıyla bağlandığı gösterilmiştir (126). Diğer kırmızı şarap antioksidanları gibi RSV de lipoproteinlerle birleşir. Yapılan çalışmalarda, LDL ile birleşen RSV'nin (RSV-LDL) karaciğerdeki LDL reseptörleri yoluyla hücre içine alımının kolaylaştığı saptanmıştır. Sağlıklı erişkinlere 250 mL kırmızı şarap içirildiğinde, 24 saat sonra alınan LDL örneklerinde serbest *trans*-RSV yanı sıra RSV'nin üç metaboliti de (*trans*-RSV-3-O-glukuronid, *cis*-RSV-3-O-glukuronid, *cis*-RSV-3-O-glukuzid) saptanmıştır (127). Resveratrolün kanda taşınması sırasında yağ asitlerinin albüminle bağlanmasında vektör görevi gördükleri, ayrıca karaciğer hücresine RSV alınmasını da kolaylaştırdıkları düşünülmektedir. Önce RSV yağ asitleri ile birleşir (RSV heksanoik asit gibi) ve bu yapı albuminle daha kolay bağlanır (128).

Rodent çalışmalarında plazmadaki pik konsantrasyonuna ağızdan alındıktan sonraki 30 dakikada ulaştığı gösterilmiştir. İnsanlarda plazmada ölçülen serbest RSV'nin, total dolaşımdaki RSV'nin %2'si veya daha azı olduğu saptanmıştır. Walle ve arkadaşları tarafından sağlıklı altı gönüllü erişkine ^{14}C ile işaretlenmiş RSV ağızdan (25 mg) ve daha sonra intravenöz yolla (0.2 mg) verilmiş ve metabolizması değerlendirilmiştir (114). Bu çalışmada, ağızdan RSV verildikten sonra dolaşımda ölçülen en yüksek iki pik değere; 1. saatte (total RSV: 2 μM) ve intestinal lümenden enterik resirkülasyon sonucu tekrar emilen RSV nedeniyle 6. saatte (total RSV: 1.3 μM) ulaşılmıştır (114). Daha sonra 72. saatte, plazma konsantrasyonu belirgin olarak düşük saptanmıştır. Resveratrol intravenöz olarak verildiğinde ise, birinci saatten itibaren belirgin olarak plazmadan temizlendiği ve ikinci pikin gözlenmediği saptanmıştır (114). Bu çalışmada, idrarda saptanan RSV metabolitlerinin %37'si sulfat, %19'u glukuronid konjugatları, diğer kalan kısım ise bilinmeyen metabolitler olarak ölçülmüştür. Goldberg ve arkadaşları da 12 gönüllüye 25 mg RSV vermişler ve en yüksek total ve serbest RSV konsantrasyonunu (sırasıyla, 2 μM ve 40 nM) 30. dakikada ölçmüşlerdir (129). Bu çalışmada, *in vitro* deneylerde kullanılan ve hasar modellerinde etkili bulunan RSV dozunun 5-100 nM olduğu ve insanlarda yapılan bu çalışmada ulaşılan plazma serbest RSV konsantrasyonlarının bu dozlardan çok düşük olduğu sonucuna varılmıştır (129). Daha sonra Boocock ve arkadaşları tarafından yapılan ve 10 sağlıklı gönüllüye 5 gram RSV'nin ağız yoluyla verildiği çalışmada pik plazma düzeyi 2 μmol/L (~2360 nM) olarak bulunmuştur (130). Ancak bu çalışmada, *in vitro* yapılan çalışmalarda RSV'nin antikanser etkisinin 5 μmol/L dozunda olduğu, ancak insanlarda kullanılan yüksek dozların bu düzeye ulaşamadığı belirtilmiştir. Resveratrolün plazma konsantrasyonunun istenilen değerlere ulaşamaması, molekülün çözünürlüğünün az olmasına bağlanmaktadır.

2.5.3.6. Resveratrolün organlara dağılımı

Ratlarda yapılan çalışmalarda RSV'nin özellikle karaciğer ve böbreklerde biriktiği gösterilmiştir (131). Farelere oral yolla RSV verildiğinde intestinal bir birikimin olduğu, bunun da emilmeyen RSV nedeniyle olabileceği belirtilmiştir (132). İnsan kolon hücre hattı CaCo2 hücrelerine RSV verildiğinde, kültür ortamı ile karşılaştırıldığında hücrelerde birikimin 40 kat fazla olduğu saptanmış ve bu bileşiğin en önemli hedef hücresinin kolositler olabileceği yorumu yapılmıştır (115). Ayrıca ağız mukoza hücrelerinde de birikim fazla olmaktadır ve oral mukoza kanserlerine karşı korunmada da etkili olabileceği belirtilmektedir.

2.5.3.7. Resveratrolün vücuttan atılımı

Hem hayvanlarda hem de insanlarda böbrekler, RSV'nin vücuttan atılımının en önemli yoludur. Hayvan modelinde resveratrolün böbreklerden atılımının saatler içinde başladığı ve 12-24 saat sonra arttığı gösterilmiştir. Walle ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ağızdan RSV verildiğinde, idrarla tüm aktivitenin %53.4–84.9'unun atıldığı, dışkı ile atılımın ise çok değişkenlik gösterdiği (%0.3-38.1) gözlenmiştir (114). Bu çalışmada, RSV intravenöz yolla verildiğinde ise, idrarla (%42.3-83.2) ve dışkı ile atılımın azaldığı (%0.6-22.7) saptanmıştır.

2.5.4. Resveratrolün etkilediği sinyal ileti yolları ve hastalıklar üzerine etkileri

Resveratrolün çok önemli antikanser, kardiyoprotektif, anti-enflamatuvar, antioksidan ve sitoprotektif etkileri bulunmaktadır. Bu etkilerini hücre sinyal sistemi, enzimatik yolaklar, apoptozis veya gen ekspresyonlarını düzenleyerek göstermektedir (3) (Tablo 4).

Enflamasyon, kanser ve kardiyovasküler sistem hastalıkları: Resveratrolün *in vivo* çalışmalarda karsinogenezisi farklı aşamalarda bloke ettiği gösterilmiştir. Resveratrol, kanser patogenezinde rol oynayan pek çok molekül ve sinyal ileti yolağı üzerinde etkisi olduğundan, ideal bir antikanser ilaç olarak değerlendirilmekte ve bu konuda çok fazla sayıda çalışma yapılmaktadır (133). Resveratrol öncelikle pek çok kanser türünde hücre bölünmesini G1/S fazında durdurur. Bu etkisini farklı kanser hücrelerinde yapılan çalışmalarda p21WAF1 ve p27KIP1 indüksiyonu ve siklin D1/D2/E, Cdks2/4/6 downregulasyonu yaparak gösterdiği saptanmıştır (134-136). Benzer şekilde, Cdk7 ve p34Cdc2 kinazları inhibe ederek hücre siklusunu G2/M fazında ve S fazında bloke eder. Medulloblastoma hücrelerinde bulunan c-MYC onkogenini baskılar ve hücreyi S fazında durdurur (137). Bunun yanında RSV, tümör hücresinde apoptozu artırır (Tablo 4). ERK ve p38MAPK aracılığı ile p53'ü uyarır ve bu yolla p53 duyarlı genlerin (p21WAF1, p300/CBP, APAF1, Bak) ekspresyonunu indükleyerek Bcl2 baskılaması yapar, hücreyi apoptoza götürür (135,138). MMP tip 2 ve 9, damar duvarındaki tip IV kollajeni parçalarlar; tümör metastazları ile ilgilidirler; AP-1 ve NF κB ile aktive edilirler. Resveratrol hem direkt olarak, hem de AP-1 ve NF κB yolağını bloke ederek MMP aktivitesini azaltır (133). Resveratrolün antikanser etkisinin moleküler düzeyde gösterilmesinin yanı sıra, insanlar üzerinde yapılan klinik deneyler de bu etkinliği doğrulamaktadır. Örneğin, 319 hastayı kapsayan bir çalışmada günlük kırmızı şarap tüketimi ile akciğer kanseri gelişme riski arasında negatif korelasyon saptanmıştır (139).

Kronik enflamasyon, kanserin yanı sıra, kardivasküler (ateroskleroz), pulmoner ve nörolojik hastalıklara da neden olmaktadır. Siklooksijenaz 2 (COX-2), araşidonik asiti prostaglandinlere çeviren hız sınırlayıcı enzimdir. Bu enzim proinflamatuvar sitokinler ve onkogenler tarafından uyarılır. Resveratrol MKP5'i uyararak ve NF κB'yi inhibe ederek COX-2 üretimini baskılar. Ayrıca, enflamasyon ve ateroskleroz sürecinde rol alan lökotrien 4 ve MMP üretimini azaltır. Trombositlerin içindeki kalsiyum miktarını azaltarak trombosit agregasyonunu inhibe eder. Ayrıca, trombosit içindeki kaspaz 3,8 ve 9'u aktive eder ve trombositlerde apoptozu artırır (51). Bu yollarla da aterosklerozu önler. Yapılan *in vivo* çalışmalarda, resveratrolün serum trigliserit ve LDL-kolesterol düzeylerini düşürdüğü ve LDL oksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (140). Resveratrol, hem HMG-CoA reduktaz enzimini inhibe ederek kolesterol biyosentezini azaltır, hem de HDL-kolesterol düzeyini artırır ve ters kolesterol taşınmasını uyarır. Lipoprotein metabolizmasındaki bu etkileri de kardiyoprotektif özelliklerine katkıda bulunur (51).

Yaşlanma: Yapılan çalışmalarda, RSV'nin farelerin ömrünü uzattığı gösterilmiştir. Resveratrol bu etkisinin önemli bir kısmını sirtuinleri ve PGC-1α (peroxisome-proliferator-activated receptor co-activator)'yı aktive ederek göstermektedir. Bu moleküller mitokondrileri uyarır ve genel hücre metabolizmasını etkilerler (51).

Nörodejeneratif hastalıklar ve iskemi: Rat hippokampal nöron hücre kültüründe yapılan bir çalışmada resveratrolün Alzheimer hastalığının (AH) patogenezinde önemli bir protein olan β-amiloid peptit (βA) birikimini önlediği, bu amaçla protein kinaz C yolağını kullandığı ve histopatolojik olarak da AH bulgularını düzelttiği gösterilmiştir (141). Bunun dışında RSV nöron hücrelerini Sirt-1 aktivasyonu, apoptozun önlenmesi, ROS'un azaltılması ve NF κB inhibisyonu ile de korumaktadır (142). Klinik çalışmalarda da haftada bir veya iki kez içilen kırmızı şarabın 65 yaş üstü bireyleri demanstan koruduğu gösterilmiştir (143). Demans dışında inme, Hunthington hastalığı, AML ve Parkinson hastalığı gibi diğer nörodejeneratif hastalıklarda da RSV'nin etkinliği gösterilmiştir (142). Serebral iskemi modeli oluşturulan ratlara resveratrol verildiğinde, hasarın daha az olduğu ve bu etkinin Sirt-1 yoluyla ve mitokondrial "uncoupling protein (UCP2)" inhibisyonu aracılığı ile ortaya çıktığı saptanmıştır (144). Hem fare kortikal nöronları hücre kültüründe hem de *in vivo* olarak I-R inme modeli uygulandığında, resveratrolün koruyucu etkisinin HO-1 yoluyla olduğu da gösterilmiştir (145).

Tablo 4. Resveratrol tarafından aktive veya inhibe edilen sinyal yolakları (3).

Hastalık	Hücre sinyal yolağı	Organ / hücre / aktivite
Apoptozis	MAP kinaz	İnsan meme kanser hücre hattı MCF-11
	Seramid	Meme kanser hücreleri
	STAT3 ve NF κB düzenlenmesi	İnsan multiple myeloma hücreleri
	Protein kinazlar ve p38 kinaz	Antitümör aktivitesi
	Src ve STAT3	Meme kanseri
	ASK1 / JNK'nin Cdc42 aktivasyonu	İnsan lösemi hücreleri
	PI3K aktivasyonu	İnsan prostat kanser hücreleri
	AMPK	Kolon kanser hücreleri
	c-Myc	Medulloblastoma hücrelerinde "downregulasyonu"
	ERK	p53 bağlı apoptozun başlaması
	Kaspaz-3	İnsan meme kanser hücreleri
	CD95	İnsan tümör hücreleri
	p53 ve PI3K/Akt	İnsan T-hücre akut lösemi hücreleri
Kanser	NF κB ve Ap-1	Genler
	p38, MAPK, p53 ve p21	Kanser hücreleri
	NFα aracılı MMP-9 ekspresyonu	Hepatosellüler kanser hücreleri
	TRAIL aracılı gen ekspresyonu	Melanoma
	STAT3	Medulloblastoma hücre hattı
	MAPK	İnsan meme kanser hücreleri
	NF κB	Kardiyovaskuler, nörolojik ve mitokondriyal disfonksiyon
	ATM / ATR-Chk1/2-Cdc42	Over kanseri hücreleri
	Rac ve Cdc42	Meme kanser hücreleri
Enflamasyon	NF κB	Glutatyon biyosentezi
	IL-6 aracılı ICAM-1	Endotel hücrelerinde gen ekspresyonu
	PI3KK / Akt / ERK aracılı IL-17	Fare kalp fibroblast hücreleri
	TNFα	Endotel hücreleri
	NF κB ve AP-1	Fare cilt hücreleri
Kalp	AMPK	H9c2 kalp kası hücreleri
	NF κB	Koroner arter endotel hücreleri
	p38 MAPK	HO-1 aracılı mekanizma
	Bcl-2	Adenozin A_3 reseptör aktivasyonu
	Akt / protein kinaz B	Anjiotensin-II aracılı protein supresyonu
Diğer	Nrf2	Sigara içimi ilişkili oksidatif stres
	Sirt1-AMP kinaz	Alkolik karaciğer hastalığı
	AMPK	Antidiyabetik
	Ras	Sirtuinleri stimule eder ve ömrü uzatır
	NF κB, STAT3, HIF-1α	Transkripsiyon faktörlerini aktive eder
	NF-E2	HO-1 gen ekspresyonu

Resveratrolün antioksidan etkisi: Resveratrol hem serbest radikal yakalayıcısıdır hem de çeşitli antioksidan enzimlerin aktivitesini attırma yeteneği olduğu için potansiyel antioksidandır. Resveratrolün direkt antioksidan etkisi aşağıda gösterilmektedir (Bu reaksiyonda Res-$(OH)_3$ resveratrolü, R• ise serbest radikali temsil etmektedir) (146):

$$\text{Res-(OH)}_3 + \text{R}\bullet \rightarrow \text{Res-(OH)}_2\text{O}\bullet + \text{RH}$$

Bu formülde gösterilen resveratrol radikalinin RSV'nin aromatik halkası üzerinde bulunduğu düşünülmektedir (146). Resveratrolün antioksidan etkinliğini, serbest radikal yakalama özelliğinden daha çok endojen antioksidan ve sitoprotektif enzimi uyararak gösterdiği saptanmıştır (147). Bu enzimler arasında süperoksit dismutaz, katalaz, tiyoredoksin, glutatyon peroksidaz, glutatyon-5-transferaz, glutatyon reduktaz ve HO-1 bulunmaktadır.

Resveratrol, endotel de dâhil olmak üzere pek çok hücrede sirtuin1'in (Sirt1) direkt aktivatörüdür. Resveratrol Sirt1 yoluyla NF κB'yi inhibe eder (148). Reaktif oksijen türleri enflamasyon, ateroskleroz ve kanser gelişimi üzerine etkilerini NF κB'yi uyararak gösterirler. Bu nedenle, NF κB'nin inhibisyonu RSV'nin antioksidan etkisini gösterdiği yollarından birisidir. Resveratrol ayrıca, Sirt1'in aktivasyonu ve TNF-α'nın inhibisyonu ile mitokondride NADPH oksidaz aktivitesini baskılar ve mitokondriyal ROS üretimini azaltır (149).

Resveratrol, antioksidan ve sitoprotektif etkilerinin bir kısmını Nrf2'yi aktive ederek göstermektedir. Bu etki pek çok farklı hücre hattında (PC12 hücreleri, akciğer epitel hücreleri, astrositler, hepatositler, keratinositler, vasküler düz kas hücreleri, koroner arter endotel hücreleri) ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir (4-11,150). Resveratrolün insan endotel hücresinde Nrf2'yi mRNA veya protein düzeyinde artırıcı yönde etkilediğine dair yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın tipi

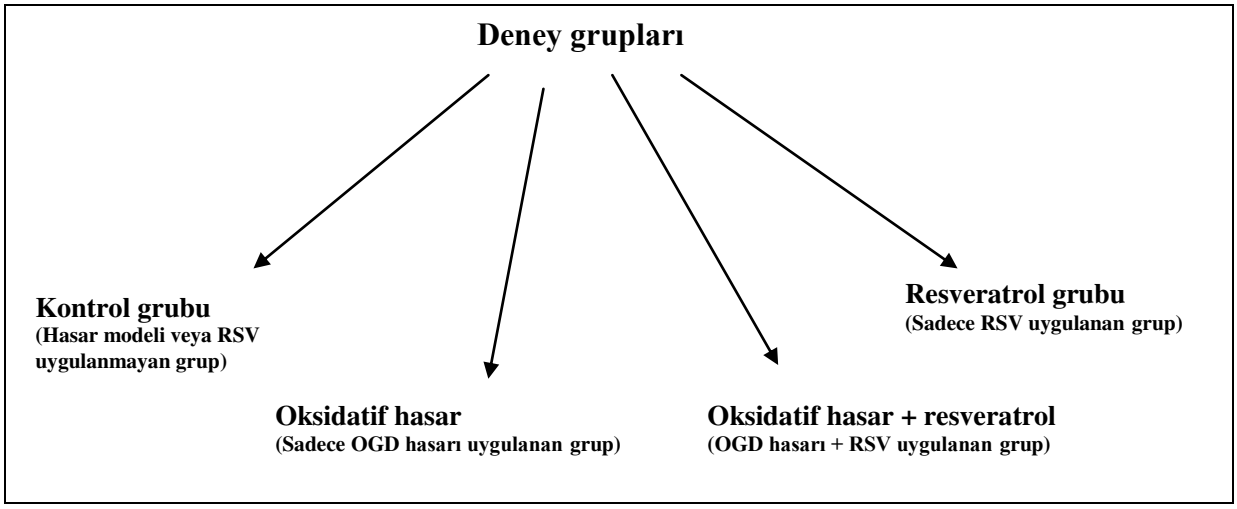
Araştırma, deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı

Araştırma Haziran 2006-Ocak 2010 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda (ARLAB) gerçekleştirildi.

3.3. Araştırmanın evreni ve örneklemi/çalışma grupları

Bu çalışmada önce *in vitro* insan beyin mikrovasküler endotel (human cerebral microvascular endothelial-HCMVE) hücre kültüründe oksijen glukoz deprivasyonu (OGD) + RGE (reoksijenasyon + ortama glukoz eklenmesi) ile oksidatif hasar modeli oluşturuldu; bu amaçla ROS oluşumu ölçüldü. Daha sonra RSV'nin olası koruyucu etkisi test edildi. Bu kapsamda önce RSV'nin ROS oluşumu üzerine, daha sonra da Nrf2 protein ekspresyonu üzerine olan etkileri değerlendirildi. Şekil 12'de deney grupları gösterilmektedir. Tüm deney gruplarında, gerek OGD süresi gerekse RSV dozu için değişik koşullar denendi ve ROS ölçümü yapıldı.



Şekil 12. Çalışmamızda oluşturulan deney grupları OGD: oksijen glukoz deprivasyonu RSV: resveratrol

3.4. Çalışma materyali

Araştırma materyali olarak ticari olarak üretilen insan beyin mikrovasküler endotel hücreleri (Clonetics Corporation, ACBRI 376, Kirkland WA, USA) kullanıldı. Bu hücreler, büyüme faktörü ve %10 serum içeren CSC Certified, CS-C Complete Medium (Cell Systems Corporation) kültür ortamı içinde üretildi. Hücre kültürlerinin pasajlanmasında PBS (Biochrom Seromed), tripsin/EDTA ve FBS (fetal bovine serum) kullanıldı. Çalışmalara başlayıncaya kadar hücre hattı sıvı nitrojen tankında (-180 ^{o}C'de) saklandı. Bölüm 3.6.1.'de tanımlanan uygulama basamakları doğrultusunda hücreler çözüldü. Hücreler için önerilen ekim yoğunluğu 5000 hücre/cm^2 olarak uygulandı. Pasajlama sırasında hücrelerin kültür plağının cidarına tutunabilmesi için hücreler yeni plağa aktarılmadan önce plak yüzeyi ekstrasellüler matriks komponentlerini içeren solusyon (CSC Certified, Attachment Factor, Cell Systems Corporation) ile kaplandı. Hücreler çözüldükten sonra üretilme aşamasında 37^{o}C'de, %5 CO_2 sağlayan enkübatörde (Heraus, Hera Cell) ve yukarıda tanımlanan kültür ortamında (CSC Certified, CS-C Complete Medium) bekletildiler. Hücrelerin sayımı ve canlılığın değerlendirilmesi için tripan mavisi canlılık testi kullanıldı. Kültür plaklarındaki hücreler %80-85 sıkışıklığa eriştiğinde (yaklaşık 5-9 günde bir) tripsin/EDTA çözeltisi ile kültür kaplarından kaldırılarak 1:3 oranında pasajlandı. Tüm deneyler, hücreler 6-9. pasajlar arasındayken gerçekleştirildi. Western blot analizleri için 75 cm^{2}'lik kültür plaklarına, ROS analizleri için ise 96 kuyucuklu plaklara ekilen hücreler kullanıldı. Oksijen glukoz deprivasyonu deneyleri için Ca^{++} ve Mg^{++} içeren PBS (PBS [w/Ca^{++}, w/Mg^{++}]) (fosfat tampon tuzu**:** 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM sodyum fosfat dibazik, 2 mM potasyum fosfat monobazik, pH of 7.4) (Biochrom Seromed), ROS ölçümü için 3'- (p-aminofenil) floresin (APF) ve 3'- (p-hidroksifenil) floresin (HPF) floresan probları (Invitrogen) kullanıldı.

3.5. Araştırmanın değişkenleri

Çalışmanın ilk basamağı olan HCMVE hücrelerinde OGD + RGE modeli ile ROS oluşumunun incelenmesi aşamasında "bağımlı değişken" ROS, "bağımsız değişken" ise OGD + RGE modelidir. Daha sonra RSV'nin olası koruyucu etkisi test edildi. Bu kapsamda önce RSV'nin ROS oluşumu üzerine, daha sonra da Nrf2 protein ekspresyonu üzerine olan etkileri değerlendirildi. Bu deneylerde "bağımsız değişken" resveratrol, bağımlı değişkenler "ROS" ve "Nrf2"dir.

3.6. Veri toplama araçları

3.6.1. Hücrelerin çözülmesi

Sıvı nitrojen tankında saklanan hücreler sırasıyla aşağıdaki basamaklar uygulanarak çözüldü:

- Ekimden önce 1 mL/5 cm^2 hacimde kültür ortamı 37^oC' de, %5 CO_2 enkübatöründe en az 30 dakika süreyle bekletildi.
- HCMVE hücreleri 37°C su banyosunda çözüldü.
- Hücre süspansiyonu üzerine serumlu ortam eklenerek nazikçe pipetaj yapıldı.
- Kültür plaklarının yüzeyi "Attachment Factor" ile kaplandı
- Hücre sayımı yapıldıktan sonra, önceden kültür ortamı konmuş bulunan kültür kaplarına 5000/cm^2 yoğunlukta ekim yapıldı.
- Faz-kontrast mikroskobunda (Olympus,CK40) incelenen hücreler enkübatöre alındı.
- Kültür ortamı ekimin ertesi günü ve ardından iki günde bir taze kültür ortamıyla değiştirildi.

3.6.2. Hücre sayımı ve tripan mavisi canlılık testi

Hücre sayımı için "tripan mavisi canlılık testi" kullanıldı. Testin ana prensibi, canlı hücrelerin membran bütünlüğüne sahip olmaları nedeniyle tripan mavisini geçirmemeleri ve sarı renkte görünmeleri; buna karşın hücre membranı zarar görmüş hücrelerin ise, tripan mavisini hücre içine almaları ve stoplazmanın boyanarak mavi renkte görünmesidir (151).

Bu test için uygulanan basamaklar aşağıda özetlendi ve hücre sayımı "Thoma" lamında yapıldı:

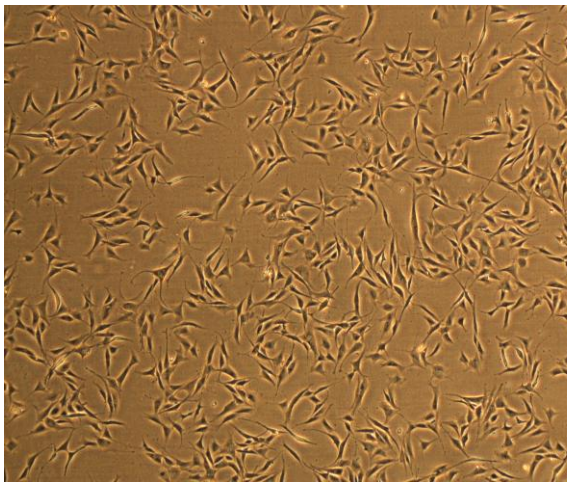
- Önce kültür plağındaki hücreler kaldırıldı. Bu amaçla aşağıdaki basamaklar uygulandı:
    - Kültür plağından ortam uzaklaştırıldı.
    - 25 cm^2 lik flask için 4 mL PBS tampon ile hücreler yıkandı.
    - 2 mL tripsin eklendi ve 37^oC'de enkübatörde 2-3 dakika tripsin aktivasyonu için bekletildi.
    - Tripsin, 2 mL FBS eklenerek nötralize edildi.
    - Hücreler ve ortam 15 mL'lik tüplere alındı.
- 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj (Eppendorf, 5810R) edildi.
- Çöken hücrelere taze ortam eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Thoma lamı hazırlandı. Lam üzerine lamel kapatıldı.
- Eppendorf tüpüne 1:1 oranında %0.4'lük tripan mavisi (Sigma T-6146) solüsyonundan eklendi. Homojenize edildi ve 6 dakika beklendi.
- Homojenize solusyondan 25 μL alınarak lam ile lamel arasına sızdırıldı.
- 20-30 saniye bekletildi.
- Faz-kontrast mikroskobu (Olympus, CK40) yardımıyla canlı hücreler ve ölü hücreler sayıldı.
- Mililitredeki ölü ve canlı hücre sayılarını belirlemek için "sayılan hücre miktarı x dilüsyon oranı x 10000" formülü kullanıldı (10000 sayısı, 0.1 mm^3 deki sayım sonucunu 1 mL'deki sayıya dönüştürmek ve standart veri elde etmek için kullanılan bir değişmezdir).

3.6.3. Hücrelerin pasajlanması

Kültür plaklarındaki hücreler %80-85 sıkışıklığa eriştiğinde (Şekil 13'te pasaja hazır HCMVE hücrelerinin resmi görülmektedir) aşağıdaki basamaklar uygulanarak pasaj yapıldı:

- Kültür kabındaki eski kültür ortamı steril bir pipetle çekildi ve atıldı.
- Kültür ortamında bulunan ve tripsinin etkisini inhibe edebilecek olan serumu uzaklaştırmak amacıyla kültür kabı 4 mL PBS tampon ile nazikçe yıkandı.
- 2 mL tripsin/EDTA eklendi ve 37^{o}C'de enkübatörde 2-3 dakika tripsin aktivasyonu için bekletildi.
- Tripsin, 2 mL FBS eklenerek nötralize edildi.
- Hücrelerin yüzeyden ayrıldığından emin olmak amacıyla mikroskopta kontrol edildi.
- Hücreler ve ortam 15 mL'lik mavi kapaklı tüplere alındı.
- 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst faz atıldı.
- Hücre peleti 1 mL ortamla dilüe edildi.
- Hücre süspansiyonundan 20 µL alınarak eppendorf tüpüne aktarıldı. Tripan mavisi canlılık testi ile hücrelerin sayımı yapıldı.
- Kültür plaklarının yüzeyi "Attachment Factor" ile kaplandı.
- 5000/cm^2 olacak şekilde hücre ekimi yapıldı.
- Enkübatöre konuldu ve ortamları iki günde bir değiştirildi.

a)



b)

Şekil 13. HCMVE hücrelerinin faz-kontrast mikroskobik görüntüsü (4X). **a)** Pasaja hazır P3 hücreler, **b)** Pasaj sonrası hücrelerin görünümü

3.6.4. Deneysel çalışmalar

Araştırmamızda önce H-R hasarı modeli geliştirildi. Bu amaçla OGD + RGE kullanıldı. OGD hasarının HCMVE hücrelerinde reaktif oksijen türleri oluşumuna etkisi araştırıldı. Bu çalışmalara ek olarak hipoksik ortamın oluşturulduğunun bir göstergesi olarak Western blot yöntemi ile HIF -1α protein ekspresyonu araştırıldı.

İkinci basamakta resveratrolün farklı dozlarının bu modelde HCMVE hücrelerinde ROS oluşumu üzerine olası koruyucu etkileri araştırıldı.

Son olarak da resveratrolün Nrf2 protein ekspresyonu üzerine etkisi araştırıldı.

Standardizasyonun sağlanması amacıyla, aynı deney düzeneğinde ROS deneyleri 6'lı gruplar formatında, Nrf2 ve HIF-1α protein ekspresyonu deneyleri 3'lü gruplar formatında çalışıldı. HIF-1α deneyi bir kez yapıldı, diğer deney düzenekleri üçer kez tekrarlandı.

3.6.4.1. Oksijen glukoz deprivasyonu ve ROS oluşumu deneyleri

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 (152-155). Bu çalışmaların çoğunluğu iskemi modeli olarak hipoksiyi uygulamakla beraber, bazıları iskemi sürecinde glukoz da hücrelere ulaşamadığından ortamdan glukozu da uzaklaştırmaktadır (oksijen glukoz deprivasyonu-OGD) (152-153). Mascerono ve arkadaşları (152) 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 gözlemlemişlerdir. Therade ve arkadaşları da (153) HUVE hücrelerinde 2 saat OGD ve ardından 1 saat reoksijenasyon + ortama glukoz eklenmesi (RGE) modelini kullanmışlardır. OGD + RGE uygulaması ile reaktif oksijen türlerinin 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 nedenle bu araştırmada H-R hasar modeli olarak, hipoksinin yanı sıra, *in vivo* koşullara daha yakın olduğu için glukozun da ortamdan uzaklaştırıldığı OGD modeli kullanıldı (153,156-160).

3.6.4.1.1. "Oksijen glukoz deprivasyonu (OGD)" ve "Reoksijenasyon + glukoz eklenmesi (RGE)" modelinin uygulaması

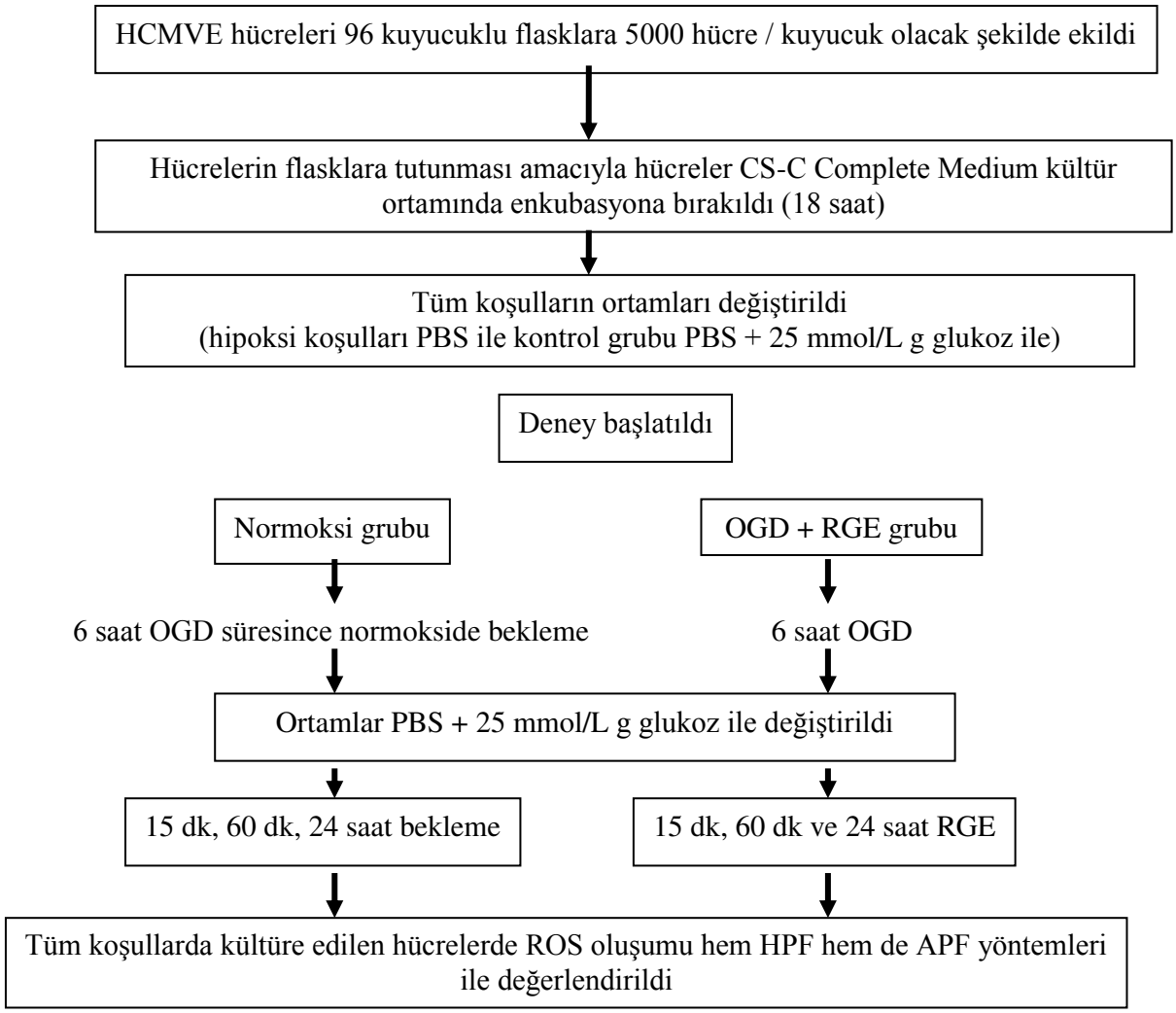
Altı saatlik OGD uygulamasını takip eden farklı zaman aralıklarındaki reoksijenasyon sürelerine (15 dakika, 60 dakika ve 24 saat) maruz kalan HCMVE hücrelerinde ROS üretiminin ölçülmesi amaçlandı. Çalışma, normoksi (kontrol) ve "OGD + RGE grubu" olmak üzere iki koşulda yapıldı. Tüm koşullar "altılı" olarak çalışıldı ve ROS ölçümleri için yapılan deneyler üç kez tekrarlandı.

Deneyin başlamasından 18 saat önce HCMVE hücreleri 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ve her koşul 12'şerli olarak siyah 96 kuyucuklu plaklara ekim yapıldı (Her koşulda 6 kuyucuk APF için, 6 kuyucuk HPF için). Tüm koşullar ayrı plaklara ekildi. Aynı zamanda hücrelerin durumunu mikroskopta değerlendirebilmek için 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde şeffaf 96 kuyucuklu plaklara da ekim yapıldı. Kuyucuklara 200'er µL kültür ortamı eklendi.

Hücrelerin ekilmesinden 18 saat sonra kuyucuklardaki hücreler mikroskopta incelendiğinde yaklaşık %80 sıkışık oldukları gözlendi. Tüm koşulların 200'er µL 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 µL olmak üzere, hipoksi (OGD + RGE) plağına PBS (PBS [w/Ca^{++}, w/Mg^{++}]), normoksi (kontrol) plağına ise "PBS [w/Ca^{++}, w/Mg^{++}] + 25 mmol/L glukoz içeren ortam" eklendi. Bu aşamadan sonra normoksi plağı 37ºC'deki enkubatöre konuldu. Hipoksi plağı ise, hipoksi odacığına (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 düştükten 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 + RGE plağı, hipoksi odacığının içinde yerleşik olarak, 37ºC'deki enkubatöre kaldırıldı.

Altı saatlik OGD süresi tamamlandıktan sonra tüm koşulların ortamları çekilerek yerine 25 mmol/L glukozlu PBS [w/Ca^{++}, w/Mg^{++}] konuldu. 15 dakika, 60 dakika ve 24 saatlik enkubasyondan sonra ROS ölçümü yapıldı.

Yapılan deneylerin akış planı Şekil 14'te gösterilmektedir.



Şekil 14. Hipoksi-reoksijenasyon modelinin reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu üzerine etkisinin incelendiği deney akış çizelgesi. (OGD: oksijen glukoz deprivasyonu, RGE: reoksijenasyon + glukoz eklenmesi)

3.6.4.1.2. Reaktif oksijen türlerinin ölçümü

Endotel hücre kültürlerinde OGD + RGE uygulamasının hücrelerdeki ROS oluşumu ve resveratrolün ROS oluşumunun üzerine etkisi floresan problar kullanılarak florometrik yöntemle değerlendirildi (161). Bu amaçla, APF ve HPF probları kullanıldı. Bu yöntem floresan olmayan APF ve HPF'nin özellikle hidroksil, peroksinitrit ve hipoklorit radikalleri ile tepkimeye girmesi sonucu oluşan parlak yeşil floresansın ölçümü esasına dayanmaktadır. APF ve HPF floresan probları spesifik ve ışığa maruz kaldığında otooksidasyona dirençlidir. Bu nedenle ölçüm için bu problar seçildi.

Deney basamakları aşağıda verilmiştir:

- Deney tamamlandıktan sonra her koşula 10 μM, 2 μL APF veya HPF eklendi, plak aluminyum folyo ile kaplandı ve 30 dakika 37°C'de inkübe edildi.
- Kuyucuklar 200 μL PBS ile yıkandı
- Floresan ölçüm için cihaz duyarlılık ayarları plağımızdaki en yüksek sinyal alınabilecek örneğe göre ayarlanarak floresan ölçüm aralığı 15000 AU ve 25 AU olarak uygulandı.
- Fluoresans şiddeti 485 nm eksitasyon ve 528 nm emisyon dalga boylarında multiplak okuyucuda (Synergy HT, Multi-Detection Microplate Reader, BIO-TEK Instruments Inc, USA) ölçüldü (161).

3.6.4.1.3. Resveratrolün reaktif oksijen türlerinin oluşumu üzerine etkisinin değerlendirilmesi

A. Resveratrolün hazırlanması:

- -20^{o}C'de saklanan RSV (Sigma R 5010, Stok 5 mM) şişesinden 10 mg tartıldı
- 8.75 mL %96'lık etanol eklendi
- Hazırlanan karışım 100'er μL'lik PCR tüplerine bölüştürülerek +4^{o}C'de bir ay boyunca saklandı.
- Geriye kalan RSV stok şişesi -20^{o}C'ye kaldırıldı
- Deneylerde kullanılacak RSV dozları (0.1, 1, 10, 50 ve 100 μM) deney sabahı hazırlandı.

B. Resveratrol, oksijen glukoz deprivasyonu ve reaktif oksijen türleri oluşumu

Deneyin başlamasından 18 saat önce HCMVE hücreleri 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ve her koşul 12'şerli olarak siyah 96 kuyucuklu plaklara ekim yapıldı (Her koşulda 6 kuyucuk APF için, 6 kuyucuk HPF için). Aynı zamanda hücrelerin durumunu mikroskopta değerlendirebilmek için 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde şeffaf 96 kuyucuklu plaklara da ekim yapıldı. Kuyucuklara 200'er μL kültür ortamı eklendi.

Literaturde resveratrolün koruyucu etkisini inceleyen çalışmalar değerlendirilerek beş farklı dozda resveratrol, deney sabahında hazırlandı (0.1, 1, 10, 50 ve 100 μM). Daha önce yapılan ROS deneylerinin sonuçları değerlendirilerek (bu sonuçlar "Bulgular" bölümünde

verilmiştir) resveratrolün ROS oluşumu üzerine etkisinin değerlendirildiği çalışmalar 6 saat OGD + 1 saat RGE sürelerinde uygulandı. Deney koşulları Tablo 5'te verilmiştir.

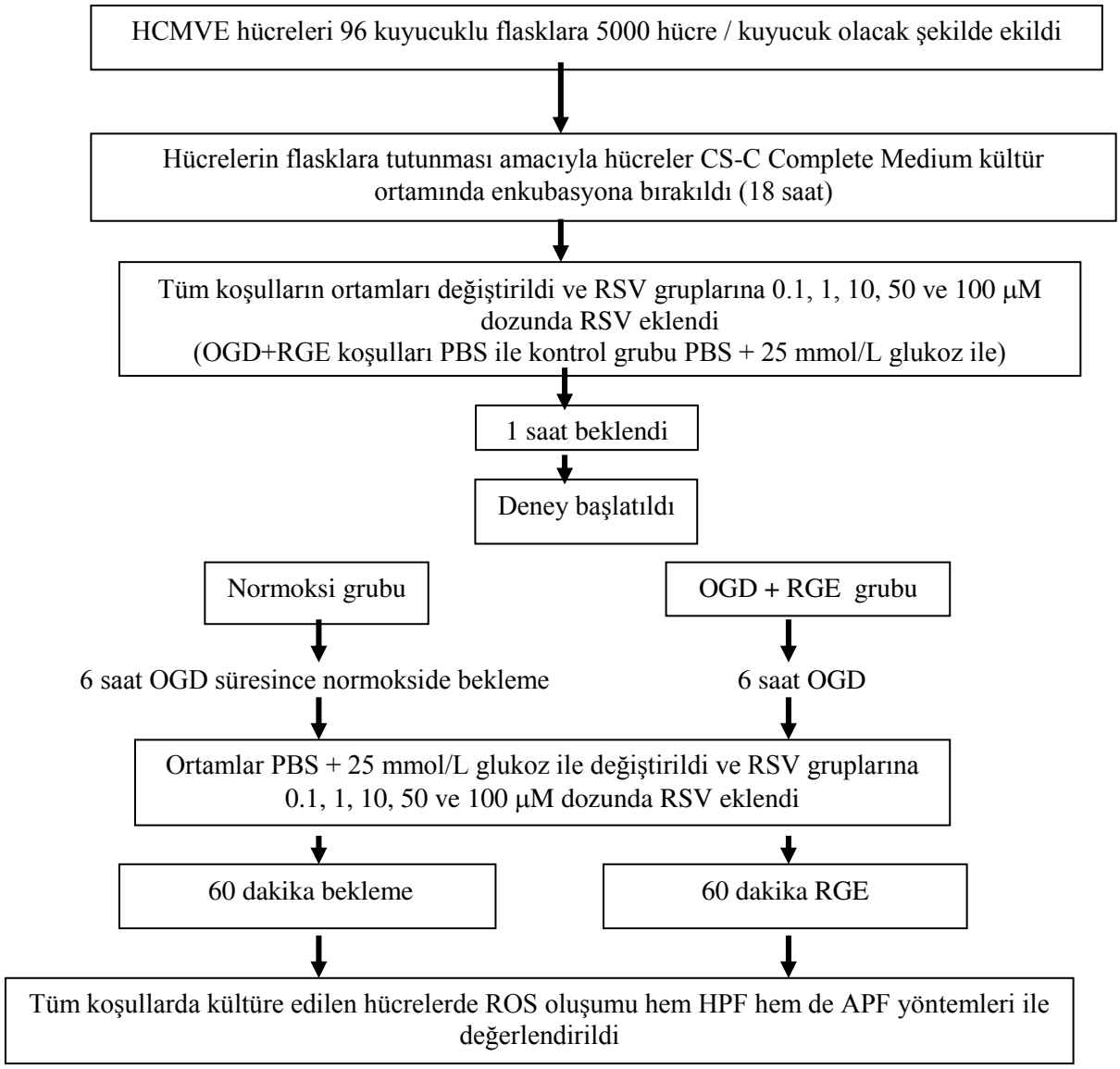
Tablo 5. Resveratrolün reaktif oksijen türlerinin oluşumu üzerine etkisinin değerlendirildiği deney koşulları

Koşul	
Kontrol (6 saat normoksi + 1 saat normoksi)	**Hipoksi (6 saat OGD + 1 saat RGE)**
Kontrol	Hipoksi
Kontrol + 0.1 μM RSV	Hipoksi + 0.1 μM RSV
Kontrol + 1 μM RSV	Hipoksi + 1 μM RSV
Kontrol + 10 μM RSV	Hipoksi + 10 μM RSV
Kontrol + 50 μM RSV	Hipoksi + 50 μM RSV
Kontrol + 100 μM RSV	Hipoksi + 100 μM RSV

Hücrelerin ekilmesinden 18 saat sonra kuyucuklardaki hücreler mikroskopta incelendiğinde yaklaşık %80 sıkışık oldukları gözlendi. Tüm koşulların 200'er μL olan ortamları çekilerek uzaklaştırıldı. Bunun yerine, her kuyucuğa Tablo 5'te gösterilen dozlarda resveratrol içeren 100'er μL, hipoksi plağına PBS (PBS [w/Ca^{++}, w/Mg^{++}]), normoksi (kontrol) plağına ise "PBS [w/Ca^{++}, w/Mg^{++}] + 25 mmol/L glukoz içeren ortam" farklı pipet uçları kullanılarak eklendi. Tüm plaklar 1 saat boyunca 37ºC'deki enkubatöre konuldular. Bu aşamadan sonra normoksi plağı 6 saat boyunca 37ºC'deki enkubatörde bekletildi. Hipoksi plağı ise, hipoksi odacığına alındı. Hipoksi uygulaması yukarıda belirtildiği şekilde uygulandı ve OGD + RGE plağı, hipoksi odacığının içinde yerleşik olarak, 37ºC'deki enkubatöre kaldırıldı.

Altı saatlik OGD süresi tamamlandıktan sonra tüm koşullarının ortamları ayrı pipetlerle çekilerek yerine, aynı dozlarda resveratrol içeren 25 mmol/L glukozlu PBS [w/Ca^{++}, w/Mg^{++}], konuldu. 60 dakikalık enkubasyondan sonra ROS ölçümü yapıldı.

Yapılan deneylerin akış planı Şekil 15'te gösterilmektedir.



Şekil 15. Resveratrolün OGD + RGE modelinde reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu üzerine etkisinin incelendiği deney akış çizelgesi. (OGD: oksijen glukoz deprivasyonu, RGE: reoksijenasyon + glukoz eklenmesi, RSV: resveratrol)

3.6.4.2. Hipoksik koşulların sağlandığının gösterilmesi: HIF-1α protein ekspresyonu

Çalışmamızda HCMVE hücrelerinde HIF-1α ölçümü için OGD uygulaması yapıldı. HCMVE hücreleri her koşul 3'er adet 75 cm^2 (toplam 15 adet) kültür plağından oluşmak üzere beş koşulla deney yapıldı. Koşullar tabloda belirtildiği şekilde ayrıldı (Tablo 6).

Tablo 6. HCMVE hücrelerinde OGD uygulamasının HIF-1α indüksiyonu üzerine etkisinin değerlendirildiği deney koşulları

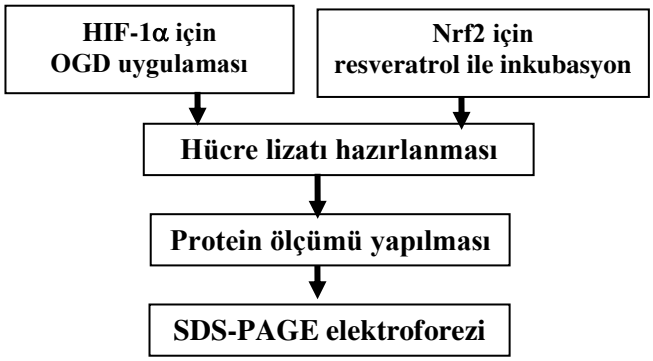
Koşul no	Koşul	Hipoksi (OGD) süresi	Plak sayısı
1	**Kontrol**	-	3x75 cm^2 plak
2	**OGD**	15 dakika	3x75 cm^2 plak
3	**OGD**	30 dakika	3x75 cm^2 plak
4	**OGD**	60 dakika	3x75 cm^2 plak
5	**OGD**	180 dakika	3x75 cm^2 plak

3.6.4.2.1. HIF-1α ekspresyonu için oksijen glukoz deprivasyonu uygulaması

Deney günü mikroskopta incelenen 75 cm^2'lik kültür plaklarındaki hücrelerin %80 sıkışık olduğu gözlendi. Deneyden önce plakların ortamları çekilerek yerine deney (hipoksi) süresince 10 mL PBS (PBS [w/Ca^{++}, w/Mg^{++}]) konuldu. Kontrol plaklarındaki lizatlar OGD uygulanmadan- hemen hazırlandı. OGD uygulanacak plaklar ise hipoksi odacığına alındı ve ROS deneylerinde anlatıldığı şekilde hipoksi başlatıldı. Daha sonra plaklar 15, 30, 60 ve 180 dakika süreyle hipoksi odacığının içinde yerleşik olarak, 37^oC'deki enkubatöre kaldırıldı. Bu sürelerin sonunda hipoksi sonlandırıldı ve hücre lizatları hazırlandı.

3.6.4.2.2. Western blot analizi

Hem HIF-1α hem de Nrf2 protein ekspresyonları Western blot analizi ile araştırıldı. Bu amaçla önce HIF-1α için hipoksi uygulaması, Nrf2 için ise resveratrol ile inkubasyon uygulandı. Daha sonra plaklardan hücre lizatı ile stoplazmik fraksiyonlar hazırlandı, protein ölçümü yapıldı ve SDS-PAGE elektroforezi ile Western blot analizi ve dansitometrik inceleme yapıldı. Western blot analizi akış şeması Şekil 16'da gösterilmiştir.



Şekil 16. HIF-1α ve Nrf2 protein ekspresyonlarının Western blot analizi ile değerlendirilmesi akış şeması

A. Hücre lizatı hazırlanması

Kontrol ve yukarıda belirtilen zaman dilimlerinde hipoksiye maruz kalan hücrelerden lizat "Biovision Hücre Lizatı Hazırlama Kiti" (katalog numarası: K270-50, BioVision Research Products, USA) ile hazırlandı (Tablo 7).

Tablo 7. Biovision hücre lizatı hazırlama kitinin içeriği

İçerik	**K270-50 (50 çalışma için)**
Cytosol Extraction Buffer (CEB)	20 mL
Membrane Extraction Buffer- A (MEB-A)	20 mL
Membrane Extraction Buffer- B (MEB-B)	1.2 mL
Nuclear Extraction Buffer (NEB)	10 mL
DTT (1 M)	150 µL
Protease Inhibitor Cocktail (lyophilized)	1 vial (Add 150 µL DMSO and mix before use)

Basamaklar şu şekilde uygulandı:

- İşlemlere başlamadan önce "Extraction Buffer Mix" (EB-Mix) hazırlandı. Bunun için 2 µL proteaz inhibitörü ve 2 µL DTT ayrı ayrı 1'er mL CEB, MEB-A ve NEB solusyonlarına eklendi ve bu üç tüp buz üzerine konuldu (Tablo 7).
- Hücreler, hücre kazıyıcı ile kazındı ve 700 *g*'de 5 dakika +4^{o}C'de santrifüj edildi.
- Süpernatan atıldı ve buz üzerinde soğutulmuş PBS eklenerek 700 *g*'de 5 dakika +4^{o}C'de yeniden santrifüj edildi.
- Üzerine 1 mL soğutulmuş PBS eklendi ve Eppendorf tüpüne alınarak 700 *g*'de 5 dakika +4^{o}C'de santrifüj edildi. Supernatan atıldı.
- Pellet karıştırıldı. Daha sonra üzerine 200 µL sitozolik EB-Mix (CEB + proteaz inhibitörü + DTT) eklendi ve pelletin tam olarak karışması için pipetlendi. 10 dakika buz üzerinde bekletildi.
- Eppendorf tüpü 700 *g*'de 10 dakika +4^{o}C'de santrifüj edildi. Süpernatanlar toplandı ve Eppendorf tüpüne konuldu (sitoplazma fraksiyonu).
- Pelletin üzerine 200 µL membran EB-Mix (MEB-A + proteaz inhibitörü + DTT) eklendi ve pelletin tam olarak karışması için pipetlendi, daha sonra da 15 saniye vortekslendi.
- Bu karışıma 11 µL MEB-B eklendi ve 5 saniye vortekslendi.
- 1 dakika buz üzerinde bekletildi, 5 saniye daha vortekslenerek 1000 *g*'de 5 dakika +4^{o}C'de santrifüj edildi. Supernatanlar alındı (membran fraksiyonu) ve atıldı.
- Pelletin üzerine 100 µL nukleer EB-Mix (NEB + proteaz inhibitörü + DTT) eklendi ve pelletin tam olarak karışması için pipetlendi, daha sonra da 15 saniye vortekslendi.
- 20 dakika buz üzerinde bekletildi ve her 5 dakikada bir 15 saniye vortekslendi.
- Santrifüjün en yüksek hızı olan 21460 *g*'de 10 dakika +4^{o}C'de santrifüj edildi. Süpernatanlar toplandı ve Eppendorf tüpüne konuldu (nükleer fraksiyon).
- Sitoplazmik ve nükleer fraksiyon örnekleri çalışılıncaya kadar -80^{o}C'ye konuldu.

B. Protein ölçümü:

Hücre lizatlarındaki protein düzeyleri BCA (Bicinchoninic acid) yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla Sigma marka (Kat No: BCA-1, B9643) protein analiz kiti kullanıldı. Yöntemin temeli, alkali ortamda Cu^{+2}–protein kompleksi oluşumuna ve Cu^{+2}'nin Cu^{+1}'e

indirgenmesine (ve yeşil rengin mavi-mor renge dönüşmesine) dayanmaktadır. Örneklerde var olan protein miktarı indirgenmiş Cu^{+1} miktarı ile (ve mavi-mor renk ile) doğru orantılıdır. Oluşan renk oluşumu 562 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilir (162). Protein ölçümü aşağıdaki basamaklar uygulanarak yapıldı:

- Standart protein olarak sığır serum albumin (BSA) kullanıldı. 250, 500, 1000, 1500, 2000 µg/mL olmak üzere farklı konsantrasyonda standart hazırlandı.
- Standart ve örneklerden 25'er µL kuyucuklara eklendi.
- Tüm kuyucuklara 200 µL BCA ve %4'lük bakır-2-sülfat pentahidrat solüsyonlarının sırasıyla 1:50 oranında karıştırılmasıyla hazırlanan analiz solüsyonundan ilave edildi.
- 37°C de 30 dakika inkübasyona bırakıldı ve 562 nm'de multiplak okuyucuda (BioTek, Synergy marka) okundu.
- Standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak protein miktarları hesaplandı ve sonuçlar µg/mL olarak ifade edildi.

C. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan sodyum dodesil sülfat (SDS) ısı ile birlikte denatüre etme özelliği taşımaktadır. SDS, proteinleri denatüre ederek primer yapıda kalmalarını sağlayan anyonik deterjandır. Proteinler küçük molekül ağırlıklı ditiyotreitol (DTT) ve SDS'in varlığında ısıtılarak denatüre edilir. Proteinler SDS'e sabit ağırlık oranında bağlandıklarından, denatüre proteinler eşit yük yoğunluğuna sahip olurlar. SDS-protein kompleksi poliakrilamid jelinde yüklerine göre değil büyüklüklerine göre hareket ederler ve hepsi negatif yüklendiklerinden dolayı elektriksel alanda pozitif yüke doğru göç etme özelliği gösterirler (163).

a. Elektroforez sistemi

Atto marka vertikal elektroforez sistemi, AE-6220 Dual Slab Chamber elektroforez tankı ve Atto marka AE 6210 2 adet Slab Gel Cast jel kalıbı (ikişer adet 1 mm'lik cam plaka, 12 kuyulu tarak ve conta) ve AE-8450 1000V güç kaynağından oluşmaktadır. Çalışmamızda uygulanan Western blot analizi uygulama basamakları Şekil 17'de kısaca özetlenmektedir.

b. SDS-PAGE jelinin hazırlanması

Çalışmalara jellerin hazırlanması ile başlandı. Öncelikle, 16x16 cm boyutlarında iki cam düzlemin arasına silikonlar yerleştirilip sıkıştırılarak jel kalıbı hazırlandı. Sızıntı olup olmadığı su ile kontrol edildi.

HIF-1α 120 kD ağırlığında bir proteindir. Bu ağırlıktaki protein için literatürde kullanılan ayırıcı (seperating) jel yüzdesi olan %7.5 seçildi (164).

- Ayırıcı jel hazırlanması için Tablo 8'de belirtilen malzemeler ve miktarlar kullanıldı.

Tablo 8. Ayırıcı jelin (%7.5) hazırlanması

Ayırıcı jel (%7.5)	**Miktar**
Akrilamid/Bis-akrilamid (%29.2/%0.8 w/v)	7.5 mL
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, %0.4 SDS	7.5 mL
Saf su	15 mL
%10 (w/v) amonyum persülfat	0.100 mL
TEMED	0.020 mL
Total monomer karışımı	**30.120 mL**

- Ayırıcı jel monomer karışımının polimerizasyonu amonyum persülfat (APS) ve tetrametiletilendiamin (TEMED) eklenerek gerçekleştirildi ve pipet yardımıyla hazırlanan jel çözeltisi iki cam arasındaki boşluğa camın bir kenarından sızdırılarak döküldü. Poliakrilamid jeller monomerik akrilamidin poliakrilamid zincirlerine polimerizasyonu ve N,N'-metilen- bis akrilamid tarafından çapraz bağlanması sonucu oluşmaktadır. Polimerizasyon APS'nin eklenmesi ile başlatılır ve reaksiyon APS'den serbest radikallerin oluşmasını katalize eden TEMED ile hızlandırılır.
- Jelin üst sınırının düzgün olması için hava ile temas eden yüzeyine izopropanol eklendi.
- 45-60 dakika polimerize olması için beklendi. Jel polimerize olduktan sonra üstteki izopropanol boşaltılıp su ile yıkandı.
- Paketleyici jel çözeltisi hazırlandı (Tablo 9) ve ayırıcı jelin üzerine boşaltıldı.
- 12 kuyulu jel tarağı 45^0C açı ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde iki cam arasına ve polimerize olmamış jel içine yerleştirildi.
- 45-60 dakika polimerize olması için beklendi.

Tablo 9. Paketleyici jelin (%4) hazırlanması

Paketleyici jel (%4)	**Miktar**
Akrilamid/Bis-akrilamid (%29.2/%0.8 w/v)	1.3 mL
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, %0.4 SDS	2.5 mL
Saf su	6.1 mL
%10 (w/v) amonyum persülfat	0.050 mL
TEMED	0.010 mL
Total monomer karışımı	**9.960 mL**

c. Örneklerin hazırlanması

Protein örnekleri kuyucuk başına 40 μL'de yaklaşık 30 μg olacak biçimde (1:4 oranında örnek tamponu ile karıştırılarak) hazırlandı ve 95 °C'de 5 dakika tutuldu.

d. Jelin yüklenmesi

Paketleyici jel polimerize olduktan sonra tarak çıkartıldı. İki cam arasında bulunan contalar çıkartılarak elektroforez tankı içine yerleştirildi ve 1 L running tamponu (Running stok: Tris 15.1 g, Glisin 72 g, SDS 5 g, dH_2O 1000 mL'de) ile dolduruldu. Kuyulara protein örnekleri ve moleküler ağırlık standardı (Fermantes Sm 0441) yüklendi.

e. Elektroforetik yürütme

Örnek yüklendikten hemen sonra sistem kapatıldı ve Atto Cell üzerine elektrotlar bağlandı. Örnekler ayırıcı jele girinceye kadar 100 Volt gerilim uygulandı. Örnek ayırıcı jele geçtikten sonra ise gerilim 200 Volt'a çıkarıldı. Brom fenol mavisi jelin alt ucuna varınca akım kesildi ve jel tanktan uzaklaştırıldı.

f. Proteinlerin membrana transferi

Çalışmamızda yarı-kuru (semi-dry) transfer tekniği kullanıldı. Bu amaçla, Atto marka elektroblotlama sistemi (AE-6675 HorizBlot ve AE-8450 1000VC güç kaynağı) kullanıldı.

- Transferde kullanılacak polivinilidendiflorid (PVDF) membran metanol ile doyuruldu.
- 3 mm filtre kağıtları (1703956 Thick blot paper 15x20cm) transfer tamponu (Transfer stok solusyonu: Tris 30.3 g, glisin 14 g, dH_2O, total hacim 1000 mL) ile ıslatıldı.

- Western sandviçi hazırlandı: 2 adet filtre kâğıdı pozitif yüklü bloğa yerleştirildi, üzerine membran (Millipore, Immobilon P, Kat No: IPVH09120; Sigma) ardından poliakrilamid jel yerleştirildi. Daha sonra filtre kâğıtları en üste yerleştirildi.
- Bu aşamalar sırasında katlar arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi.
- Negatif yüklü blok kapatılarak 200 mAmp sabit akımda 2 saat süre ile transfer gerçekleştirildi.
- Transfer işlemlerini sonlandırmak için güç kaynağı kapatıldı ve sistemin kapağı açıldı. Membran dikkatlice alındı.

g. Bloklama

Spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla bloklama yapıldı. Bu amaçla, değişik süt tozu konsantrasyonları (% 1, %2 ve %3) denenerek en uygun konsantrasyon olarak hem HIF-1α hem de Nrf2 için %3 seçildi. Bu sonuçlar doğrultusunda, transfer sonrası proteinleri bağlamış olan membran, bloklama çözeltisi (%3'lük süt tozu ve % 0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi [1 L PBS + 250 μL NP-40]) içinde 1 saat oda sıcaklığında bloke edildi. Bu süre sonunda membran bir kez % 0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi (yıkama çözeltisi) ile 5 dakika süre ile yıkandı.

h. Birincil (primer) antikor ile inkübasyon

Bloklama sonrasında membran, %1'lik süt tozu ve %0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi içinde 1/500 oranında dilüe edilmiş Nrf2 (Santa Cruz, sc-722), HIF-1α (Santa Cruz, sc-13515) and ß-actin (Santa Cruz, sc-1615)'e karşı kullanılan primer antikor ile $+4^0$C'de gece boyu inkübe edildi. Bu süre sonunda ortamdaki bağlanmamış antikor 3 kez yıkama çözeltisi (%0.05 NP-40 içeren % 10 PBS) ile 10 dakika süre ile oda sıcaklığında yıkandı.

i. İkincil (sekonder) antikor ile inkübasyon:

Yıkama sonrasında membran primer antikoru tanıyan sekonder antikorlarla (Donkey anti-goat IgG-Horseradish Peroxidase Conjugated Affinity Purified Antibody, Santa cruise, sc-2020) 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Sekonder antikorlar HIF-1α için %3 süt tozu ve % 0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi içinde 1/3500 oranında, Nrf2 için % 1 süt tozu ve % 0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi içinde 1/5000 oranında, aktin için ise % 3 süt tozu ve %

0.05'lik NP-40 içeren PBS çözeltisi içinde 1/3500 oranında hazırlandı. Bu sürenin sonunda membran tekrar yıkama çözeltisi ile 10 dakika süre ile 3 kez yıkandı.

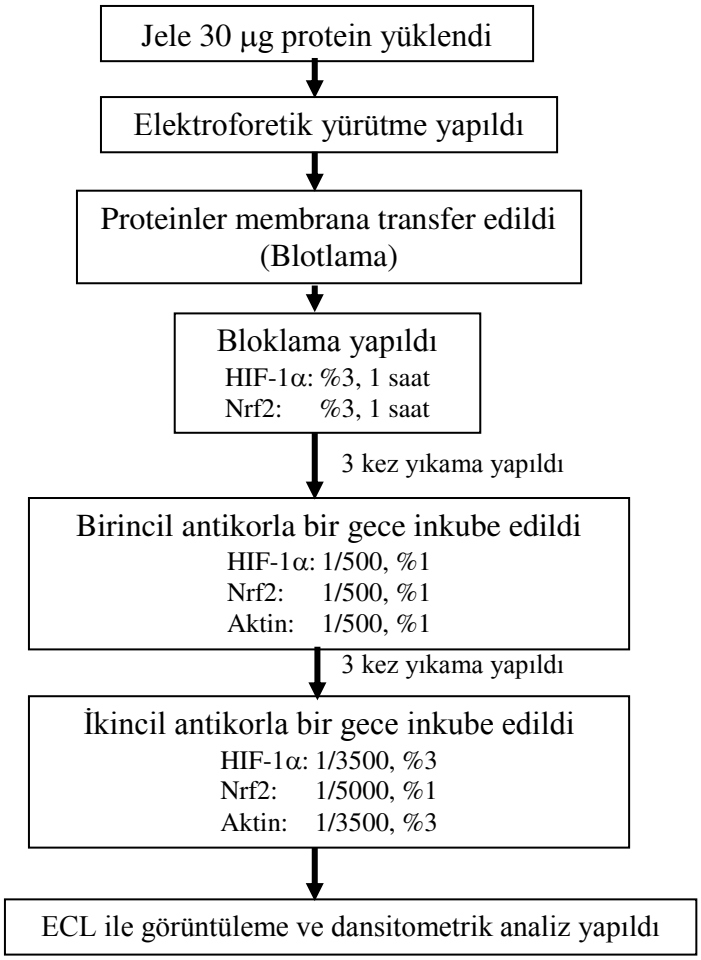
j. ECL ile görüntüleme

Deteksiyon aşaması: Sinyalin görünür hale getirilmesi amacıyla ECL plus kiti (Amersham Pharmacia Biotech, RPN 2132, Piscataway, NJ, USA) kullanıldı. Sinyal oluşturma solusyonu, kit içindeki peroksit ve enhancer solüsyonları 1ml:1ml oranında karıştırılarak hazırlandı. Kit, horseradish peroksidaz enziminin hidrojen peroksit varlığında substratı olan luminolü oksitlemesi ve luminolün uyarılmış durumdan bazal duruma geçerken film üzerinde kemilüminesans ışıma oluşturması ilkesine dayanmaktadır. Bu filmlerin dansitometrik incelenmesi, protein düzeyinin belirtilmesini sağlamaktadır.

Film aşaması: Kaset içine şeffaf dosya yerleştirildi ve bu dosyanın içine membran konuldu. Üzerine sinyal oluşturma çözeltisi eklendi. Kaset (Amersham, RPN 11649) içerisine karanlık odada film (Kodak Biomax Light Film, Katolog No: 1788207) yerleştirildi. Film banyosunda (Konica SRX-101) görüntü alındı.

k. Dansitometrik analiz

Bant yoğunlukları Bio-Rad Quantity One 1-D Analysis Software programında değerlendirildi. Veriler β-aktine oranlanarak standardize edildi.



Şekil 17. HIF-1α ve Nrf2 protein ekspresyonlarının gösterilmesinde kullanılan Western blot yönteminin uygulama basamakları

3.6.4.3. HCMVE hücrelerinde Nrf 2 protein ekspresyonu:

Çalışmanın bu bölümünde HCMVE hücrelerinde anti-oksidan sistemi aktive eden bir transkripsiyon faktörü olan Nrf 2'nin sitoplazmik protein ekspresyonunun incelenmesi ve resveratrolün bu proteinin ekspresyonu üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Çalışma her biri 3'er adet 75 cm^2'lik plaktan oluşan altı koşul ile gerçekleştirildi (Toplam 18 adet plak kullanıldı). Deney üç kez tekrarlandı (Tablo 10).

Tablo 10. Resveratrolün Nrf2 ekspresyonu üzerine etkisinin araştırıldığı deney koşulları

Koşullar	**Plak sayısı**
Kontrol (0. saat)	3x75 cm^2 plak
Resveratrol (10 μM) (1 saat)	3x75 cm^2 plak
Resveratrol (10 μM) (3 saat)	3x75 cm^2 plak
Resveratrol (10 μM) (6 saat)	3x75 cm^2 plak
Resveratrol (10 μM) (9 saat)	3x75 cm^2 plak
Resveratrol (10 μM) (24 saat)	3x75 cm^2 plak

Tabloda belirtilen şekilde her koşulda üçer adet plağa 10 mL deney ortamı (PBS [w/Ca^{++}, w/Mg^{++}] + 25 mmol/L glukoz) konuldu. Resveratrol eklenen koşullarda bu ortama 10 μM konsantrasyonda olacak şekilde resveratrol eklendi. Deney grupları tabloda belirtilen süreler boyunca 37^oC'de bekletildi. Bu sürelerin sonunda enkubatörden çıkarılan plaklardan sitoplazmik ekstraktlar HIF-1α ölçümünde anlatıldığı şekilde elde edildi. Western blot tekniğinin aşamaları da HIF-1α tayininde anlatıldığı şekilde uygulandı.

3.7. Araştırma planı ve takvimi

Projelendirme……. Haziran 2006-Mart 2007

ROS deneyleri …… Mayıs 2007-Ocak 2008

Western blot analizleri …. Ocak 2008- Ocak 2010

Tez yazımı…….. Ocak 2011-Kasım 2011

3.8. Verilerin değerlendirilmesi

İstatistiksel analiz, SPSS (Statistical Package of Social Science) Software 11.0'da yapıldı. Veriler ortalama ± standart sapma olarak gösterildi. 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.

3.9. Araştırmanın sınırlılıkları

Bu çalışmada OGD + RGE hasarının ROS üretimi üzerine olan etkisi araştırıldı. ROS artışının hücre hasarına yol açıp açmadığının araştırılması için sitotoksisite deneylerinin (laktat dehidrohgenaz testi gibi) ve apoptoz tayininin yapılmaması bu çalışmanın sınırlı yönüdür.

Resveratrolün Nrf2 aktivasyonu yaptığı çalışmamızda gösterildi. Ancak, OGD + RGE modelinde Nrf2 ekspresyonunu inhibe eden siRNA testlerinin yapılarak Nrf2 yolağının inhibe edilmesi ve resveratrolün ROS azaltıcı etkisinin bu yolak aracılığı ile olduğunun gösterilmiş olması çalışmayı daha güçlü yapabilirdi. Bu da çalışmamızın kısıtlı yönlerinden biridir.

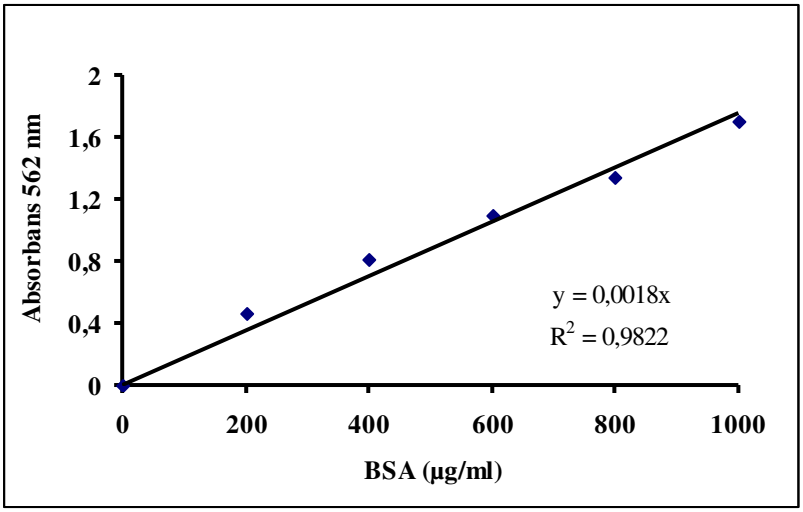
3. 10. Etik Kurul onayı

Araştırma için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 16.02.2007 tarih ve 75 sayı ile onay alındı (Ek 1).

4. BULGULAR:

Hipoksi uygulaması ve HIF-1α protein ekspresyonu

HCMVE hücrelerinde hipoksinin HIF-1α protein ekspresyonu üzerine etkisinin araştırılması için hücrelere 15, 30, 60 ve 180 dakika OGD uygulaması yapıldı. Daha sonra lizatlar toplandı ve öncelikle Şekil 18'de gösterilen standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak ve dilusyon faktörü ile çarpılarak kontrol ve deney gruplarındaki hücre lizatlarında protein düzeyleri hesaplandı (Tablo 11).

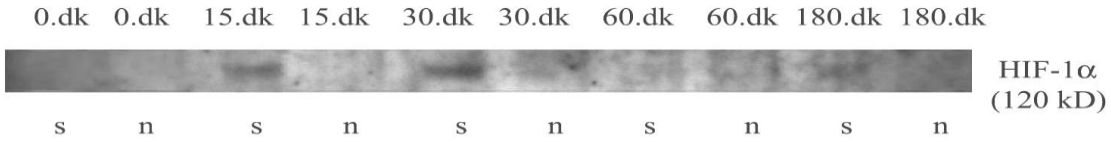


Şekil 18. HIF-1α protein ekspresyonlarının gösterilmesinde kullanılan koşulların protein miktarlarının hesaplandığı BSA standart kalibrasyon eğrisi

Tablo 11. Farklı süreler boyunca oksijen glukoz deprivasyonu uygulanan koşulların hücre lizatlarının ortalama protein düzeyleri

Gruplar	**Protein düzeyleri (µg/mL)**
Kontrol sitoplazma / nukleus	856.5 / 5995
15 dakika sitoplazma / nukleus	891.1 / 6731.3
30 dakika sitoplazma / nukleus	831.3 / 5139.7
60 dakika sitoplazma / nukleus	1482.7 / 5013.1
180 dakika sitoplazma / nukleus	737.6 / 5538.0

Oksijen glukoz deprivasyonu uygulanan HCMVE hücrelerinde hipoksinin, HIF-1α protein ekspresyonunu 15. dakikada indüklediği tespit edildi (Şekil 19). HIF-1α ekspresyonu 30. dakikada daha da arttı ve 30. dakikadan itibaren nukleusta da görülmeye başlandı. 60. dakikadan itibaren azalarak 180. dakikaya kadar devam etti.



Şekil 19. Hipoksi ile indüklenen HIF-1α transkripsiyon faktörü ekspresyonu (s: sitoplazmik örnek, n: nükleer örnek)

Oksijen glukoz deprivasyonu uygulaması ve reaktif oksijen türleri

HCMVE hücrelerinde H-R hasarının (OGD + RGE uygulaması) ROS oluşumuna etkisini araştırmak için 6 saatlik OGD uygulamasını takiben 15 dakika, 60 dakika ve 24 saat sürelerle RGE uygulandı. HCMVE hücrelerinde 6 saat OGD uygulamasını izleyen RGE'nin 60. dakikasında APF ve HPF problarıyla ayrı ayrı ölçümlenen ROS'un anlamlı olarak arttığı gözlendi (sırasıyla p değerleri; 0.004 ve 0.016) (Tablo 12 ve Şekil 20).

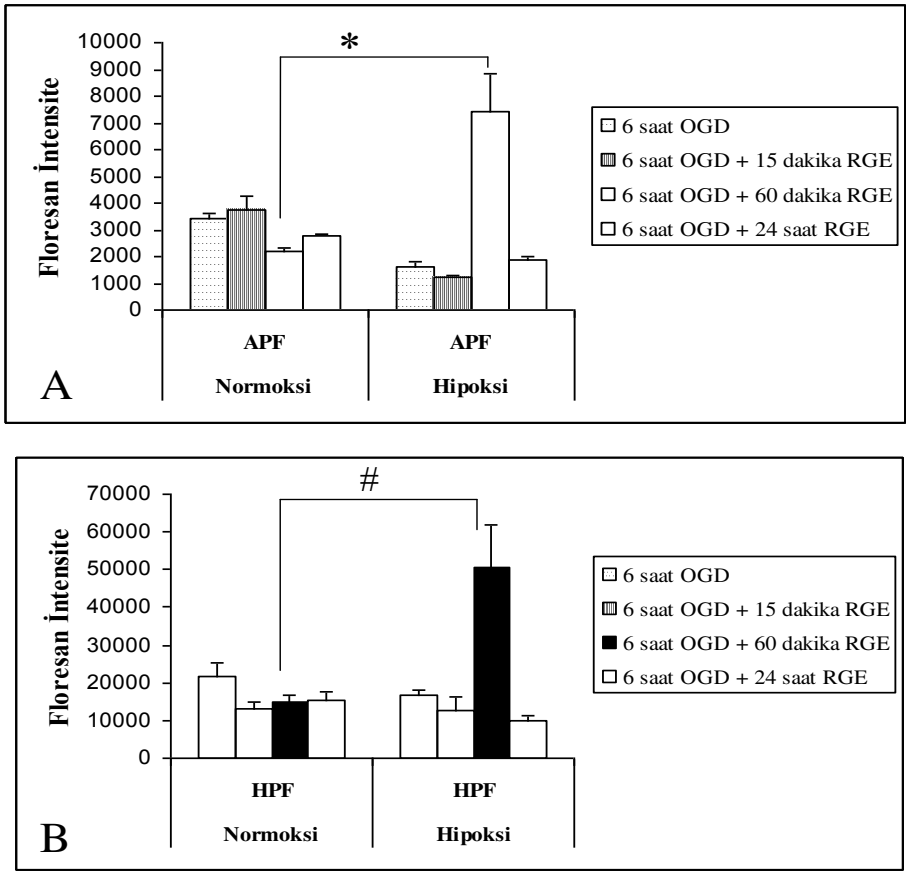
Normoksi koşullarının (6 saat OGD, 6 saat OGD+ 15 dakika RGE, 6 saat OGD+60 dakika RGE, 6 saat OGD+24 saat RGE) ve hipoksi koşullarının (6 saat OGD, 6 saat OGD+ 15 dakika RGE, 6 saat OGD+60 dakika RGE, 6 saat OGD+24 saat RGE) zaman içindeki ROS değişimlerinin APF ile ölçümlerinde anlamlı fark saptandı (normoksi p=0.009 ve hipoksi p=0.002). HPF ile ölçümlerde ise hipoksi koşullarının zaman içindeki değişimi anlamlı idi (6 saat OGD, 6 saat OGD+15 dakika RGE, 6 saat OGD+60 dakika RGE, 6 saat OGD+24 saat RGE) (hipoksi p=0.014). Normoksi koşullarının zaman içindeki değişiminde anlamlı fark saptanmadı (p=0.706).

Tablo 12. HCMVE hücrelerinde OGD + RGE (oksijen glukoz deprivasyonu + reoksijenasyon ve glukoz eklenmesi) uygulaması ile ölçülen reaktif oksijen türleri değerleri (Ortalama ± standart sapma). Değerler floresan intensite olarak verildi

Koşullar	Normoksi		Hipoksi		P*
	APF	HPF	APF	HPF	
6 st OGD	3391.8±223	21774.6±3400	1649.3±194	16733.0±1446	0.004 / 0.423
6 st OGD + 15 dk RGE	3741.3±508	13309.1±1656	1194.1±79	12745.6±3609	0.004 / 0.749
6 st OGD + 60 dk RGE	2208.5±116	15024.5±1861	7446.0±1404	50784.1±11106	**0.004 / 0.016**
6 st OGD + 24 st RGE	2770.8±100	15514.0±1976	1891.1±88	9902.6±1328	0.004 / 0.025

p*: APF ölçümleri arası fark / HPF ölçümleri arası fark.

(Deneyler 3 kez tekrarlanmış ve birinin sonucu verilmiştir).



Şekil 20. Oksijen glukoz deprivasyonu uygulamasının HCMVE hücrelerinde reaktif oksijen türleri oluşumu üzerine etkisinin grafikle gösterilmesi. A: APF ile (*p:0.004), B: HPF ile (#p: 0.016) ölçüm değerleri.

OGD uygulamasında resveratrolün ROS oluşumu üzerine etkisi

HCMVE hücrelerinde 6 saat OGD uygulamasını izleyen RGE'nin 60. dakikasında APF ve HPF problarıyla ayrı ayrı ölçümlenen ROS'un anlamlı olarak arttığı gözlendi. Bu nedenle resveratrolün farklı dozlarının ROS oluşumu üzerine etkisinin incelenmesi için bu zaman aralığı (6 saat OGD + 60 dakika RGE) kullanıldı. Kontrol OGD + RGE grubu ile karşılaştırıldığında RSV'nin kullanılan tüm dozlarının ROS üretimini anlamlı olarak azalttığı saptandı (Tablo 13 ve Şekil 21). Normoksi gruplarında ise kontrol grubuyla karşılaştırıldığında farklı dozlardaki RSV kullanımının ROS üretimi üzerinde anlamlı farka yol açmadığı saptandı (Tablo 13).

Tablo 13. HCMVE hücrelerinde OGD + RGE uygulaması ile reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve resveratrolün koruyucu etkisi (Ortalama ± standart sapma). Değerler floresan intensite olarak verildi

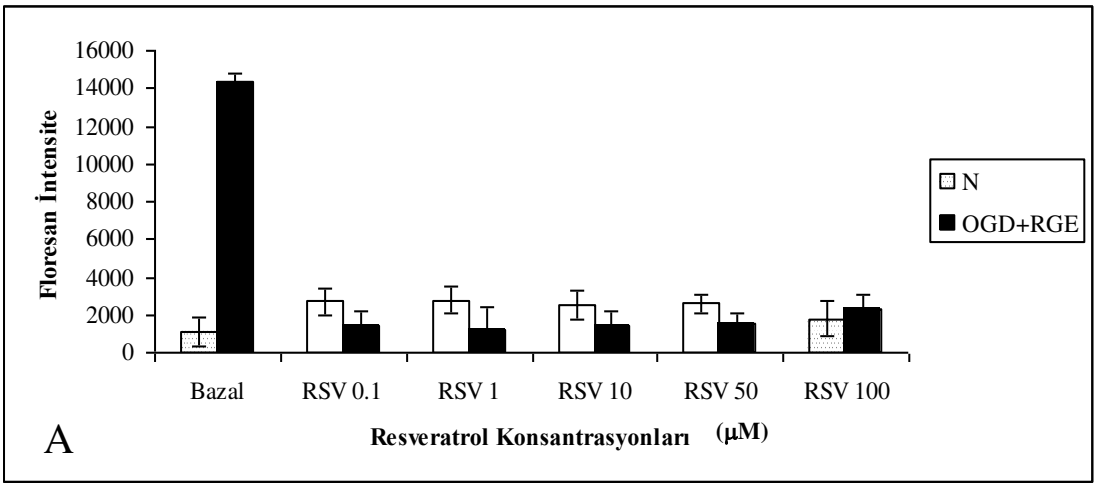
	APF		**HPF**		
Koşullar	**Normoksi**	**OGD+RGE**	**Normoksi**	**OGD+RGE**	**p***
Kontrol	1062 ± 770	14332 ± 510	12428 ± 2591	51420 ± 1469	****0.004**
RSV (0.1 µM)	2686 ± 755	1378 ± 786	18598 ± 2682	9247 ± 1738	**0.004**
RSV (1 µM)	2794 ± 666	1162 ± 1007	19649 ± 2596	10422 ± 1196	**0.004**
RSV (10 µM)	2528 ± 748	1444 ± 727	19828 ± 2785	9616 ± 1351	**0.004**
RSV (50 µM)	2588 ± 518	1516 ± 545	17239 ± 3125	11421 ± 1115	**0.004**
RSV (100 µM)	1769 ± 916	2307 ± 730	16457 ± 2335	14868 ± 1397	**0.004**

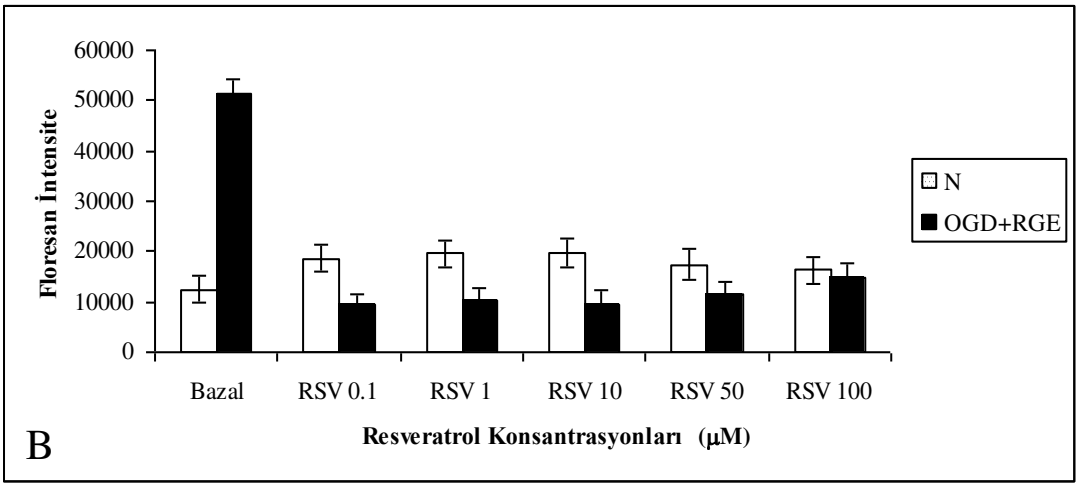
*p: İstatistiksel değerlendirme APF ve HPF ölçümlerinde ayrı ayrı yapıldı.

**Kontrol normoksi ve kontrol OGD arasındaki fark

***Karşılaştırma, kontrol OGD + RGE (oksijen glukoz deprivasyonu + reoksijenasyon ve glukoz eklenmesi) grubu ile RSV eklenen OGD + RGE grupları arasındaki fark olarak verildi.

(Deneyler 3 kez tekrarlanmış ve birinin sonucu verilmiştir).

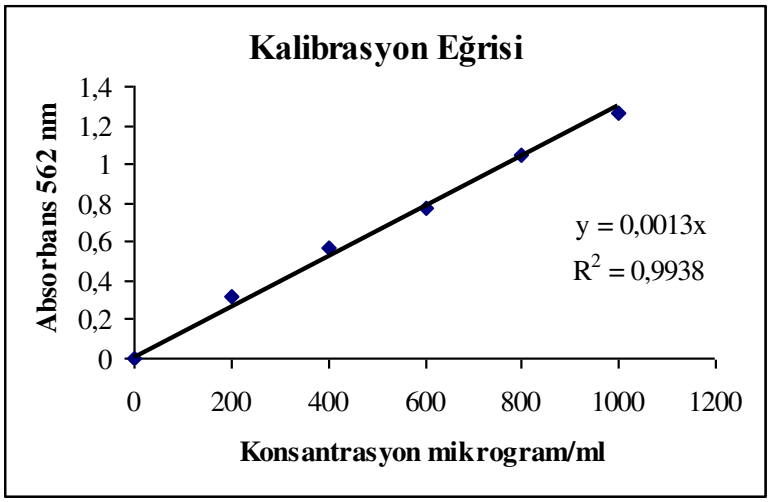




Şekil 21. HCMVE hücrelerinde OGD + RGE uygulaması ile reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve resveratrolün koruyucu etkisinin grafikle gösterilmesi. A: APF ile, B: HPF ile ölçüm değerleri. (p değerleri tabloda verilmiştir)

Resveratrolün Nrf 2 protein ekspresyonu üzerine etkisi

Resveratrolün Nrf2 protein ekspresyonu üzerindeki etkisini saptamak amacıyla HCMVE hücreleri 1, 3, 6, 9 ve 24 saat sürelerle 10 μM resveratrol ile muamele edildi. Daha sonra tüm koşulların lizatları toplandı ve Şekil 22'deki standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak kontrol ve deney gruplarında hücre lizatında protein düzeyleri hesaplandı (Tablo 14).

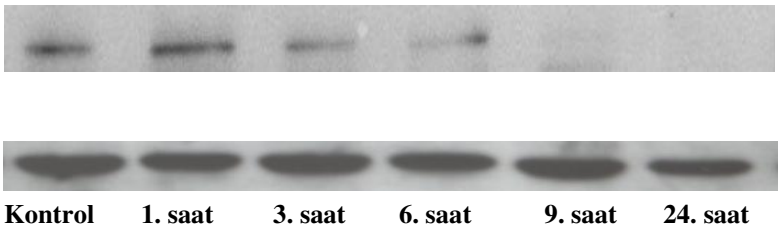


Şekil 22. Nrf2 protein ekspresyonlarının gösterilmesinde kullanılan koşulların protein miktarlarının hesaplandığı BSA standart kalibrasyon eğrisi

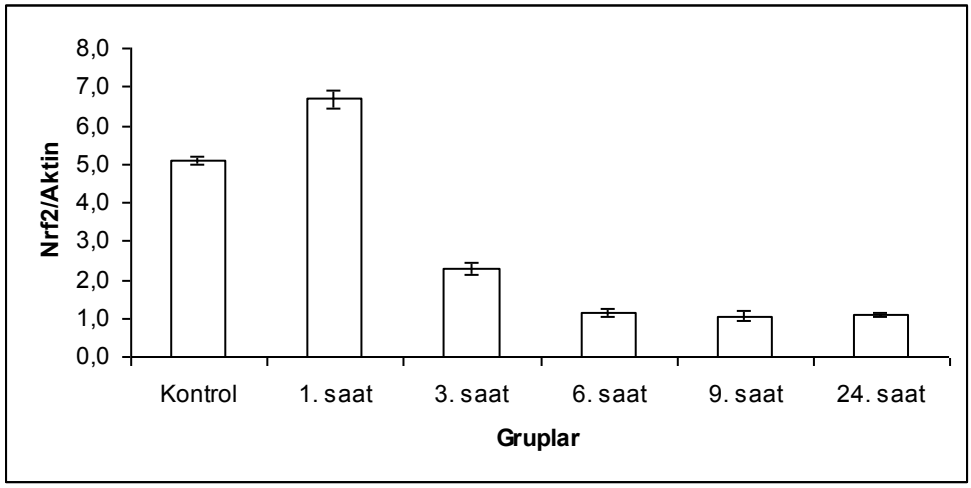
Tablo 14. Farklı süreler boyunca resveratrol (10 μM) ile inkube edilen koşulların hücre lizatlarının ortalama protein düzeyleri

Gruplar	**Protein düzeyleri (μg/mL)**
Kontrol	1044.2 ± 20.1
1 saat	1080.1 ± 18.6
3 saat	1090.0 ± 6.5
6 saat	1093.1 ± 13.8
9 saat	1033.6 ± 15.7
24 saat	968.8 ± 18.9

HCMVE hücreleri farklı saat sürelerince 10 μM resveratrol ile muamele edildiğinde birinci saatte sitoplazmada Nrf2 ekspresyonunun arttığı, 3. saatten itibaren bandın azalarak 9. saatten itibaren kaybolduğu saptandı (Şekil 23 ve Şekil 24).



Şekil 23. Resveratrol uygulamasını takip eden farklı saatlerde elde edilen sitoplazmik örneklerde Nrf2 protein ekspresyonu (Deney 3 kez tekrarlanmış ve birinin sonucu verilmiştir)



Şekil 24. Kontrol grubu (resveratrol ile muamele edilmeyen gruptur) ve farklı sürelerde 10 μM resveratrol ile muamele edilen grupların Nrf2 Western blot spotlarının dansitometrik analizi. Bulgular Nrf2'nin dansitometrik ölçümünün β-aktine oranı şeklinde verilmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada HCMVE hücrelerine 6 saat OGD + 1 saat RGE uygulandığında ROS üretiminde anlamlı artış saptanmış ve resveratrolün farklı dozları ile (0.1, 1, 10, 50 ve 100 μM) hücreler inkube edildiğinde ROS anlamlı olarak azalmıştır. Ayrıca, 10 μM resveratrolün Nrf2 protein ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir.

Serebral mikrovasküler endotel hücreleri ve önemi

Çalışmamız insan serebral mikrovasküler endotel hücreleri ile yapılmıştır. Farklı organların damar yataklarını döşeyen endotel hücrelerinin yapıları ve hipoksi karşısındaki davranışları farklıdır (12,165-167). Serebral endotel hücreleri oldukça farklılaşmış, sadece kan-beyin bariyerinde bulunan ve diğer endotel hücrelerinde görülmeyen özel yapı ve biyokimyasal özelliklere sahip olan bir hücre tipidir (168,169). Diğer vasküler yapıları döşeyen endotel hücrelerinden çok daha fazla mitokondri içerir ve dolayısı ile kan beyin bariyerini koruyabilmek için daha yüksek metabolik hıza sahiptir (170). Bu nedenle, oksijen ve glukoz yoksunluğuna diğer endotel hücrelerinden daha hassastır. Beyinin hipoksik kalması akut beyin hasarı yapmasının yanı sıra, dejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasına da yol açmaktadır (171,172). Hipoksi tarafından başlatılan olaylar zincirinin nöron fonksiyon bozukluğu veya ölümünü hangi mekanizmalarla gerçekleştirdiği henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak, merkezi sinir sisteminin genel dolaşımla bağlantısını kuran ve hipoksi uyarısını almak için sensor görevi gören endotel'in, bu mekanizmalarda anahtar rol oynadığı düşünülmektedir (12,173).

Merkezi sinir sisteminin dejeneratif ve iskemik hastalıklarında parankimde olduğu gibi endotel hücresinde de çok sayıda biyokimyasal ve fonksiyonel değişiklikler olmakta, pek çok proteinin ekspresyonu artmakta veya azalmaktadır. Örneğin, yapılan *in vitro* çalışmalarda hipoksik koşullarda serebral endotel hücrelerinde HIF-1α ekspresyonunun arttığı (12,174, 175), beyin ödemi ile ilişkili olan Ca^{++} kanallarını regule eden sulfanilure (SUR-1) reseptörlerinin protein ve gen (Abcc8) düzeylerinin arttığı ve bunu HIF-1α artışının indüklediği gösterilmiştir (174). Farklı çalışmalarda farelerde iskemi modeli oluşturulduğunda serebral endotel hücrelerinde enflamasyonun anahtar düzenleyicisi olan NF κB aktivitesinin uyarıldığı (176); kan beyin bariyerinde Na-K-Cl ko-transport proteininin aktivitesinin arttığı ve bunun da p38 ve JNK MAPK sistemlerinin aktivasyonu sonucu gerçekleştiği saptanmıştır (177). İskemi, yeni damar oluşumunu da uyarmakta ve bu amaçla endotel hücrelerinde pek

çok sinyal yolağı ve proteinler etkilenmektedir. Farelerde iskemi modeli oluşturulduğunda, iskemi sınırındaki endotel hücrelerinde proliferasyonun ve yeni damar oluşumunun göstergesi olarak fibronektin, α5β1 ve αvβ3 integrinlerin ekspresyonlarının arttığı (178); ayrıca anjiyopoetin-2 ve MMP-2 protein düzeylerinde de artış olduğu gösterilmiştir (175). Bütün bu verilere dayanılarak, hipoksi sırasında beyin endotel hücrelerinde ortaya çıkan etkilenmeyi anlamanın, beyinde hipoksinin yol açtığı hasarı tespit edebilmek için büyük önem taşıdığı belirtilmektedir. Bu nedenle, çalışmamızda insan serebral endotel hücreleri kullanılmış, OGD + RGE modelinin bu hücrelerde ROS artışına yol açıp açmadığı ve resveratrolün ROS üzerindeki etkisi literatürde ilk kez incelenmiştir.

HCMVE hücrelerinde OGD + RGE hasarı oluşturulması ve ROS'un değerlendirilmesi

Bu çalışmada *in vitro* HCMVE hücrelerinde, OGD + RGE modelinin optimum koşulları belirlenerek uygulandı. Reaktif oksijen türlerinin tespiti için uygulanan zaman noktaları literatürdeki çalışmalar göz önüne alınarak belirlendi ve laboratuvarımızdaki (ARLAB) çalışma koşullarına göre optimize edildi.

A. Hipoksi uygulaması ve HIF-1α:

HIF-1α, tüm memeli hücrelerinde bulunan ve hipoksiye hücresel yanıtta anahtar rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür (16). Hücre, normoksi koşullarında iken (%21 oksijen) sitoplazmadaki HIF-1α hızla yıkıma uğrar; buna karşın, ortamdaki oksijen konsantrasyonu %5'e düştüğünde yıkımı yavaşlar (23,24). Hipoksinin şiddeti arttıkça ve anoksi geliştikçe (%0.1 oksijen) HIF-1α protein düzeyi de artmaktadır (23,179). Bu nedenle HIF ölçümü *in vitro* çalışmalarda hipoksik koşulların sağlandığının göstergesi olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda da ortamın hipoksik kaldığının hücre düzeyinde gösterilmesi amacıyla HIF-1α protein ekspresyonu araştırıldı.

Literatürde farklı hücre türlerinde yapılan çalışmalarda farklı süreler boyunca hipoksi uygulanmış ve HIF-1α'nın ekspresyonunda artma gösterilmiştir. Serebral inme modellerinde ve serebral endotel hücrelerinde de yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Luo J ve arkadaşları, ratlardan elde ettikleri serebral endotel hücrelerini hipoksiye maruz bıraktıklarında nukleer ekstraktlarda 30. dakikada HIF-1α protein ekspresyonunda artma tespit etmişlerdir (12). Hipoksi devam ettikçe 2 ve 4. saatte bu artış devam etmiş, reoksijenasyonun 2. saatinde düşme göstermiştir (12). Grammas ve arkadaşları fare serebral endotel hücrelerini 4-6 saat

sürelerle hipoksiye maruz bıraktıklarında, 4. saatte sitoplazmik HIF-1α protein ekspresyonunda artma tespit etmişler ve 6. saatte kontrol grubundan fazla olmakla beraber, protein miktarının belirgin olarak azaldığını saptamışlardır (175). Gonsalves ve arkadaşları trasnforme HCMVE hücrelerine 8 saat hipoksi uygulaması yaptıklarında nükleusta HIF-1α protein ekspresyonunda artış saptamışlarıdır. Bu çalışmada sitoplazmik protein ekspresyonu incelenmemiştir (180). Patak ve arkadaşları immortalize HCMVE hücrelerine hipoksi uyguladıklarında hipoksinin 4. saatinde sitoplazmada HIF-1α protein ekspresyonunda artma saptamışlar ve 16. saatte bandın kaybolduğunu göstermişlerdir (181). Ayrıca, çalışmalarında hücre kültüründeki sıkışıklık (konfluensi) düzeyi arttıkça (%50 ve %90) HIF-1α protein ekspresyonundaki artışın daha belirgin olduğunu saptamışlardır (181). Bu durum hücre sayısı arttıkça ortamda kalan oksijenin daha çabuk tüketilmesi sonucu ortaya çıkmış olabilir. Çalışmamızda ise HCMVE hücrelerine 15, 30, 60 ve 180 dakika boyunca OGD uygulanmış; HIF-1α ekspresyonunun 15. dakikadan itibaren sitoplazmada arttığı ve 30. dakikadan itibaren nukleusta da görülmeye başlandığı saptanmıştır. Bu bulgular çalışmamızda hipoksik koşulların sağlandığını göstermektedir.

B. OGD + RGE modelinin uygulanması ve ROS ölçümü:

Bu araştırmada ROS ölçümü için APF ve HPF probları kullanıldı. Reaktif oksijen türlerinin ölçümünde elektron spin rezonans, kemilüminesans ve floresans ölçümleri gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Floresans ölçümü, duyarlılığı ve deneysel uygunluğu açısından bütün yöntemlerin üstündedir. Floresan prob olarak APF, HPF, diklorofloresin diasetat (H_2DCFDA) ve dihidrorodamin 123 kullanılabilmektedir. Rutinde hücre içi ROS'un ölçümünde en sık kullanılan H_2DCFDA probudur, ancak nonspesifiktir ve kendiliğinden okside olabilmektedir. Floresan olmayan H_2DCFDA'nin ROS skalası geniştir (peroksil, hidroksil, peroksinitrit anyonu gibi). APF ve HPF floresan probları ise bu probdan daha fazla spesifik ve stabildir, reaksiyonları daha sınırlıdır ve ışığa maruz kaldığında otooksidasyona daha dirençlidir. Her iki prob; hidroksil radikali, hipoklorit ya da peroksinitrit radikali ile reaksiyona girinceye kadar floresans özellik göstermemekte, oksidasyon sonucu ise hem HPF hem de APF parlak yeşil floresans vermektedir (161,182). Çalışmamızda her iki prob kullanılarak çalışılan ROS değerlerinin birbiriyle uyumlu olduğu saptandı.

Çalışmamızda, OGD modeli ile 6 saatlik hipoksi (OGD) ve 1 saatlik reoksijenasyon (RGE) sürelerinde, normoksi koşullarındaki hücrelerle karşılaştırıldığında, deney grubunda

anlamlı ROS artışı saptandı. Serebral endotel hücrelerinde glukoz deprivasyonu ve H-R hasar modelinin kullanıldığı çalışmalar literatürde bulunmaktadır (183-186). Bunlardan biri, Zhang ve arkadaşlarının yaptığı ve HCMVE hücrelerinde "OGD + Reoksijenasyon" modelinin uygulandığı çalışmadır (183). Bu çalışmada hücrelere önce 4, 6 ve 3+3 saat (1 saat aralıklı olarak 3'er saat) hipoksi uygulanmış, sonra hücreler, 8 saat OGD ve ardından 20 saat reoksijenasyon'a maruz bırakılmışlardır. Bu çalışmada apoptotik hücre ölümü ve sürvivin aktivasyonu ve başlangıçta uygulanan hipoksi sürelerinin bu parametreler üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak başlangıçtaki hipoksi uygulaması kullanılmamıştır- uyguladığımız hipoksi modeli farklıdır. Ayrıca çalışmamızda farklı sürelerde reoksijenasyon ile ROS 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 (184). 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 fark 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. Üçüncü çalışma Guo ve arkadaşları tarafından yapılan ve fare serebral endotel hücrelerine 6 saat OGD + 24 saat RGE (5.5 mmol/L glukoz) uygulanan çalışmadır. Bu çalışmada hücrelere önceden uygulanan östradiolün RGE'nin 24. saatinde LDH ile tespit edilen hücre ölümünü %52 oranında azalttığı saptanmıştır (185). Dördüncü çalışma Lok ve arkadaşları tarafından HCMVE hücreleri ile yapılmıştır. Bu çalışmada 8 saat OGD ve 16 saat RGE uygulanmış; deneyden 1 saat önce ortama glutatyon prekursörü olan gama glutamil sistein etil ester eklenen grubun MTT ile değerlendirilen hücre canlılık oranı eklenmeyenlere göre artmış ve normoksi grubunun %81'ine ulaşmıştır (186). Çalışmamızda insan serebral endotel hücreleri kullanılmış, OGD + RGE modeli uygulanmış ve bu modelde ROS artışı tespit edilmiştir. Yukarıda adı geçen çalışmalarda ise ROS ölçümü yapılmamıştır. Çalışmamız HCMVE hücrelerinde OGD + RGE uygulaması sonrası ROS ölçümünün değerlendirildiği ilk çalışmadır.

Çalışmamızda deney süresince kültür ortamı olarak Ca^{++} ve Mg^{++} içeren PBS (fosfat tampon tuzu**:** 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM sodyum fosfat dibazik, 2 mM potasyum fosfat monobazik, pH of 7.4) kullanıldı. Literaturde yapılmış olan çalışmalarda oksijen glukoz deprivasyonu uygulamalarında glukoz içermeyen HBSS veya "Dulbecco's modifiye Eagle" ortamı gibi kültür ortamlarının yanı sıra farklı tamponlanmış tuz solusyonları da yaygın olarak kullanılmıştır. Iijima ve arkadaşları primer hippokampal hücre kültüründe OGD uygulamışlar ve bu amaçla "glukoz içermeyen HEPES-buffered saline" (130mMNaCl, 5.5mMKCl, 1.8mMCaCl2, 1.0mMMgCl2, 20mM HEPES buffer: pH 7.4) kullanmışlardır (187). PC12 hücreleri ile yapılan bir çalışmada glukoz içermeyen Earle's balanced salt solution (EBSS) (dengelenmiş tuz çözeltisi) kullanılmıştır (188). Yine hippokampal hücre kültüründe Krebs–Ringer bicarbonate buffer (KRB) (mM): 122 NaCl, 3 KCl, 1.2 MgSO4, 1.3 CaCl2, 0.4 KH2PO4, 25 NaHCO3 kullanılmıştır (189). Guo ve arkafdaşları ise fare serebral endotel hücre kültüründe glukoz içermeyen dengeli tuz solusyonu (BSS0.0) (mmol/L): NaCl 116; CaCl2 1.8; MgSO4 0.8; KCl 5.4 NaH2PO4 1; NaHCO3 14.7 ve HEPES kullanmışlardır (185). Bu nedenle, çalışmamızda kullandığımız tamponlanmış tuz solusyonu, modelin gerçekleştirilmesi için uygun olan bir kültür sıvısıdır.

Çalışmamızda, reoksijenasyon aşamasında ortama 25 mmol/L glukoz da eklenmiş ve böylece *in vivo* koşullardaki reperfüzyon sürecine daha yakın bir model elde edilmiştir. Literatürde hasar modeli olarak OGD + RGE modelini kullanan çalışmalar yapılmıştır. HUVE hücreleri ile yapılan bir çalışmada, 2 saat süreyle OGD uygulandığında ROS değerinde artış olmazken, sonrasında 1 saatlik RGE uygulamasıyla ROS düzeyinde (başlangıca göre %115) artış saptanmıştır (153). 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 (153,190). Hipoksi sırasında hücresel fonksiyonlar üzerine etkili olan transkripsiyon faktörlerinden biri HIF-1α'dır. Hipoksi, pek çok hücrede HIF-1α'nın ekspresyonunu artırmakta ve bu artış da hücreyi hipoksi hasarından koruyan glukoz transporterları, glikolitik enzimler, vasküler endotelyal büyüme faktörü, eritropoetin gibi bazı faktörlerin mRNA transkripsiyonunu indüklemektedir (191). Çalışmamızda OGD uygulamasından sonra anlamlı ROS artışı olmaması ve ortama oksijen + glukoz eklendiğinde

bu artışın ortaya çıkması, hem hipoksinin hem de hipogliseminin hücrelerde endojen savunma mekanizmaları geliştirmesiyle ilişkili olabilir.

Glukoz deprivasyonu da hücre hasarının gelişmesi için bir risk faktörüdür. Kardiak fibroblast hücrelerinde yapılan bir çalışmada, hipoksi olmadan sadece glukoz deprivasyonu olduğunda bile hücrede ROS oluşumunun arttığı ve ortama glukoz (3 g/litre) eklenmesinden 1 saat sonra hem oksijenaz 1 ve siklooksijenaz 2 enzim ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir (192). Bizim çalışmamızda da reoksijenasyon aşamasında ortama yüksek dozda glukoz eklendiğinde (25 mmol/L) anlamlı ROS artışı saptandı. Ortama fizyolojik dozlarda glukoz eklenmesi, glikolitik yolu kullanan hücre kültür ortamında normoglisemi sağlayamadığından hipoglisemi gibi hücrede endojen korunma mekanizmaları geliştirebilir ve reperfüzyon aşamasında ortaya çıkan hasarı oluşturmayabilir. 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 (193). Bu çalışmayla uygun olarak, çalışmamızda da 6 saatlik OGD süresini takiben reoksijenasyon aşamasında, hücrelere ulaşan oksijenin yanı sıra, ortama 25 mmol/L (4.5 mg/mL) glukoz eklendiğinde 60. dakikada ROS artışı saptanmıştır.

Reaktif oksijen türleri, hücre metabolizması sırasında ortaya çıkan; hücre işlevlerini olumsuz yönde etkileyen, biyolojik moleküllere zarar vererek apoptotik ya da nekrotik hücre ölümüne neden olan maddelerdir (194). Apoptozis; düzenli DNA yıkılması ve nükleusun fragmantasyonu, plazma membran bütünlüğünün korunması ve apoptotik cisimciklerin oluşması ile karakterizedir. ATP bağımlıdır. Apoptotik hücrelerin fagositler tarafından alınmasını kolaylaştırmak amacıyla plazma membranının üzerinde fosfotidil serin gibi moleküller açığa çıkar. İmmun cevabı baskılamak için de, lizofosfotidil kolin gibi moleküller salınır. Programlanmış ve aktif hücre ölümü olan apoptozun tersine, nekrozda kontrol edilmemiş, patolojik ve düzenli olmayan bir ölüm şekli söz konusudur. Hücre organelleri şişer, plazma membranın bütünlüğü kaybolur ve hücrenin ATP üretimi bozulur. Nekrotik hücre ölümü sıcak, soğuk, mekanik kuvvet gibi fizyolojik olmayan koşullarda meydana gelir ve bu da nekrozun programlanmamış hücre ölümü olduğu görüşünü desteklemektedir. Oksijenin varlığında hücreler devamlı olarak ROS oluştururlar. ROS'un artması oksidatif strese neden olur, hücre içi moleküllere ve organellere zarar verir ve nekrozla sonuçlanır.

Hücrede ROS'un ana kaynağı mitokondridir. ROS'un artması DNA'ya zarar verebilir (DNA ipliklerini ayırır, DNA-protein çapraz bağlanması ve pürinlerin oksidasyonuna neden olabilir) ve lipidleri modifiye eder. Doymamış yağ asitlerindeki çift bağlar ROS'un hedefidir. Lipid oksidasyonu hem plazma membranının hem de hücre içi membranların (lizozom, endoplazmik retikulum gibi) bütünlüğünün kaybına ve bu da proteazların hücre içine sızmasına ya da Ca^{+2} nun girişine neden olmaktadır. ROS'un diğer bir hedefi sülfidril bağlı proteinler ya da sülfür içeren aminoasit kalıntılarıdır. ROS disülfid bağlarına etki edebilir ve sülfidril bağlantılarını yıkabilir; böylece proteinlerin fonksiyonunu değiştirir. ROS'un aracılık ettiği protein modifikasyonları Ca^{+2} kanallarında değişiklik yaparak nekroza neden olabilmektedir. Hem endoplazmik retikulum hem de plazma membranı Ca^{+2} kanalları ROS'la etkilenmekte, Ca^{+2} akışı sonucunda nekroz tetiklenmektedir (195).

H-R hasarında artan reaktif oksijen türlerinin hücresel fonksiyon bozukluğuna yol açtığı gösterilmiştir (153). Organ ya da hücre tipine bağlı olarak çeşitli enzimler ROS oluşumuna yol açabilmektedir (196). Çalışmamızda HCMVE hücrelerinde 6 saat OGD uygulamasını takiben farklı reoksijenasyon süreleri uygulandığında, reoksijenasyonun 60. dakikasında ROS artışının anlamlı olduğu saptandı. Literatürde yapılan çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışmada farklı hasar modelleri ile farklı tip doku veya hücrelerde ROS artışı gösterilmiştir. Kardiak fibroblast hücrelerinde glukoz deprivasyonu ile 30 dakikada, pulmoner arter endotel hücrelerinde hipoksi ile 20 dakikada**,** PC12 hücrelerinde ise, hiperoksiden sonra hipoksinin 3. saatinden itibaren ROS'un anlamlı olarak arttığı saptanmıştır (192,197,198). Primer rat kortikal nöron hücre hattında 3 ve 5 saat hipoksinin yanı sıra glukoz deprivasyonu da sağlandığında, sadece hipoksiye göre ROS anlamlı olarak artmıştır (199). Reoksijenasyon aşamasında ROS artışını gösteren çalışmalar da yapılmıştır. Embriyonik rat kardiyomyosit hücre hattında 24 saat hipoksi ve glukoz deprivasyonunu takiben reoksijenasyonun 60. dakikasında ROS'un arttığı gösterilmiştir (200). Benzer şekilde, K562 eritrolösemi hücre hattında 22 saat hipoksiden sonra 1 ve 24 saat reoksijenasyon uygulandığında, ROS 1. saatte anlamlı olarak artmıştır (201). Bulgularımız literatürde yer alan pek çok hücre hattı çalışması ile uyumludur.

Çalışmamızda ROS ölçümüne, reoksijenasyonun erken dakikalarından itibaren (15, 60. dakikalar ve 24. saatte) başlanmış ve ROS artışı reoksijenasyonun 60. dakikasında anlamlı iken, daha sonraki zaman diliminde (24 saat) bu artış saptanmamıştır. 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 ROS artışı olduğunu, daha sonra sitoplazmada ROS artışının gerçekleştiğini ve bu artan oksijen türlerinin intrasellüler redoks dengesini değiştirdiğini ve daha sonra bazı sinyal yollarını aktive ettiklerini göstermişlerdir (202). Therade ve arkadaşlarının yaptığı ve HUVE hücrelerinin kullanıldığı çalışmada da RGE'nin 1. saatinde ROS artışı olmuş ve bunun mitokondri kaynaklı olduğu gösterilmiştir (153). Yapılan çalışmalarda hücre içinde artan ROS'un plazma membranında bulunan fosfolipidlere peroksidasyon yoluyla hasar verdiği ve hücre ölüm nedenlerinden birinin bu peroksidasyon olduğu gösterilmiştir (203). 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 ROS'un anlamlı olarak arttığını göstermişlerdir (204). Ancak hücre lizatlarında lipid peroksidasyonunun 24 saat hipoksiyi takiben reoksijenasyonun 2. saatinde arttığını saptamışlardır. Bu çalışmada tripan blue boyası ile hücre canlılığı araştırıldığında bu sürelerde hücre ölümünde bir artış saptamamışlardır. İnsan serebral endotel hücre ve lökosit ko-kültürü yapılan ve 2 saat hipoksi + 1 saat reoksijenasyon hasarı uygulanan bir çalışmada, lökositlerde ROS artışının saptandığı ve Çin tıbbında kullanılan bir bitki kökünden elde edilen trashinon IIA'nın bu ROS artışını engellediği saptanmıştır (205). Bu çalışmada, çalışmamızdan farklı olarak ko-kültürde kullanılan lökositlerde ROS ölçümü yapılmıştır. Çalışmamızda ise HCMVE hücrelerindeki ROS ölçülmüştür.

Resveratrolün ROS oluşumu üzerine etkisi

Çalışmamızda HCMVE hücrelerinde farklı dozlarda kullanılan resveratrolün 6 saat OGD + 1 saat RGE uygulaması sonucu oluşan ROS üretimini anlamlı olarak azalttığı saptandı.

Resveratrol iki farklı mekanizma ile antioksidan etki gösterir; hem direkt olarak serbest radikal (hidroksil radikali, süperoksit anyonu radikali) yakalayıcı özelliğe sahiptir, hem de antioksidan enzimlerin aktivitesini artırır. Resveratrolün hidroksil fenolik gruplarının denge durumuna ve elektronların delokalizasyonuna bağlı olarak kimyasal yapısından kaynaklanan bir antioksidan kapasitesi bulunmaktadır. Lopez ve arkadaşları, şarapta bulunan

ve doğal antioksidan olarak kabul edilen dört bileşiğin (gallic acid, trans-resveratrol, kersetin ve pentahidroksiflavon- 3-rutinozid) fenolik gruplarının total fenol miktarını (spektrofotometrik, fluorometrik ve kromatografik) ve total antioksidan aktivitelerini değerlendirmişlerdir (206). Bu bileşiklerin antioksidan aktiviteleri ve fenol yapıları arasındaki ilişki incelendiğinde, fenolik asitlerin hidroksil ve metil grupları arttıkça aktivitenin de arttığı saptanmıştır. Bu nedenle, kırmızı şaraptaki bu dört bileşik de antioksidan olarak güçlü bulunmuş ve polifenollerin serbest radikal yakalayıcı aktivite için ideal bir kimyasal yapıya sahip olduğu belirtilmiştir (206).

Resveratrolün direkt serbest radikal yakalayıcı etkisi yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ungvari ve arkadaşları, hücre içermeyen koşullara UV ışınları veya parakuat uyguladıklarında hidrojen peroksit oluşumunun arttığını, kısa (1 saat) ve uzun süreli (24 saat) resveratrol (1, 10 ve 100 μM) uygulandığında hidrojen peroksitin neden olduğu floresans artışının engellediğini göstermişlerdir (207). Holthoff ve arkadaşları da sığır serum albumini kullanarak yaptıkları çalışmada, ortamdaki tirozin rezidüsünün peroksinitrit aracılığı ile nitrozillenmesini (nitrotirozin oluşumu) resveratrolün doza bağımlı olarak inhibe ettiğini göstermişler ve bu etkisinin direkt peroksinitrit yakalayıcı etkisine bağlamışlardır (208). Ayrıca, kırmızı şarapta bulunan ve resveratrol dimeri olan pallidolün tek oksijen yakalayıcısı olduğu saptanmıştır (209). Faustino ve arkadaşları hücre içermeyen ortama eklenen 0.1 μM resveratrolün ortamdaki LDL'nin oksidasyonunu engellediğini saptamışlardır (210). İnsanlarda yapılan çalışmalarda da resveratrolün antioksidan etkinliği araştırılmıştır. Sağlıklı gönüllülere 6 hafta boyunca 40 mg/gün resveratrol verildiğinde, mononukleer hücrelerin ROS üretiminde kontrol grubuna göre belirgin azalma saptanmıştır (211). Benzer şekilde, sağlıklı erişkinlere 300 mL kırmızı şarap içirildikten bir saat sonra ölçülen serum total antioksidan kapasitesi %18, bir gram C vitamini aldıktan bir saat sonra %22 ve beyaz şarap içirilen grupta ise %4 bulunmuştur (212). Bu farklılık, kırmızı şarapta bulunan resveratrolün antioksidan etkisi ile açıklanmaktadır.

Farklı hasar modelleri ve farklı hücre tiplerinde (malign glioma hücreleri, hiperglisemi modeli oluşturulan rat mezangial hücreleri, lenfoma hücreleri, kolon kanser hücreleri, hidrojen peroksit ile muamele edilen retinal pigment epitel hücreleri, zidovudin ilişkili kardiomyosit hasarı, fare karaciğer hücreleri, ülseratif kolit modeli oluşturulan fare kolon hücreleri, *Helicobacter pylori* ile enfekte gastrik epitel hücreleri) resveratrolün ROS azaltıcı etkisi gösterilmiştir (213-222).

Çeşitli endotel hücre tiplerinde ve farklı hasar modellerinde resveratrolün ROS oluşumunu engelleyici etkisi gösterilmiştir. Zhang ve arkadaşları, ox-LDL ile HUVE hücrelerinde ROS miktarında artış, NF κB aktivasyonu ve apoptoz indüksiyonu sağlamışlar ve bir resveratrol analoğu olan pterostilben kullanımı ile bu etkilerin azaltıldığını göstermişlerdir (223). Yuan ve arkadaşları da hiperglisemi modeli ile endotel hücrelerinde ROS artışı, tüp formasyonunda ve Sirt1 mRNA ekspresyonunda azalma saptamışlar, yine bir resveratrol analoğu olan BTM-0512 verdiklerinde bu etkilerin belirgin olarak gerilediğini tespit etmişlerdir (224). Bir başka çalışmada, pulmoner endotel hücrelerine gerilme stresi uygulandığında ROS ve apoptozun arttığı ve resveratrol uygulaması ile bu etkilerin azaltıldığı tespit edilmiştir (225). Ungvari ve arkadaşları, rat aort hücrelerinde TNF alfa ve ox-LDL ile apoptotik hasar oluşturduklarında, kullanılan resveratrolün hücre içi ROS oluşumunu ve apoptozu azalttığını, glutatyon peroksidaz, katalaz ve heme oksijenaz ekspresyonunda artışa yol açtığını saptamışlardır (207). Bu çalışmada, hücre içermeyen koşullarda resveratrolün direkt antioksidan etkinliği de gösterilmiş, ayrıca antioksidan enzimlerin ekspresyonlarını artırmak yoluyla da ROS oluşumunu engellediği belirtilmiştir (207). Sayın ve arkadaşları, insan koroner arter hücrelerine (HCAC) resveratrolle (10 ve 50 μM dozlarda) 1, 12 ve 24 saat süreyle pre-inkubasyon uyguladıklarında, resveratrolün bu süreler sonunda 750 μM H_2O_2 ile oluşturulan hücre hasarını (laktat dehidrogenaz testi ile) belirgin olarak azalttığını saptamışlardır (226). Bu çalışmada ayrıca resveratrol ile (10, 50 ve 100 μM dozlarda) 24 saat pre-inkubasyon uygulandıktan sonra, 750 μM H_2O_2 uygulaması yapılmış ve resveratrolün tüm dozlarının 15, 60 dakika ve 6 saat sonundaki ROS artışını anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır (226). Sayın ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada da H_2O_2 hasarı oluşturulan HCAC hücrelerinde resveratrolün indirgenmiş glutatyon düzeyini ve gama-glutamil sistein sentetaz, glutatyon peroksidaz-1 ve glutatyon redüktaz enzimlerinin protein ekspresyonlarını anlamlı olarak arttırdığı saptanmıştır (227).

Resverarolün serebral endotel hücrelerinde ROS azaltıcı etkisi bir çalışmada gösterilmiştir. Chang ve arkadaşları ox-LDL ile fare serebral endotel hücrelerinde oksidatif hasar oluşturmuşlar, DNA fragmantasyonu ve apoptoziste artış saptamışlar, resveratrol ile tüm bu patolojik etkilerin azaldığını tespit etmişlerdir (228). Ancak bu araştırma, çalışmamızdan farklı olarak fare serebral endotel hücreleri ile yapılmıştır ve ox-LDL ile hasar oluşturulmuştur. Çalışmamızda ise OGD + RGE hasar modeli uygulanmış ve HCMVE hücreleri kullanılmıştır.

İskemi-reperfüzyon veya *in vitro* uygulamalarının (H-R, OGD + RGE) hücrelerde ROS oluşumunu artırdığı bilinmektedir. Resveratrolün I-R hasarı sonrası oluşan ROS üzerine etkisi farklı çalışmalarla gösterilmiştir. Ratlarda serebral I-R hasarı oluşturulduğunda, hipokampus ve kortekste ROS, NO ve lipid peroksidasyon ürünlerinde artışı saptandığı, hasar uygulanmadan önce 7 gün süreyle 30 mg/kg RSV verildiğinde ise bu artışların ve nöronal ölümün engellendiği saptanmıştır (229). Benzer şekilde Shin ve arkadaşları I-R hasarı oluşturdukları farelere iskemiden sonra iki farklı dozda (1 ve 5 mg/g/doz) resveratrol verildiğinde enfarkt alanının azaldığı, iskemik kortekste ROS, IL-1β ve TNF-α üretiminin belirgin olarak baskılandığı saptanmıştır (230). Literatürde benzer şekilde, resveratrolün farklı dozlarının iskemi öncesi, iskemi sırasında veya iskemi sonrası verildiği ve nöron koruyucu etkisinin her uygulamada da gösterildiği pek çok çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızda da I-R'un *in vitro* hasar modellerinden birisi olarak OGD + RGE kullanılmış; HCMVE hücrelerinde bu model ile ROS oluşumunda artış sağlanmış ve literatürde ilk kez resveratrolün HCMVE hücrelerinde OGD + RGE hasarı sonucu artan ROS'u azaltıcı etkisi gösterilmiştir.

Resveratrolün Nrf2 ekspresyonu üzerine etkisi

Çalışmamızda öncelikle resveratrolün OGD + RGE hasarında ROS'u azaltıcı etkisi araştırıldı. Kullanılan tüm dozların (0.1, 1, 10, 50 ve 100 μM dozlarda) bu modelde ROS'u azalttığı saptandı. Resveratrolün Nrf2 ekspresyonu üzerine etkisinin incelenmesi için ise bu dozlardan birisi olan 10 μM seçildi. Ayrıca, Nrf2 ekspresyonu tayini için kullanılan zaman aralıkları da ROS ölçümleri ile uyumlu olacak şekilde seçildi (1, 3, 6, 9 ve 24 saat). Çalışmamızda 10 μM dozda kullanılan resveratrolün birinci saatten itibaren sitoplazmada Nrf2 ekspresyonunu indüklediği görüldü. Reaktif oksijen türleri oluşumu üzerine olan azaltıcı etkisi de RGE'nin 60. dakikasında ölçüldü ve ROS azaltıcı etkisi saptandı.

Resveratrol, antioksidan ve sitoprotektif etkilerinin bir kısmını Nrf2'yi aktive ederek göstermektedir. Bu etki farklı hücre hatlarında (PC12 hücreleri, akciğer epitel hücreleri, astrositler, hepatositler, keratinositler, vasküler düz kas hücreleri) gösterilmiştir (4-9). Chen ve arkadaşları, hidrojen peroksit hasarı oluşturdukları PC12 hücrelerini resveratrol (15 μM) ile 1, 3, 6, 9 ve 12 saat inkübe ettiklerinde, Nrf2 proteininin 3, 6, 9 ve 12. saatlerde nükleusa transloke olduğunu saptamışlardır (4). Sitoplazmik ekstraktlarda ise değişiklik meydana gelmemiştir. Bu çalışmada Western blot yönteminin yanı sıra EMSA (Electromobility shift

assay) adı verilen yöntem ile de nukleusa transloke olan Nrf2'nin ARE bağlanma bölgesine bağlandığı tespit edilmiştir. Ayrıca RSV, Nrf2 hedef genlerinden biri olan HO-1'in 3. ve 6. saatte mRNA ekspresyonunu, 6, 12 ve 24. saatlerde ise HO-1 protein ekspresyonunu artırmıştır (4). Çalışmamızda sadece sitoplazmik ekstraktlar kullanılmış, literatürle ve deneyimizdeki ROS ölçümüyle uyumlu sürelerde ve 10 μM resveratrol dozu ile deneyler yapılmıştır.

Resveratrolün Nrf2 üzerine etkisi *in vivo* yapılan çalışmalarda da araştırılmıştır. Ratlarda oluşturulan serebral iskemi modelinde RSV verilmesinin enfarkt bölgesini azalttığı; ayrıca, kortikal doku homojenatı örneklerinde MDA düzeyini azalttığı, SOD aktivitesini artırdığı, Nrf2 ve HO-1 mRNA ve protein ekspresyonlarını artırdığı gösterilmiştir (11). Ayrıca kaspaz-3 aktivitesini ve apoptozu da azalttığı saptanmıştır (11). Resveratrol sadece Nrf2'yi aktive ederek değil diğer antioksidan yolakları da etkileyerek antioksidan etkilerini göstermektedir. Diyabetik nefropati modeli uygulanan ratlara RSV verildiğinde, Nrf2 mRNA ve protein ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (150). Ayrıca RSV verilen grupta hücre içi non-enzimatik antioksidanlar olan C ve E vitamini ve glutatyon düzeylerinin arttığı, renal süperoksid anyonu, hidroksil radikali, lipid peroksitler, nitrik oksit, proinflamatuvar sitokinler (TNF-α, IL-1β, IL-6) ve NF κB düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (150). Rubiolo ve arkadaşları, primer rat hepatosit hücre kültüründe tert-butiril hidroperoksit (tBHP) ile oksidatif hasar oluşturmuşlar, bu uygulamadan önce 25, 50 ve 75 μM dozlarda resveratrol ile 24 saat boyunca hücreleri inkube ettiklerinde LDH salınımının resveratrol uygulanan grupta %10, buna karşın resveratrol uygulanmayan grupta ise %70 olduğunu tespit etmişlerdir (222). Buna ek olarak, hücreler bizim çalışmamızda olduğu gibi hasar modeli oluşturulmaksızın resveratrol ile inkübe edilmişler; 25, 50 ve 75 μM dozlarda resveratrol ile 6, 24 ve 48 saat boyunca inkube edildiklerinde, en fazla Nrf2 protein ekspresyonunun 24 saatlik 50 ve 75 μM resveratrol uygulaması ile ortaya çıktığı gösterilmiştir (231). Çalışmamızda ise 1, 3, 6, 9 ve 24 saat boyunca hücreler 10 μM dozda resveratrol ile inkube edilmiş ve sitoplazmada 1. saatten itibaren Nrf2 protein ekspresyonunda artış tespit edilmiştir. Daha farklı dozlarda resveratrol kullanılması ile bu hücrelerde Nrf2 protein ekspresyonu düzeylerinde değişiklik olup olmayacağı ile ilgili yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Resveratrolün endotel hücrelerinde Nrf2 aktivasyonu yaptığına dair bir yayın bulunmaktadır. Ancak HCMVE hücrelerinde Nrf2'yi mRNA veya protein düzeyinde aktive ettiğine dair yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Literaturde endotel hücrelerinde yapılmış

olan çalışmada Ungvari ve arkadaşları, insan koroner arter endotel hücrelerini 24 saat boyunca 10-30 mM glukoz ile muamele ederek hiperglisemi modeli oluşturmuşlar, bu uygulamadan önce de farklı konsantrasyonlarda (10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} mmol/L) resveratrol ile inkube etmişlerdir (10). Resveratrolün doza bağımlı olarak Nrf2'yi protein ve mRNA düzeyinde ve Nrf2'nin hedef genleri olan NQO-1, HO-1 ve gama glutamil sistein sentetaz'ı ise mRNA düzeyinde anlamlı olarak artırdığı tespit edilmiştir (10). Bu çalışmada ayrıca 10 μm resveratrol ile hücreler muamele edildiklerinde artmış olan Nrf2 mRNA düzeyinin, "Nrf2 small interfering RNA" (siRNA) ile baskılandığı saptanmıştır. Yine siRNA ile Nrf2 yolağı baskılandığında resveratrolün mitokondriyal süperoksit üretimini azaltıcı etkisinin ortadan kalktığı tespit edilmiştir. Bütün bu verilere dayanarak resveratrolün ROS'u elimine etmek için Nrf2 yolağını kullandığı gösterilmiştir (10). Çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak OGD + RGE modeli uygulanmış, HCMVE hücreleri kullanılmış ve resveratrolün bu hücrelerde Nrf2 protein ekspresyonunu artırıcı etkisi ilk kez gösterilmiştir. Her iki araştırmada da Nrf2 ekspresyonu için 10 μm dozunda resveratrol kullanılmıştır. Çalışmamızda siRNA deneyi yapılmamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmanın hipotezi, "*in vitro* insan serebral mikrovasküler endotel hücrelerinde oluşturulan H-R hasar modelinde, RSV hücreleri ROS düzeyini azaltarak ve Nrf2 ekspresyonunu arttırarak oksidatif strese karşı korumaktadır" şeklinde formüle edilmiştir. Bu hipotezi sınamak amacıyla önce H-R hasarı oluşturulmuştur. H-R hasarının hücreler üzerindeki etkisi ROS ölçümü ile değerlendirilmiş, ayrıca farklı dozlarda uygulanan RSV'nin ROS oluşumunu azaltıp azaltmadığı araştırılmıştır. Daha sonra RSV'nin Nrf2 ekspresyonu üzerine olan etkisi de değerlendirilmiştir. Çalışmada H-R hasar modelinde resveratrolün HCMVE hücrelerinde ROS üretimini azalttığı ve ayrıca Nrf2 protein ekspresyonunu artırdığı saptanmıştır. Bu bulgular başta kurgulanan hipotezi desteklemektedir.

Bu çalışmada ortaya konan bulgulardan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

1. HCMVE hücrelerine 6 saat OGD + 1 saat RGE uygulandığında ROS üretiminde anlamlı artış saptanmış, resveratrolün farklı dozları ile (0.1, 1, 10, 50 ve 100 μM) hücreler inkube edildiğinde ROS üretimi anlamlı olarak azalmıştır. Bu araştırma ile literatürde ilk kez resveratrolün HCMVE hücrelerinde OGD + RGE hasarı sonucu artan ROS'u azaltıcı etkisi gösterilmiştir.
2. HCMVE hücreleri farklı saat sürelerince 10 μM resveratrol ile muamele edildiğinde birinci saatten itibaren sitoplazmada Nrf2 ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir ve resveratrolün bu hücrelerde Nrf2 protein ekspresyonunu artırıcı etkisi literatürde ilk kez gösterilmiştir.

Çalışmamızın bulguları ışığında ileriye yönelik olarak yapılması uygun olacak araştırma konuları şöyle sıralanabilir:

1. Projemizde tek tip hücre (monokültür) ve tek tabaka (monolayer) hücre kültürü yapılmıştır. Sonraki çalışmalarda özellikle ROS sentezinin ana kaynağı olan nötrofil ile ko-kültür (HCMVE hücresi-nötrofil) yapılması *in vivo* ortamda meydana gelen I-R sürecindeki değişiklikleri daha iyi gösterebilir ve farklı sonuçlar ortaya çıkarabilir. Ayrıca HCMVE hücresi-glia, HCMVE hücresi-nöron gibi ko-kültürlerin yapılması da beyinde endotel hücresi ve diğer hücreler ile ilişkilerin gösterilmesi açısından uygun olacaktır.

2. Çalışmamızda resvratrolün farklı dozlarının ROS azaltıcı etkisi gösterildi. Bu dozlarda ve uygun zaman aralıklarında resveratrolün hücreyi hasardan ve apoptozdan koruyup korumadığı da incelenmelidir.
3. Çalışmamızda resveratrolün sitoplazmada Nrf2 protein ekspresyonunu artırdığı gösterildi. Nukleer örneklerin de elde edilerek Nrf2'nin nukleer translokasyonunun gösterilmesi de uygun olacaktır. Ayrıca farklı dozlarda reveratrolün Nrf2 protein ekspresyonunu nasıl etkileyeceği de incelenmelidir.
4. EMSA yöntemi kullanılarak resveratrol tarafından indüklenen Nrf2'nin nukleusa transloke olduğunda ARE bölgesine bağlanıp bağlanmadığının incelenmesi de önemli bir çalışma basamağı olacaktır.
5. Resveratrol tarafından indüklenen Nrf2'nin ARE bölgesine bağlandıktan sonra ekspresyonunu uyardığı antioksidan enzimlerin (NQO-1, HO-1, glutatyon reduktaz, glutamil sistein sentetaz, glutatyon peroksidaz gibi) mRNA ve protein ekspresyonlarına bakılması da resveratrolün etki mekanizmalarının ortaya çıkarılması açısından önemlidir.
6. siRNA aracılığı ile Nrf2 yolağı bloke edilerek resveratrolün saptanmış olan etkilerinin devam edip etmediği ve bu şekilde bu etkilerin Nrf2 yolağı ile gerçekleşip gerçekleşmediği incelenmelidir.
7. Yaptığımız *in vitro* çalışmaların yanı sıra, resveratrolün oksidatif strese ve I-R hasarına karşı endotel hücrelerini koruyup korumadığının gösterilmesi açısından *in vivo* çalışmaların da (Ör: Nrf2 knockout (KO) fareler) yapılması önerilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Jung JE, Kim GS, Chen H, Maier CM, et al. Reperfusion and neurovascular dysfunction in stroke: from basic mechanisms to potential strategies for neuroprotection. Mol Neurobiol 2010;41:172-9.
2. Badruddin A, Taqi MA, Abraham MG, Dani D, et al. Neurocritical care of a reperfused brain. Curr Neurol Neurosci Rep 2011;11:104-10.
3. Kovacic P, Somanathan R. Multifaceted approach to resveratrol bioactivity: Focus on antioxidant action, cell signaling and safety. Oxid Med Cell Longev 2010;3:86-100.
4. Chen CY, Jang JH, Li MH, Surh YJ. Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. Biochem Biophys Res Commun 2005;331:993-1000.
5. Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang SR, et al. Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2008;294:L478-88.
6. Erlank H, Elmann A, Kohen R, Kanner J. Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes via H(2)O(2), semiquinones, and quinones. Free Radic Biol Med (basımda).
7. Wagner AE, Boesch-Saadatmandi C, Breckwoldt D, Schrader C, et al. Ascorbic acid partly antagonizes resveratrol mediated heme oxygenase-1 but not paraoxonase-1 induction in cultured hepatocytes - role of the redox-regulated transcription factor Nrf2. BMC Complement Altern Med 2011;11:1.
8. Liu Y, Chan F, Sun H, Yan J, et al. Resveratrol protects human keratinocytes HaCaT cells from UVA-induced oxidative stress damage by downregulating Keap1 expression. Eur J Pharmacol 2011;650:130-7.
9. Kim JW, Lim SC, Lee MY, Lee JW, et al. Inhibition of neointimal formation by trans-resveratrol: role of phosphatidyl inositol 3-kinase-dependent Nrf2 activation in heme oxygenase-1 induction. Mol Nutr Food Res 2010;54:1497-505.
10. Ungvari Z, Bagi Z, Feher A, Recchia FA, et al. Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2010;299:18-24.

11. Ren J, Fan C, Chen N, Huang J, et al. Resveratrol pretreatment attenuates cerebral ischemic injury by upregulating expression of transcription factor Nrf2 and HO-1 in rats. Neurochem Res 2011;36:2352-62.

12. Luo J, Martinez J, Yin X, Sanchez A, et al. Hypoxia induces angiogenic factors in brain microvascular endothelial cells. Microvasc Res (basımda).

13. Niizuma K, Yoshioka H, Chen H, Kim GS, et al. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia. Biochim Biophys Acta 2010;1802:92-9.

14. Jung JE, Kim GS, Narasimhan P, Song YS, Chan PH. Regulation of Mn-superoxide dismutase activity and neuroprotection by STAT3 in mice after cerebral ischemia. J Neurosci 2009;29:7003-14.

15. Taylor CT. Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. Biochem J 2008;409:19-26.

16. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1α. Cell Death Differ 2008;15:621-627.

17. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via *de novo* protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. Mol Cell Biol 1992;12:5447-5454.

18. Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Activation of the HIF pathway in cancer. Curr Opin Genet Dev 2001;11:293-299.

19. Compernolle V, Brusselmans K, Franco D, et al. Cardia bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxiainducible factor 1α. Cardiovasc Res 2003;60:569-579.

20. Yoon D, Pastore YD, Divoky V, et al. Hypoxia-inducible factor-1 deficiency results in dysregulated erythropoiesis signaling and iron homeostasis in mouse development. J Biol Chem 2006;281:25703-25711.

21. Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. New Engl J Med 2011;365:537-547.

22. Brahimi CH, Mazure N, Pouyssegur J. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1a requires multiple posttranslational modifications. Cell Signal 2005;17:1-9.

23. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O_2 tension. Am J Physiol 1996;271(4 Pt 1):C1172-C1180.

24. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, et al. Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. FASEB J 2001;15:1312-1314.

25. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. Ann NY Acad Sci 2000;899:136-47.

26. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007;39:44-84.

27. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. Toxicology 2011;283:65–87.

28. Avery SV. Molecular targets of oxidative stres. Biochem. J 2011;434:201-10.

29. Mammucari C, Rizzuto R. Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging. Mech Ageing Dev 2010;131:536-43.

30. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodeling. Cardiovasc Res 2009;81:449-56.

31. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. J Cell Biol 2011;194:7–15.

32. Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, et al. Mitochondrial H2O2 emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. J Clin Invest 2009;119:573-81.

33. Bonnard CA, Peyrol DS, Chanseaume E, Chauvin MA, et al. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. J Clin Invest 2008;118:789-800.

34. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. Free Radic Biol Med 2011;50:567-75.

35. Duh EJ, Maury WJ, Folks TM, Fauci AS, et al. Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF kappa B sites in the long terminal repeat. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:5974-8.

36. Kamp DW, Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer: the role of the mitochondria. Oncology (Williston Park) 2011;25:400-10.

37. Aggarwal BB, Sung B. The relationship between inflammation and cancer is analogous to that between fuel and fire. Oncology (Williston Park) 2011;25:414-8.

38. KC S, Carcamo JM, Golde DW. Antioxidants prevent oxidative DNA damage and cellular transformation elicited by the over-expression of c-MYC. Mutat Res 2006;593:64-79.

39. Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, et al. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107:8788-93.

40. Yoon JC, Ng A, Kim BH, Bianco A, et al. Wnt signaling regulates mitochondrial physiology and insulin sensitivity. Genes Dev 2010;24:1507-18.

41. Diaz B, Shani G, Pass I, Anderson D, et al. Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation. Sci Signal 2009;2:ra53.

42. Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. Redox biology and gastric carcinogenesis: the role of Helicobacter pylori. Redox Rep 2011;16:1-7.

43. Mach F, Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling in vascular cells: a key role in atherosclerosis? Atherosclerosis 1998;137:89-95.

44. Kawano S, Kubota T, Monden Y, Tsutsumi T, Inoue T, Kawamura N, et al. Blockade of NF kappaB improves cardiac function and survival after myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006; 291:1337-44.

45. Elahi MM, Kong YX, Matata BM. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. Oxid Med Cell Longev 2009;2:259-69.

46. Haynes WG, Webb DJ. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. Lancet 1994;344:852-4.

47. Heitzer T, Just H, Munzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. Circulation 1996;94:6-9.

48. Touyz RM. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. Antioxid Redox Signal 2005;7:1302-14.

49. Bartz RR, Piantadosi CA. Clinical review: Oxygen as a signaling molecule. Critical Care 2010;14:234-42.

50. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright J Jr, et al. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:9782-7.

51. Wang H, Yang YJ, Qian HY, Zhang Q, et al. Resveratrol in cardiovascular disease: what is known from current research? Heart Fail Rev (basımda).

52. Jancso G, Cserepes B, Gasz B, Benko L, et al. Expression and protective role of heme oxygenase-1 in delayed myocardial preconditioning. Ann NY Acad Sci 2007;1095:251-61.

53. Akamatsu Y, Haga M, Tyagi S, Yamashita K, et al. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide protects hearts from transplant associated ischemia reperfusion injury. FASEB J 2004;18:771-2.

54. Piantadosi CA, Carraway MS, Babiker A, Suliman HB. Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. Circ Res 2008;103:1232-40.

55. Kelsey NA, Wilkins HM, Linseman DA. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. Molecules 2010;15:7792-814.

56. Alam J. The mammalian Cap and Collar Family of transcription factors. Antioxid Redox Signal 2006;1:39-42.

57. Tkachev VO, Menshchikova EB, Zenkov NK. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. Biochem (Moscow) 2011;76:407-22.

58. Sykiotis GP, Bohmann D. Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. Sci Signal 2010;3:re3.

59. Vargas MR, Johnson JA. The Nrf2–ARE cytoprotective pathway in astrocytes. Expert Rv Mol Med 2009;11:e17.

60. Hayes JD, McMahon M, Chowdhry S, et al. Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. Antioxid Redox Signal 2010;13:1713-48.

61. Fourquet S, Guerois R, Biard D, Toledano MB. Activation of Nrf2 by nitrosative agents and H_2O_2 involves Keap1 disulfide formation. J Biol Chem 2010;285:8463-71.

62. Cullinan SB, Gordan JD, Jin J, Harper JW, et al. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. Mol Cell Biol 2004;24:8477–86.

63. Nguyen T, Sherratt PJ, Huang HC, Yang CS, et al. Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. J Biol Chem 2003;278:4536-41.

64. Li W, Kong AN. Molecular mechanisms of Nrf2-mediated antioxidant response. Mol Carcinog 2009;48:91–104.

65. Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, et al. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:2040–5.

66. Nioi P, Nguyen T. A mutation of Keap1 found in breast cancer impairs its ability to repress Nrf2 activity. Biochem Biophys Res Commun 2007;362:816-21.

67. Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Wakabayashi N. Keap1, the sensor for electrophiles and oxidants that regulates the phase 2 response, is a zinc metalloprotein. Biochemistry 2005;44: 6889-99.

68. Tong KI, Katoh Y, Kusunoki H, Itoh K, Tanaka T, et al. Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. Mol Cell Biol 2006;26:2887-900.

69. Zhang DD, Lo SC, Cross JV, Templeton DJ, et al. Keap-1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. Mol Cell Biol 2004;24:10941-53.

70. McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M, et al. Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron. J Biol Chem 2004;279:31556-67.

71. Wasserman WW, Fahl WE. Functional antioxidant responsive elements. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:5361-6.

72. Prochaska HJ, Talalay P. Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. Cancer Res 1988;48:4476-82.

73. Kwak MK, Itoh K, Yamamoto M, et al. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. Mol Cell Biol 2002;22:2883-92.

74. Lo SC, Hannink M. PGAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria. Exp Cell Res 2008;314:1789-803.

75. Kensler TW, Wakabayashi N. Nrf2: friend or foe for chemoprevention? Carcinogenesis 2010;31:90-9.

76. Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. J Biol Chem 2002;277:42769-74.

77. Lee JM, Hanson JM, Chu WA, Johnson JA. Phosphatidylinositol 3-kinase, not extracellular signal-regulated kinase, regulates activation of the antioxidant-responsive element in IMR-32 human neuroblastoma cells. J Biol Chem 2001;276:20011-6.

78. Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, et al. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. J Biol Chem 2003;278:8135-45.

79. Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. Trends Mol Med 2004;10:549–57.

80. McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, Chanas SA, et al. The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. Cancer Res 2001;61:3299–307.

81. Cheng X, Siow RCM, Mann GE. Impaired redox signaling and antioxidant gene expression in endothelial cells in diabetes: A role for mitochondria and the nuclear factor-E2-related factor 2-Kelch-like ECH-associated protein 1 defense pathway. Antioxid Redox Signal 2011;14:469-88.

82. Carayol N, Chen J, Yang F, Jin T, et al. A dominant function of IKK/NF kappaB signaling in global lipopolysaccharide-induced gene expression. J Biol Chem 2006;281:31142-51.

83. Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, Itoh K, et al. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in Nrf2 transcription factor-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:3410-5.

84. Ramos-Gomez M, Dolan PM, Itoh K, Yamamoto M, et al. Interactive effects of Nrf2 genotype and oltipraz on benzo[a]pyrene-DNA adducts and tumor yield in mice. Carcinogenesis 2003;24:461-7.

85. Aoki Y, Sato H, Nishimura N, Takahashi S, et al. Accelerated DNA adduct formation in the lung of the Nrf2 knockout mouse exposed to diesel exhaust. Toxicol Appl Pharmacol 2001;173:154-60.

86. Enomoto A, Itoh K, Nagayoshi E, Haruta J, et al. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophene hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. Toxicol Sci 2001;59:169-77.

87. Rangasamy T, Guo J, Mitzner WA, Roman J, Singh A, et al. Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. J Exp Med 2005;202:47-59.

88. Cho HY, Reddy SP, Yamamoto M, Kleeberger SR. The transcription factor Nrf2 protects against pulmonary fibrosis. Faseb J 2004;18:1258-60.

89. Burton NC, Kensler TW, Guilarte TR. In vivo modulation of the Parkinsonian phenotype by Nrf2. Neurotoxicology 2006;27:1094-100.

90. Kanninen K, Malm TM, Jyrkkanen HK, Goldsteins G, et al. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 protects against beta amyloid. Mol Cell Neurosci 2008;39:302-13.

91. Khor TO, Huang MT, Kwon KH, Chan JY, et al. Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis. Cancer Res 2006;66:11580-4.

92. Collins AR, Lyon CJ, Xia X, Liu JZ, et al. Age-accelerated atherosclerosis correlates with failure to upregulate antioxidant genes. Circ Res 2009;104:e42–54.

93. Guan CP, Zhou MN, Xu AE, Kang KF, et al. The susceptibility to vitiligo is associated with NF-E2-related factor2 (Nrf2) gene polymorphisms: a study on Chinese Han population. Exp Dermatol 2008;17:1059-62.

94. Arisawa T, Tahara T, Shibata T, Nagasaka M, et al. The relationship between Helicobacter pylori infection and promoter polymorphism of the Nrf2 gene in chronic gastritis. Int J Mol Med 2007;19:143-8.

95. Arisawa T, Tahara T, Shibata T, Nagasaka M, et al. Nrf2 gene promoter polymorphism is associated with ulcerative colitis in a Japanese population. Hepatogastroenterology 2008;55:394-7.

96. Marzec JM, Christie JD, Reddy SP, Jedlicka AE, et al. Functional polymorphisms in the transcription factor Nrf2 in humans increase the risk of acute lung injury. Faseb J 2007;21:2237-46.

97. Francischetti I, Moreno JB, Scholz M, Yoshida WB. Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury. Rev Bras Cir Cardiovasc 2010;25:575-84.

98. Johnson D, Thomson D, Hurst T, Prasad K, et al. Neutrophil-mediated acute lung injury after extracorporeal perfusion. J Thorac Cardiovasc Surg 1994;107:1193-202.

99. Kirschner RE, Fantini GA. Role of iron and oxygen-derived free radicals in ischemia-reperfusion injury. J Am Coll Surg 1994;179:103-17.

100. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. Am J Physiol 1988;255:1269–75.

101. Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. Am J Physiol 1986;251:567–74.

102. Tan S, Yokoyama Y, Dickens E, Cash TG, et al. Xanthine-oxidase activity in the circulation of rats following hemorrhagic shock. Free Radic Biol Med 1993;15:407–14.

103. Terada LS, Dormish JJ, Shanley PF, Leff JA, Anderson BO, Repine JE. Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia–reperfusion. Am J Physiol 1992;263:394–401.

104. Miyata T, Takizawa S, van Ypersele de Strihou C. Hypoxia. 1. Intracellular sensors for oxygen and oxidative stress: novel therapeutic targets. Am J Physiol Cell Physiol 2011;300:C226–31.

105. Miyata T, van Ypersele de Strihou C. Diabetic nephropathy: a disorder of oxygen metabolism? Nat Rev Nephrol 2010;6:83–95.

106. Chiu PY, Leung HY, Leong PK, Chen N, et al. Danshen-Gegen decoction protects against hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by inhibiting mitochondrial permeability transition via the redox-sensitive ERK/Nrf2 and PKCε/mK(ATP) pathways in H9c2 cardiomyocytes. Phytomedicine 2011 (basımda).

107. Lee KJ, Lee KM, Jo S, Kang KW, et al. Induction of cereblon by NF-E2-related factor 2 in neuroblastoma cells exposed to hypoxia-reoxygenation. Biochem Biophys Res Commun 2010;399:711-5.

108. Pardo M, Tirosh O. Protective signaling effect of manganese superoxide dismutase in hypoxia-reoxygenation of hepatocytes. Free Radic Res 2009;43:1225-39.

109. Kim YJ, Ahn JY, Liang P, Ip C, Zhang Y, Park YM. Human prx1 gene is a target of Nrf2 and is up-regulated by hypoxia/reoxygenation: implication to tumor biology. Cancer Res 2007;67:546-54.

110. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science 1997;275:218-20.

111. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, et al. Small molecule activators of sirtuins extend Saccharomyces cerevisiae lifespan. Nature 2003;425:191-6.

112. Jeandet P, Delaunois B, Conreux A, Donnez D, et al. Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. Biofactors 2010;36:331-41.

113. Amri A, Chaumeil JC, Sfar S, Charrueau C. Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? J Control Release (basımda).

114. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, et al. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol metabolism in humans. Drug Metab Dispos 2004;32:1377-82.

115. Kaldas MI, Walle UK, Walle T. Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. J Pharm Pharmacol 2003;55:307-12.

116. Walle T. Bioavailability of resveratrol. Ann NY Acad Sci 2011;1215:9-15.

117. Lancon A, Delmas D, Osman H, Thenot JP, et al. Human hepatic cell uptake of resveratrol: involvement of both passive diffusion and carrier-mediated process. Biochem Biophys Res Commun 2004;316:1132-7.

118. Delmas D, Lin HY. Role of membrane dynamics processes and exogenous molecules in cellular resveratrol uptake: Consequences in bioavailability and activities. Mol Nutr Food Res 2011;55:1142-53.

119. Delmas D, Jannin B, Malki MC, Latruffe N. Inhibitory effect of resveratrol on the proliferation of human and rat hepatic derived cell lines. Oncol Rep 2000;7:847-52.

120. Yang HL, Chen WQ, Cao X, Worschech A, et al. Caveolin-1 enhances resveratrol-mediated cytotoxicity and transport in a hepatocellular carcinoma model. J Transl Med 2009;7:22-35.

121. Lin HY, Lansing L, Merillon JM, Davis FB, et al. Integrin alphaVbeta3 contains a receptor site for resveratrol. FASEB J 2006;20:1742-4.

122. Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, Klinge CM. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. Endocrinology 2000;141:3657-67.

123. Hambrock A, de Oliveira Franz CB, Hiller S, Grenz A, et al. Resveratrol binds to the sulfonylurea receptor (SUR) and induces apoptosis in a SUR subtype-specific manner. J Biol Chem 2007;282:3347-56.

124. Shi WF, Leong M, Cho E, Farrell J, et al. Repressive effects of resveratrol on androgen receptor transcriptional activity. PLOS One 2009;4:e7398.

125. Maier-Salamon A, Hagenauer B, Reznicek G, Szekeres T, et al. Metabolism and disposition of resveratrol in the isolated perfused rat liver: role of Mrp2 in the biliary excretion of glucuronides. J Pharm Sci 2008;97:1615-28.

126. Lu Z, Zhang Y, Liu H, Yuan J, et al. Transport of a cancer chemopreventive polyphenol, resveratrol: interaction with serum albumin and hemoglobin. J Fluoresc 2007;17:580-7.

127. Urpí-Sardà M, Jáuregui O, Lamuela-Raventós RM, Jaeger W, et al. Uptake of diet resveratrol into the human low-density lipoprotein. Identification and quantification of resveratrol metabolites by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Anal Chem 2005;77:3149-55.

128. Jiang YL. Design, synthesis and spectroscopic studies of resveratrol aliphatic acid ligands of human serum albumin. Bioorg Med Chem 2008;16:6406-14.

129. Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. Clin Biochem 2003;36:79-87.

130. Boocock DJ, Faust GE, Patel KR, Schinas AM, et al. Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007;16:1246-52.

131. Bertelli AA, Giovannini L, Stradi R, Urien S, et al. Kinetics of trans- and cis-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after red wine oral administration in rats. Int J Clin Pharmacol Res 1996;16:77-81.

132. Sale S, Verschoyle RD, Boocock D, Jones DJ, et al. Pharmacokinetics in mice and growth-inhibitory properties of the putative cancer chemopreventive agent resveratrol and the synthetic analogue trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene. Br J Cancer 2004;90:736-44.

133. Athar M, Back JH, Kopelovich L, Bickers DR, et al. Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. Arch Biochem Biophys 2009;486:95-102.

134. Kim AL, Zhu Y, Zhu H, Han L, et al. Resveratrol inhibits proliferation of human epidermoid carcinoma A431 cells by modulating MEK1 and AP-1 signaling pathways. Exp Dermatol 2006;15:538–46.

135. Ahmad N, Adhami VM, Afaq F, Feyes DK, et al. Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. Clin Cancer Res 2001;7:1466-73.

136. Adhami VM, Afaq F, Ahmad N. Involvement of the retinoblastoma (pRb)-E2F/DP pathway during antiproliferative effects of resveratrol in human epidermoid carcinoma (A431) cells. Biochem Biophys Res Commun 2001;288:579–585.

137. Zhang P, Li H, Wu ML, Chen XY, et al. c-Myc downregulation: a critical molecular event in resveratrol-induced cell cycle arrest and apoptosis of human medulloblastoma cells. J Neurooncol 2006;80:123-31.

138. Narayanan BA, Narayanan NK, Re GG, Nixon DW. Differential expression of genes induced by resveratrol in LNCaP cells: P53-mediated molecular targets. Int J Cancer 2003;104:204-12.

139. Ruano-Ravina A, Figueiras A, Barros-Dios JM. Type of wine and risk of lung cancer: a case-control study in Spain. Thorax 2004;59:981-5.

140. Miura D, Miura Y, Yagasaki K. Hypolipidemic action of dietary resveratrol, a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatomabearing rats. Life Sci 2003;73:1393-400.

141. Han YS, Zheng WH, Bastianetto S, Chabot JG, et al. Neuroprotective effects of resveratrol against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C. Br J Pharmacol 2004;141:997-1005.

142. Albani D, Polito L, Signorini A, Forloni G. Neuroprotective properties of resveratrol in different neurodegenerative disorders. Biofactors 2010;36:370-6.

143. Truelsen T, Thudium D, Grønbaek M; Copenhagen City Heart Study. Amount and type of alcohol and risk of dementia: the Copenhagen City Heart Study. Neurology 2002;59:1313-9.

144. Della-Morte D, Dave KR, Defazio RA, Bao YC, et al. Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a sirtuin 1-uncoupling protein 2 pathway. Neuroscience 2009;159:993-1002.

145. Sakata Y, Zhuang H, Kwansa H, Koehler RC, et al. Resveratrol protects against experimental stroke: Putative neuroprotective role of heme oxygenase 1. Exp Neuro 2010;224:325-9.

146. Karlsson J, Emgard M, Brundin P, Burkitt MJ. Transresveratrol protects embryonic mesencephalic cells from tert-Butyl hydroperoxide: electron paramagnetic resonance spin trapping evidence for a radical scavenging mechanism. J Neurochem 2000;75:141-50.

147. Spanier G, Xu H, Xia N, Tobias S, et al. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4). J Physiol Pharmacol 2009;60(Suppl 4):111-6.

148. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, et al. Modulation of NF kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. EMBO J 2004;23:2369-80.

149. Csiszar A. Anti-inflammatory effects of resveratrol: possible role in prevention of age-related cardiovascular disease. Ann NY Acad Sci 2011;1215:117-22.

150. Palsamy P, Subramanian S. Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. Biochim Biophys Acta 2011;1812:719-31.

151. Fresheney RI. Measurement of viability and cytotoxicity in culture of animal cell. Culture of animals. A manual of basic techniqoe. Third edition, USA, John Wiley and Sons, 1994;287-307.

152. Dhar-Mascareño M, Cárcamo JM, Golde DW. Hypoxia–reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C. Free Radic Biol Med 2005;38:1311-22.

153. Therade-Matharan S, Laemmel E, Duranteau J, Vicaut E. Reoxygenation after hypoxia and glucose depletion causes reactive oxygen species production by mitochondria in HUVEC. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2004;287:1037-43.

154. Kabakov AE, Budagova KR, Malyutina YV, Latchman D, et al. Pharmacological attenuation of apoptosis in reoxygenated endothelial cells. Cell Mol Life Sci 2004;61:3076–86.

155. Lee SR, Lo EH. Interactions between p38 mitogen-activated protein kinase and caspase-3 in cerebral endothelial cell death after hypoxia-reoxygenation. Stroke 2003;34:2704-9.

156. Ogawa S, Clauss M, Kuwabara K, Shreeniwas R, et al. Hypoxia induces endothelial cell synthesis of membrane-associated proteins. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:9897-901.

157. Xu J, He L, Ahmed H, Chen SW, et al. Oxygen-glucose deprivation induces inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in cerebral endothelial cells. Stroke 2000; 31:1744-51.

158. Cimarosti H, Siqueira IR, Zamin LL, Nassif M, et al. Neuroprotection and protein damage prevention by estradiol replacement in rat hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation. Neurochem Res 2005;30:583-9.

159. Malagelada C, Xifro X, Minano A, Sabria J, et al. Contribution of caspase-mediated apoptosis to the cell death caused by oxygen-glucose deprivation in cortical cell cultures. Neurobiol Dis 2005;20:27-37.

160. Ouyang YB, Xu L, Giffard RG. Geldanamycin treatment reduces delayed CA I damage in mouse hippocampal organotypic cultures subjected to oxygen glucose deprivation. Neurosci Lett 2005;380:229-33.

161. Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, et al. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. J Biol Chem 2003;278:3170-5.

162. Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrek JD. Investigation of bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. Anal Biochem 1988;175:231-7.

163. Kurien BT, Scofield RH. Introduction to protein blotting. Methods Mol Biol 2009;536:9-22.

164. Scharte M, Jurk K, Kehrel B, Zarbock A, et al. IL-4 enhances hypoxia induced HIF-1α protein levels in human transformed intestinal cells. FEBS Lett 2006;580:6399-404.

165. Craig LE, Spelman JP, Strandberg JD, Zink MC. Endothelial cells from diverse tissues exhibit differences in growth and morphology. Microvasc Res 1998;55:65–76.

166. Langenkamp E, Molema G. Microvascular endothelial cell heterogeneity: general concepts and pharmacological consequences for anti-angiogenic therapy of cancer. Cell Tissue Res 2009;335:205–22.

167. Molema G. Heterogeneity in endothelial responsiveness to cytokines, molecular causes, and pharmacological consequences. Semin Thromb Hemost 2010;36:246–64.

168. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood–brain barrier. Nat Rev Neurosci 2006;7:41–53.

169. Zlokovic BV. The blood–brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. Neuron 2008;57:178–201.

170. Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. Ann Neurol 1977;1:409–17.

171. Hackett PH. High altitude cerebral edema and acute mountain sickness: a pathophysiology update. Adv Exp Med Biol 1999;474:23-45.

172. Peers C, Dallas ML, Boycott HE, Scragg JL, et al. Hypoxia and neurodegeneration. Ann NY Acad Sci 2009;1177:169–177.

173. Madri JA. Modeling the neurovascular niche: implications for recovery from CNS injury. J Physiol Pharmacol 2009;60:95–104.

174. Woo SK, Kwon MS, Geng Z, Chen Z, et al. Sequential activation of hypoxia-inducible factor 1 and specificity protein 1 is required for hypoxia-induced transcriptional stimulation of Abcc8. J Cereb Blood Flow Metab (basımda).

175. Grammas P, Tripathy D, Sanchez A, Yin X, et al. Brain microvasculature and hypoxia-related proteins in Alzheimer's disease. Int J Clin Exp Pathol 2011;4:616-27.

176. Kielland A, Camassa LM, Døhlen G, Munthe L, et al. NF-κB activity in perinatal brain during infectious and hypoxic-ischemic insults revealed by a reporter mouse. Brain Pathol (basımda).

177. Wallace BK, Jelks KA, O'Donnell ME. Ischemia-induced stimulation of cerebral microvascular endothelial cell Na-K-Cl cotransport involves p38 and JNK MAP kinases. Am J Physiol Cell Physiol. 2011 (basımda).

178. Li L, Liu F, Welser-Alves JV, McCullough LD, Milner R. Upregulation of fibronectin and the α5β1 and αvβ3 integrins on blood vessels within the cerebral ischemic penumbra. Exp Neurol (basımda).

179. Yu AY, Frid MG, Shimoda LA, Wiener CM, et al. Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. Am J Physiol 1998;275:L818-L826

180. Gonsalves CS, Kalra VK. Hypoxia-mediated expression of 5-lipoxygenase-activating protein involves HIF-1 alpha and NF-kappaB and microRNAs 135a and 199a-5p. J Immunol 2010;184:3878-88.

181. Patak P, Jin F, Schäfer ST, Metzen E, et al. The ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCC1 are not regulated by hypoxia in immortalised human brain microvascular endothelial cells. Exp Transl Stroke Med 2011;3:12.

182. Ha MK, Chung KY, Bang D, Park YK ve ark. Proteomic analysis of the proteins expressed by hydrogen peroxide reated cultured human dermal microvascular endothelial cells. Proteomics 2005;5:1507–19.

183. Zhang Y, Park TS, Gidday JM. Hypoxic preconditioning protects human brain endothelium from ischemic apoptosis by Akt-dependent survivin activation. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007;292:H2573-81.

184. Bresgen N, Karlhuber G, Krizbai I, Bauer H, et al. Oxidative stress in cultured cerebral endothelial cells induces chromosomal aberrations, micronuclei, and apoptosis. J Neurosci Res 2003;72:327-33.

185. Guo J, Krause DN, Horne J, Weiss JH, et al. Estrogen-receptor-mediated protection of cerebral endothelial cell viability and mitochondrial function after ischemic insult in vitro. J Cereb Blood Flow Metab 2010;30:545-54.

186. Lok J, Leung W, Zhao S, Pallast S, et al. γ-glutamylcysteine ethyl ester protects cerebral endothelial cells during injury and decreases blood-brain barrier permeability after experimental brain trauma. J Neurochem 2011;118:248-55.

187. Iijima T, Mishimab T, Akagawab K, Iwaoa Y. Neuroprotective effect of propofol on necrosis and apoptosis following oxygen–glucose deprivation—Relationship between mitochondrial membrane potential and mode of death. Brain Res 2006;1099:25-32.

188. Sheng WW, Li CT, Zhang WP, Yuan YM, et al. Distinct roles of CysLT1 and CysLT2 receptors in oxygen glucose deprivation-induced PC12 cell death. Biochem Biophys Res Commun 2006;346:19–25.

189. Brongholi K, Souza DG, Bainy ACD, Dafre AL, et al. Oxygen–glucose deprivation decreases glutathione levels and glutamate uptake in rat hippocampal slices. Brain Res 2006;108:211-8.

190. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. Am J Physiol Cell Physiol 2002;282:C227-241.

191. Semenza GL. Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. J Clin Invest 2000;106:809-12.

192. Takeda K, Lin J, Okubo S, Akazawa-Kudoh S, et al. Transient glucose deprivation causes upregulation of heme oxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression in cardiac fibroblasts. J Mol Cell Cardiol 2004;36:821-30.

193. Singh G, Siddiqui MA, Khanna VK, Kashyap MP, et al. Oxygen glucose deprivation model of cerebral stroke in PC-12 cells: glucose as a limiting factor. Toxicol Mech Methods 2009;19:154-60.

194. Jang JH, Surh YJ. Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. Mutat Res 2001;496:181-90.

195. Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. Genes Dev 2006;20:1-15.

196. Zweier JL, Kuppusuamy P, Thompson-Gorman S, Klunk D, et al. Measurement and characterization of free radical generation in reoxygenated human endothelial cells. Am J Physiol 1994;266:C700-8.

197. Ruchko MV, Gorodnya OM, Pastukh VM, Swiger BM, et al. Hypoxia-induced oxidative base modifications in the VEGF hypoxia-response element are associated with transcriptionally active nucleosomes. Free Radic Biol Med 2009;46:352-9.

198. Cao Z, Gao W, Tao G, Fan Y, et al. Thirty-five percent oxygen pre-conditioning protects PC12 cells against death induced by hypoxia. Free Radic Res 2009;43:58-67.

199. Guo S, Bragina O, Xu Y, Cao Z, et al. Glucose up-regulates HIF-1 alpha expression in primary cortical neurons in response to hypoxia through maintaining cellular redox status. J Neurochem 2008;105:1849-60.

200. Borchi E, Parri M, Papucci L, Becatti M, et al. Role of NADPH oxidase in H9c2 cardiac muscle cells exposed to simulated ischemia-reperfusion. J Cell Mol Med 2009;13:2724-35.

201. Giacomo V, Rapino M, Miscia S, Giulio CD, et al. Dual role of HIF-1alpha in delivering a survival or death signal in hypoxia exposed human K562 erythroleukemia cells. Cell Biol Int 2009;33:49-56.

202. Millar TM, Phan V, Tibbles LA. ROS generation in endothelial hypoxia and reoxygenation stimulates MAP kinase signaling and kinase-dependent neutrophil recruitment. Free Radic Biol Med 2007;42:1165–77.

203. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J Lipid Res 1998;39:1529–42.

204. Martin SF, Chartterjee S, Parinandi N, Alevriadou BR. Rac1 inhibition protects against hypoxia/reoxygenation-induced lipid peroxidation in human vascular endothelial cells. Vasc Pharmacol 2005;43:148–56.

205. Zhang WJ, Feng J, Zhou R, Ye LY, et al. Tanshinone IIA protects the human blood-brain barrier model from leukocyte-associated hypoxia-reoxygenation injury. Eur J Pharmacol 2010;648:146-52.

206. López-Vélez M, Martínez-Martínez F, Del Valle-Ribes C. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. Crit Rev Food Sci Nutr 2003;43:233-44.

207. Ungvari Z, Orosz Z, Rivera A, Labinskyy N, et al. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007;292:2417-24.

208. Holthoff JH, Woodling KA, Doerge DR, Burns ST, et al. Resveratrol, a dietary polyphenolic phytoalexin, is a functional scavenger of peroxynitrite. Biochem Pharmacol 2010;80:1260-5.

209. He S, Jiang L, Wu B, Pan Y, et al. Pallidol, a resveratrol dimer from red wine, is a selective singlet oxygen quencher. Biochem Biophys Res Commun 2009;379:283-7.

210. Faustino RS, Clark TA, Sobrattee S, Czubryl MP, et al. Differential antioxidant properties of red wine in water soluble and lipid soluble peroxyl radical generating systems. Mol Cell Biochem 2004;263:211-5.

211. Ghanim H, Sia CL, Abuaysheh S, Korzeniewski K, et al. An antiinflammatory and reactive oxygen species suppressive effects of an extract of Polygonum cuspidatum containing resveratrol. J Clin Endocrinol Metab 2010;95:E1-8.

212. Whitehead TP, Robinson D, Allaway S, Syms J, et al. Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. Clin Chem 1995;41:32-5.

213. Lin CJ, Lee CC, Shih YL, Lin TY, et al. Resveratrol enhances the therapeutic effect of temozolomide against malignant glioma in vitro and in vivo by inhibiting autophagy. Free Radic Biol Med (basımda).

214. Hussain AR, Uddin S, Bu R, Khan OS, et al. Resveratrol suppresses constitutive activation of AKT via generation of ROS and induces apoptosis in diffuse large B cell lymphoma cell lines. PLoS One 2011;6:e24703.

215. Xu Y, Nie L, Yin YG, Tang JL, et al. Resveratrol protects against hyperglycemia-induced oxidative damage to mitochondria by activating SIRT1 in rat mesangial cells. Toxicol Appl Pharmacol (basımda).

216. Pintea A, Rugină D, Pop R, Bunea A, et al. Antioxidant effect of trans-resveratrol in cultured human retinal pigment epithelial cells. J Ocul Pharmacol Ther 2011;27:315-21.

217. Santandreu FM, Valle A, Oliver J, Roca P. Resveratrol potentiates the cytotoxic oxidative stress induced by chemotherapy in human colon cancer cells. Cell Physiol Biochem 2011;28:219-28.

218. Gao RY, Mukhopadhyay P, Mohanraj R, Wang H, et al. Resveratrol attenuates azidothymidine-induced cardiotoxicity by decreasing mitochondrial reactive oxygen species generation in human cardiomyocytes. Mol Med Report 2011;4:151-5.

219. Valdecantos MP, Pérez-Matute P, Quintero P, Martínez JA. Vitamin C, resveratrol and lipoic acid actions on isolated rat liver mitochondria: all antioxidants but different. Redox Rep 2010;15:207-16.

220. Yao J, Wang JY, Liu L, Li YX, et al. Anti-oxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis. Arch Med Res 2010;41:288-94.

221. Zaidi SF, Ahmed K, Yamamoto T, Kondo T, et al. Effect of resveratrol on Helicobacter pylori-induced interleukin-8 secretion, reactive oxygen species generation and morphological changes in human gastric epithelial cells. Biol Pharm Bull 2009;32:1931-5.

222. Rubiolo JA, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against necrosis induced by reactive oxygen species. Biomed Pharmacother 2008;62:606-12.

223. Zhang L, Zhou G, Song W, Tan X, et al. Pterostilbene protects vascular endothelial cells against oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in vitro and in vivo. Apoptosis (basımda).

224. Yuan Q, Chen L, Xiang DX, Li YJ, et al. Effect of resveratrol derivative BTM-0512 on high glucose-induced dysfunction of endothelial cells: role of SIRT1. Can J Physiol Pharmacol 2011;89:713-22.

225. Xia L, Ding F, Zhu JH, Fu GS. Resveratrol attenuates apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells induced by high shear stress and proinflammatory factors. Hum Cell 2011;24:127-33.

226. Sayın O, Arslan N, Altun Z, Guner G. In vitro effect of resveratrol against oxidative injury of human coronary artery endothelial cells. Turk J Med Sci 2011;41:1-8.

227. Sayın O, Arslan N, Akdogan Guner G. The protective effects of resveratrol on human coronary artery endothelial cell damage induced by *in vitro* hydrogen peroxide. Acta Clinica Croatica (basımda)

228. Chang HC, Chen TG, Tai YT, Chen TL, et al. Resveratrol attenuates oxidized LDL-evoked Lox-1 signaling and consequently protects against apoptotic insults to cerebrovascular endothelial cells. J Cereb Blood Flow Metab 2011;31:842-54.

229. Simão F, Matté A, Matté C, Soares FM, et al. Resveratrol prevents oxidative stress and inhibition of Na(+)K(+)-ATPase activity induced by transient global cerebral ischemia in rats. J Nutr Biochem 2011;22:921-8.

230. Shin JA, Lee H, Lim YK, Koh Y, et al. Therapeutic effects of resveratrol during acute periods following experimental ischemic stroke. J Neuroimmunol 2010;227:93-100.

231. Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. Eur J Pharmacol. 2008;591:66-72.

8. EKLER

Ek-1. ETİK KURUL ONAYI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

Tarih ve Sayı: 16.02.2007/ 75

Etik Kurul Üyeleri
Prof.Dr.Taner ÇAMSARI
Prof.Dr.Tunç ALKIN
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR
Doç.Dr.Ayça Arzu SAYINER
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK
Doç.Dr.Mustafa SEÇİL
Doç.Dr.Murat DUMAN
Doç.Dr.Güven ASLAN
Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN
Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN
Yunus Karslı

Etik Kurul Başkanı
Prof.Dr.Taner ÇAMSARI

Etik Kurul Sekreteri
Hatice İĞCİ

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Etik Kurulumuzun 15 Şubat 2007 tarih ve 12/05/2007 no.lu toplantısında, 54/2007 Protokol numaralı Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Gül GÜNER'in yöneticisi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr.Nur ARSLAN'ın sorumlusu olduğu **"Resveratrol'ün hipoksi-reoksijenasyon ile indüklenen vitro endotel hücresi hasarına etkisinin ve Nrf2'nin olası rolünün araştırılması"** isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

Prof. Dr.Tunç ALKIN
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları
Etik Kurul Başkan Yard.

Tel: 0232 412 22 54

Ek-2: ARBIS FORMATINDA ÖZGEÇMİŞ

ÖZGEÇMİŞ
Prof. Dr. NUR ARSLAN

TC Kimlik No / Pasaport No:	18905492806
Doğum Yılı:	1970
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, İnciraltı 35340 İzmir/Türkiye
Telefon :	0232-412 3622
e-posta :	nur.arslan@deu.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	TIP FAKÜLTESİ	ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI	Tıpta Uzmanlık	1998

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	TIP BİLİMLERİ	Prof. Dr.	1993-
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	TIP BİLİMLERİ	Yrd. Doç. Dr.	1993-2011

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Barsak Hastalıkları (fonsiyonel bozukluklar; peptik ülserler; enteritler) , Safra Yolları Hastalıkları (karaciğer, safra kesesi ve safra kanalları hastalıkları) , Beslenme ve Metabolizma Hastalıkları (beriberi; pellagra; skorbüt; raşitizm; obezite v.b.) , Pediatri , Mide Hastalıkları
gastroenteroloji metabolizma beslenme çocuk

PROJE DENEYİMİ

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
Pediatrik Obesite Ile Ilişkili Yağlı Karaciğer Hastalığında Serum Neopterin Düzeylerinin Değerlendirilmesi Ve Adipokinlerle Ilişkisinin		20326	01.06.2011-01.06.2012	Yürütücü	Ulusal

Araştırılması					
Wilson hastalarında ATP7B genindeki mutasyonların DNA dizi analizi ile taranması.	Dokuz Eylül Üniversitesi	12000	01.01.2005-01.07.2007	Araştırmacı/Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
Resveratrolün hipoksi-reoksijenasyon ile indüklenen in vitro endotel hücresi hasarına etkisinin ve Nrf2'nin olası rolünün araştırılması	Dokuz Eylül Üniversitesi	44000	01.01.2006-01.01.2008	Araştırmacı/Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
Pediatrik obesite ile ilişkili karaciğer hastalıklarında metabolik, oksidan ve antioksidan sistemik belirteçlerin değerlendirilmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	6000	01.01.2007-01.04.2009	Araştırmacı/Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
Türkiye'de 6-17 yaş grubu çocuklarda çölyak hastalığı prevalansı	Devlet Planlama Teşkilatı	100000	01.01.2003-01.01.2010	Araştırmacı/Uzman	Ulusal
Çocukluk çağında malnütrisyonun glikozile transferrin izoformlarının dağılımına etkisi	Dokuz Eylül Üniversitesi	43541	01.01.2009-01.04.2010	Araştırmacı/Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
Pediatrik obes olgularda serum A-FABP, sVCAM-1, sE-selektin ve adiponektin düzeyleri ile karotis intima media kalınlığı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	22193	01.01.2009-01.04.2011	Araştırmacı/Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
Bebeklik döneminin ilk aylarında görülen infantil kolik ataklarının patogenezinde laktaz gen polimorfizminin araştırılması	Dokuz Eylül Üniversitesi	27297	01.04.2009-01.04.2012	Araştırmacı/Uzman	Kurumsal (BAP v.b.)
Juvenil idiyopatik artritli hastalarda serum ghrelin, leptin, rezistin ve adiponektin düzeylerinin nutrisyonel durum ve inflamatuvar belirteçlerle ilişkisi	Dokuz Eylül Üniversitesi	25800	04.11.2009-04.05.2012	Yürütücü	Kurumsal (BAP v.b.)
Pediatrik obesite ile ilişkili yağlı karaciğer hastalığında perilipin gen polimorfizminin değerlendirilmesi	Dokuz Eylül Üniversitesi	60746	04.11.2009-04.05.2012	Yürütücü	Kurumsal (BAP v.b.)

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			18
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			2
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			125
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		**Tamamlanan**	**Devam Eden**
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık	3	3
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Dalgic B, Sari S, Basturk B, Ensari A, Egritas O, Bukulmez A, Baris Z Turkish Celiac Study Group. Prevalence Of Celiac Disease In Healthy Turkish School Children. Am J Gastroenterol 2011106:1512-7.
Arslan N, Mavi A, Kalkan S, Aydın A, Ortaç R, Buyukgebiz B, Durak H. Findings Of Hepatobiliary Scintigraphy And Liver Biopsy İn Maroteaux-Lamy Syndrome Presenting As Neonatal Cholestasis. Pediatr Int 200648:498-500.
Ozturk Y, Soylu Ob, Arslan N. Prevalence And Clinical Features Of Cystic Fibrosis With Pseudo-Bartter Syndrome. Ann Trop Paediatr 200626:155.
Hızlı S, Aksoy U, Arslan N, Usluca S, Bekem Ö, Yalçın G, Özturk Y. Cryptosporidium Parvum Diarrhea İn An İnfant With Short Bowel Syndrome. J Pediatr Surg 200641:E5-E6.
Arslan N, Buyukgebiz B, Öztürk Y, Özer E. The Prevalence Of Liver Function Abnormalities İn Pediatric Celiac Disease Patients And İts Relation With İntestinal Biopsy Findings. Acta Gastroenterol Belg 200568:424-427.
Bekem O, Buyukgebiz B, Aydin A, Ozturk Y, Tasci C, Arslan N, Durak H. Prokinetic Agents İn Childen With Poor Appetite. Acta Gastroenterol Belg 200568:416-418.
Arslan N, Buyukgebiz B, Öztürk Y. Celiac Disease With Takayasu Arteritis. Pediatr Int 200547:708-710.
Buyukgebiz B, Bekem O, Ozturk Y, Aydin A, Tasçı C, Arslan N, Durak H. Delayed Gastric Emptying İn Children With Poor Appetite. Acta Gastroenterol Belg 200568:230-232.
Sayın O, Arslan N, Altun Z, Guner G. In vitro effect of resveratrol against oxidative injury of human coronary artery endothelial cells. Turk J Med Sci (in press).
Arslan N, Sayın O, Altun Z, Çavdar Z, Eğrilmez My, Yener N, Genç Ş, Genç K, Oktay G, İşlekel H, Güner G. Development Of An İn Vitro İnjury Model Of İschemia Reperfusion İn Human Brain Microvascular Endothelial Cells And The Evaluation Of Cell İnjury. Turk J Biochem 201035:195-202.
Arslan N, Erdur B, Aydın A. Hormones And Cytokines İn Childhood Obesity. Indian Pediatr 201047:829-39.
Arslan N, Makay B. Mean Platelet Volume İn Obese Adolescents With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. J Pediatr Endocrinol Metab 201023:807-813.
Demircioğlu F, Sözmen Şç, Yılmaz Ş, Ören H, Arslan N, Kumral A, Özer E, İrken G. Severe İron Overload And Hyporegenerative Anemia İn A Case With Rhesus Hemolytic Disease: Therapeutic Approach To Rare Complications. Turk J Hematol 201027:204-208.
Ozturk Y, Berktaş S, Soylu Ob, Karademir S, Astarcıoğlu H, Arslan N, Astarcıoğlu İ. Fulminant Hepatic Failure And Serum Phosphorus Levels İn Children From The Western Part Of Turkey. Turk J Gastroenterol 201021:270-274.
Hızlı S, Koçyiğit A, Arslan N, Tuncel S, Demircioğlu F, Çakmakçı H, Büyükgebiz B. The Role Of Ultrasonographic Hepatic Artery Resistive İndex İn Diagnosis Of İnsulin Resistance İn Obese Children Wıth Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Turk J Med Sci 201040:335-342.
Hızlı S, Koçyiğit A, Arslan N, Tuncel Sa, Demircioğlu F, Çakmakçı H, Büyükgebiz B. Hepatic Artery Resistance İn Children With Obesity And Fatty Liver. Indian J Pediatr 201077:407-411.
Hızlı S, Arslan N, Abacı A, Büyükgebiz B. Subclinical Hypothyroidism İn Obese Turkish Adolescents: The Relationship With Anthropometry And Fatty Liver. Turk J Med Sci 201040:287-292.

Blau N, Quintana Ab, Demirkol M, Feillet F, Giovannini M, Macdonald A, Trefz Fk, Spronsen F, Contrubuting European Pku Centers. Management Of Phenylketonuria İn Europe: Survey Results From 19 Countries. Mol Genet Metab 201099:109-115. (Collaborating Author)

Makay B, Unsal E, Arslan N, Varni Jw. Health-Related Quality Of Life Of School-Age Children With Familial Mediterranean Fever. Clin Exp Rheumotol 200927(2 Suppl 53):S96-101.

Arslan N, Esen I, Demircioğlu F, Yılmaz Ş, Ünüvar T, Böber E. The Changing Face Of Celiac Disease: A Girl With Obesity And Celiac Disease. J Paediatr Child Health 200945:317-318.

Sayın O, Arslan N, Guner G. Resveratrol And Cardiovascular System. Turk J Biochem 200833:117-121.

Demircioğlu F, Koçyiğit A, Arslan N, Cakmakçi H, Hizli S, Tuncel Sa. Intima-Media Thickness Of Carotid Artery And Susceptibility To Atherosclerosis İn Obese Children With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 200847:68-75.

Abacı A, Esen I, Unuvar T, Arslan N, Böber E. Two Cases Presenting With Pubertal Delay And Diagnosed As Celiac Disease. Clin Pediatr (Phila) 200847:607-609.

Abacı A, Bekem O, Unuvar T, Ozer E, Bober E, Arslan N, Ozturk Y, Buyukgebiz A. Hepatic Glycogenosis: A Rare Cause Of Hepatomegaly İn Type 1 Diabetes Mellitus. J Diabetes Complications 200822:325-328.

Soylu A, Kavukcu S, Turkmen M, Cabuk N, Duman M. Effect of socioeconomic status on the blood pressure in children living in a developing country. Pediatr Int 2000;42:37-42.

Büyükgebiz B, Arslan N, Öztürk Y, Soyal C, Lebe B. Drug reaction to ursodeoxycholic acid: lichenoid drug eruption in an infant using ursodeoxycholic acid for neonatal hepatitis. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2002;35:384-386.

Ozturk Y, Buyukgebiz B, Arslan N, Özer E, Lebe B. Serum vitamin A and total carotene concentrations in well-nourished children with Helicobacter pylori infection. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2003;36:502-504.

Büyükgebiz B, Arslan N, Öztürk Y, Soylu A, Kavukçu S. Complication of short bowel syndrome: An infant with short bowel syndrome developing ammonium acid urate urolithiasis. Pediatr Int 2003;45:208-209.

Arslan N, Büyükgebiz B, Öztürk Y, Pekcanlar Akay A. Depression and anxiety in chronic hepatitis B: Effect of hepatitis B virus infection on psychological state in childhood. Turk J Pediatr 2003;45:26-28.

Ozkan H, Uzuner N, Oren H, Cabuk N, Islekel H. Urinary nitrite excretion after prophylactic intravenous immunoglobulin in premature infants. Biol Neonate 2000;77:101-104.

Ozturk Y, Buyukgebiz B, Arslan N, Özer E. Antral glandular atrophy and intestinal metaplasia in children with Helicobacter pylori infection. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2003;37:96-97.

Ozturk Y, Buyukgebiz B, Arslan N, Ellidokuz H. Effects of hospital stay on nutritional anthropometric data in Turkish children. J Trop Pediatr 2003;49:189-190.

Büyükgebiz B, Öztürk Y, Yılmaz Ş, Arslan N. Serum leptin concentrations in children with mild-to-moderate protein-energy malnutrition. Pediatr Int 2003;45:550-554.

Buyukgebiz B, Ozturk Y, Arslan N, Ozer E. A rare cause of protein-losing enteropathy and growth retardation in infancy: infantile systemic hyalinosis. Turk J Pediatr 2003;45:258-260.

Dikici B, Ozgenç F, Kalaycı AG, Targan S, Ozkan T, Selimoğlu A, Doğancı T, Kansu A, Tosun S, Arslan N, Kasırga E, Boşnak M, Haspolat K, Büyükgebiz B, Aydoğdu S, Girgin N, Yağcı RV. Current therapeutic approaches in childhood chronic hepatitis B infection: A multicenter study. J Gastroenterol Hepatol 2004;19:127-133.

Turkmen M, Ozturk Y, Aslan N, Gunes D, Cakmakci H, Buyukgebiz B. Transient lymphoid hyperplasia and

hypogammaglobulinemia secondary to giardiasis. Pediatr Int 2004;46:195-197.
Arslan N, Ünal N, Uzuner N, Çakmakçı H, Öztürk Y, Büyükgebiz B. Pyogenic liver abscesses in a child spreading to pulmonary and subcutaneus tissues: case report. Turk J Pediatr 2004;46:279-282.
Büyükgebiz B, Öztürk Y, Yılmaz Ş, Arslan N. Serum leptin concentrations in children with mild protein-energy malnutrition and catch-up growth. Pediatr Int 2004;46:534-538.
Ozturk Y, Buyukgebiz B, Özer E, Arslan N, Bekem Ö, Hızlı Ş. Resolution of Helicobacter pylori associated granulomatous gastritis in a child after eradication therapy. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2004;39:286-287.
Arslan N, Büyükgebiz B, Öztürk Y, Hızlı S, Bekem Ö, Sağol Ö, Özer E. Hepatoportal sclerosis in a child. Eur J Ped 2004;163:683-684.
Arslan S, Arslan N, Soylu A, Akgün C, Tepebaşılı İ, Türkmen M, Kavukçu S. High altitute and blood pressure in children. Yale J Biol Med 2003;76:145-148.
Öztürk Y, Arlı AÖ, Arslan N, Bekem Ö, Hızlı Ş, Büyükgebiz B. Influences of different therapy protocols for chronic hepatitis B infection in Turkish children on nutritional anthropometric data. J Health Popul Nutr 2004;22:443-444.
Demircioglu F, Oren H, Yılmaz S, Arslan N, Gürcü Ö, İrken G. Abetalipoproteinemia: Importance of the peripheral blood smear. Pediatr Blood Cancer 2005.
Arslan N, Büyükgebiz B, Öztürk Y, Çakmakçı H. Fatty liver in obese children: prevalence and correlation with anthropometric measurements and hyperlipidemia. Turk J Pediatr 2005;47:23-27.

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

A Soylu, N Çabuk, S Kavukçu, M Türkmen. İlköğretim programındaki çocuklarda sıvı alım ve boşaltım dinamiğinin idrar yangı bulgularına etkisi. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi 1999;4:184-191.
N Çabuk, A Soylu, S Kavukçu, M Türkmen. Toplumumuzdaki ilköğretim programındaki kız çocuklarında tuvalet sonrası temizlik yönteminin; sosyoekonomik yapı ve üriner sistem enfeksiyonu ile ilişkisi nedir? Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi 1999;2:56-64.
N Çabuk, A Soylu, S Kavukçu, M Türkmen, B Büyükgebiz. İlköğretime geç başlamada kronik malnutrisyon insidansı. Ege Tıp Dergisi 1999;38:153-155.
N Çabuk, A Soylu, S Kavukçu, M Türkmen, B Büyükgebiz. Büyükşehirde ilköğretim programındaki çocuklarda konstipasyon: Sıklık, enürezis ve idrar yolu enfeksiyonu ile ilişkisi. Ege Tıp Dergisi 1999;38:157-161.
N Çabuk, Y Öztürk, B Büyükgebiz. Kronik hepatit B tedavisi. Ege Pediatri Bülteni 1999;6:171-177.
Y Öztürk, N Çabuk, B Büyükgebiz. Neonatal kolestazda yaklaşım. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 2000;20:178-186.
Y Öztürk, N Arslan, B Büyükgebiz. TT virus enfeksiyonu. Ege Pediatri Bülteni 2001;8:105-108.
Ö Anal, G Paşaoğlu, N Çabuk, M Duman, Z Gülay, A Kargı, S Kavukçu, A Erbay, N Olgun, G İrken. Kronik granülomatoz hastalık: Bir olgu sunumu. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2001;15:77-82.
N Çabuk, Y Öztürk, B Büyükgebiz. Çocukluk çağında enflamatuvar bağırsak hastalıkları. Türkiye Klinikleri Pediatri Dergisi 2001;10:169-179.
N Çabuk, Y Öztürk, B Büyükgebiz. Obesite gelişiminde çevresel faktörler: Anket çalışması. Dokuz Eylül

Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2001;15:187-191.
N Arslan, B Büyükgebiz, Y Öztürk. Çocukluk çağında piyojenik karaciğer abseleri. Ege Pediatri Bülteni 2001;8:229-233.
B Büyükgebiz, Y Öztürk, Ş Yılmaz, N Arslan. İştahsız çocuğa yaklaşımda, günlük kalori ve protein alımının değerledirilmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2001;15:273-278.
N Uzuner, N Arslan, Ş Turgut. Bir brusellozis olgusu. Ege Pediatri Bülteni 2002;9:29-31.
S Kurul, N Arslan, Y Öztürk, E Dirik. Tip 2 Gaucher hastalığı olan bir süt çocuğu. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002;16:59-62.
N Ünal, N Arslan, D Ölmez, Ö Sağol, Y Öztürk, H Akman, B Ok, B Büyükgebiz. Soliter epidermoid dalak kisti: Olgu sunumu. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002;16:63-65.
B Büyükgebiz, N Arslan, Y Öztürk. Obes bir çocukta asemptomatik kolelitiyazis. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002;16:79-80.
N Ünal, M Kösecik, GS Saylam, M Kır, Ş Paytoncu, S Kumtepe, A Akçoral, Y Öztürk, N Arslan, B Büyükgebiz, Ö Kozan, Ö Oto. Erken koroner aterosklerozu nedeniyle bypass yapılan homozigot ailevi hiperkolesterolemili bir olgu. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002;16:101-105.
N Arslan, H Akman, M Sayan, Y Öztürk, B Büyükgebiz. Epstein-Barr virus enfeksiyonuna ikincil gelişen hepatik yetmezlik: Bir vaka takdimi. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2003;46:47-49.
S Gezer, H Resmi, N Arslan, M Sakızlı, B Büyükgebiz, N Atabey. Probleme dayalı öğrenim sisteminde biyokimyasal ve genetik hedeflere entegre ulaşılmasını sağlayan bir modül örneği. Tıp Eğitimi Dünyası 2003;12:43-51.
B Büyükgebiz, N Arslan, Y Öztürk. Adolesan yaş grubunda yeme sorunlarının irdelenmesi: anket çalışması. Pediatrik Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Dergisi 2003;1:29-34.
N Arslan, B Büyükgebiz, Y Öztürk. Çölyak hastalığı patogenezi. Pediatrik Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Dergisi 2003;1:45-50.
N Arslan, B Büyükgebiz, Y Öztürk. Down sendromu ve tip 1 diabeti olan bir çocukta çölyak hastalığı ve dermatitis herpetiformis birlikteliği. Pediatrik Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Dergisi 2003;1:51-55.
N Arslan, Y Öztürk, E Özer, B Büyükgebiz. Bilmece olgu: Kandida ösofajiti. Pediatrik Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Dergisi 2003;1:61-62.
CS Turgut, Ö Karaman, Y Öztürk, S Köse, N Arslan, B Büyükgebiz. Lamivudine kullanımına bağlı hipersensitivite reaksiyonu. SSK Tepecik Hastanesi Dergisi 2003;13:101-103.
Ö Bekem, Y Öztürk, N Arslan, B Büyükgebiz. İştahsız çocuklarda beslenme özelliklerinin anket çalışması ile değerlendirilmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2003;17:181-189.
N Arslan, A Soylu, M Türkmen, S Kavukçu. Tuvalet konforunun üriner inkontinans üzerine etkisi. Türk Pediatri Arşivi 2004;39:21-24.
Y Öztürk, B Büyükgebiz, N Arslan. Kronik karın ağrılı olgularda nutrisyonel değerlendirme ve üst gastrointestinal sistem endoskopi bulguları. Pediatrik Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Dergisi 2004;1:79-86.
Y Öztürk, N Akman, N Arslan, Ş Hızlı, Ö Bekem, S Abalı, N Danış, B Büyükgebiz. Gastroözofageal reflü hastalığı olgularında başvuru semptomları ve beslenme durumlarının değerlendirilmesi. Pediatrik Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Dergisi 2004;1:91-94.

N Arslan, B Büyükgebiz. Çocukluk çağında portal hipertansiyonun nadir bir nedeni: Hepatoportal skleroz. Pediatrik Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Dergisi 2004;1:103-108.
Y Öztürk, N Arslan, B Büyükgebiz. Kısa bağırsak sendromu: Olgu sunumu. Pediatrik Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Dergisi 2004;1:109-116.
N Arslan, B Büyükgebiz, Y Öztürk. Kistik fibrozisli iki hastada perkütan endoskopik gastrostomi ile beslenme desteği. Pediatrik Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Dergisi 2004;1:117-121.
H Akman, N Arslan, A Özgün Arlı, Y Öztürk, H Çakmakçı, B Büyükgebiz. Yan ağrısıyla başvuran ve karaciğerde kist hidatik saptanan çocuk olgu. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2004;18:177-182.

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Diğer yayınlar

N Çabuk Arslan, E Besli (Bölüm Editörleri). Metabolik Aciller. M Karaböcüoğlu, L Yılmaz, M Duman (Editörler), Çocuk Acil Tıp: Kapsamlı ve Kolay Yaklaşım (basımda).
N Arslan. Doğuştan metabolik hastalıklar. AH Şahinoğlu (Editör), Yoğun Bakım Sorunları ve Tedavileri (3. baskı), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2011:942-953.
N Arslan. Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı. Bölüm XII: Sindirim Sistemi. H Özen (Bölüm Editörü). E Hasanoğlu, R Düşünsel, A Bideci (Editörler), Temel Pediatri, Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, 2010, ISBN: 978-975-277, sayfa: 839-840.
N Arslan. Sterol metabolizması, safra asit biyosentez bozuklukları. Bölüm IX: Metabolizma. A Hasanoğlu (Bölüm Editörü). E Hasanoğlu, R Düşünsel, A Bideci (Editörler), Temel Pediatri, Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, 2010, ISBN: 978-975-277, sayfa: 569-570.
N Arslan. Oyun çocuğu, okul çocuğu ve ergenlik döneminde beslenme. H Ören (Editör). Sağlıklı Çocuk İçin Anneye El Kitabı, İzmir, 2007, ISBN: 978-975-00568-5-7, sayfa: 37-47.
N Arslan, A Aydın. Yenidoğan - çocuk: Öykü ve fizik muayene. D Güldal, A Aydın, N Özçakar (Editörler), Kliniğe Giriş Öykü ve Fizik Muayene, Dokuz Eylül Üniversitesi Yayınları, İzmir, 2005, ISBN: 975-441-227-8, sayfa: 451-498.
N Çabuk Arslan, B Büyükgebiz. Nedeni Bilinmeyen Ateş. H Özkan, A Soylu (Editörler), Ateşli Çocuğa Yaklaşım, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Kurulu Yayınları, İzmir, 2002, ISBN: 975-441-192-1, 92-104.
N Çabuk, Ö Anal, B Büyükgebiz. Büyümenin Değerlendirilmesi. G İrken, H Özkan, A Aydın (Editörler), Pediatri Kliniğe Giriş, İzmir, 2001, ISBN:975-441-161-1, sayfa:17-36.
B Büyükgebiz, Y Zafer, N Çabuk. Bebek Beslenmesi, İzmir, 1999. (ISBN:975-94801-1-5).

Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem] 2010; 35 (3) ; 195–202.

Araştırma Makalesi [Research Article]

Yayın tarihi 06 Eylül, 2010 © TurkJBiochem.com

[Published online 06 September, 2010]

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 Altun[4],
Zahide Çavdar[3],
Mehtap Yüksel Eğrilmez[3],
Nilgün Yener[2],
Şermin Genç[3,4],
Kürşat Genç[1],
Gülgün Oktay[2],
Hüray İşlekel[2],
Gül Güner[1,2,3]

[1]Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir
[2]Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir
[3]Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı (ARLAB), İzmir
[4] Dokuz 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 arttırıcı 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 araştırmada, 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 deprivasyon 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 deprivasyon 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 iskemi modeli olarak hipoksiyi uygulamakla beraber, bazıları iskemi sürecinde glukoz da hücrelere ulaşamadığından ortamdan glukozu da uzaklaştırmaktadır (oksijen glukoz deprivasyonu-OGD) [8,9]. Mascerono 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 gözlemlemişlerdir. 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 araştırmada insan beyin mikrovasküler endotel (human cerebral microvascular endothelial- HCMVE) hücrelerinde I-R modelinin *in vitro* koşullarda uygulamasının yapılması, bunun için, OGD modeli ile sitotoksisitenin 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 sodyum 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 probları (Invitrogen) kullanıldı.

"Oksijen glukoz deprivasyonu (OGD)" ve "reoksijenasyon (R) / reoksijenasyon + glukoz eklenmesi (RGE)" uygulaması

Hücre kültürü

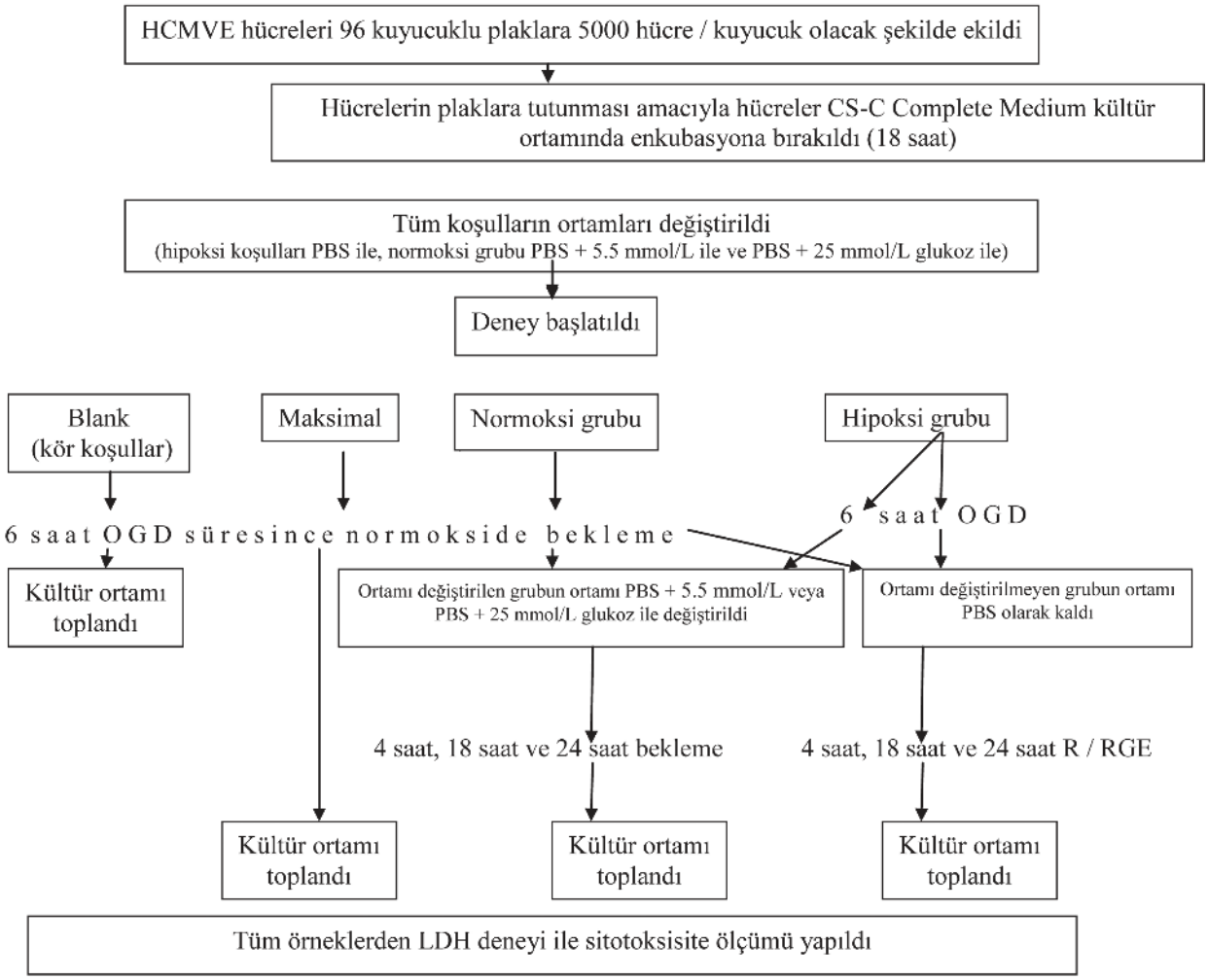
Ticari olarak üretilen insan beyin mikrovasküler endotel hücre hattı Clonetics Corporation'dan (ACBRI 376, Kirkland WA, USA) alındı. Hücreler büyüme faktörü ve %10 serum içeren kültür ortamında tutuldu (CSC Certified, CS-C Complete Medium, Cell Systems Corporation), ortam 2 günde bir değiştirildi ve 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 µL kültür ortamı eklendi.

H-R hasar modeli olarak, hipoksinin yanı sıra, *in vivo* koşullara daha yakın olduğu için glukozun da ortamdan 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 ortamla 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. Sitotoksisite 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 probları kullanılarak florometrik yöntemle değerlendirildi [18].

Modelin uygulanması

Hücrelerin ekilmesinden 18 saat sonra kuyucuklardaki hücreler mikroskopta incelendiğinde yaklaşık %80 sıkışık oldukları gözlendi. Tüm koşulların 200'er µL 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 µL 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^{O}C'deki enkubatöre konuldu. OGD + R / RGE plağı ise, hipoksi odacığına (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 düştükten 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^{O}C'deki enkubatöre kaldırıldı. 6 saat OGD süresi dolduktan sonra hipoksi sonlandırıldı. Plaklar hipoksi odacığından çıkarıldı. Hem hipoksi (OGD + R / RGE) plağındaki "6 saat OGD", hem de normoksi plağındaki "6 saat normoksi" kuyucuklarında bulunan kültür ortamından 75'er µL alınarak Eppendorf tüplerine aktarıldı ve ağızları kapatılarak 24 saat boyunca (deney süresince), deney tamamlandıktan sonra sitotoksisite ölçümü yapılmak üzere, +4^{O}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^{O}C'ye kaldırıldı (reoksijenas-

yon süreci). 6 saat hipoksiden sonra 4 saat, 18 saat ve 24 saat reoksijenasyon süreleri dolduğunda da ortamlar alındı ve +4^{O}C'de saklandı. Reoksijenasyonun 22. saatinde maksimal (en yüksek sitotoksisite) 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 solusyonu 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 sitotoksisite değeri hesaplandı. Sitotoksisite hesaplanması iki aşamada yapıldı:

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

* 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 enkubasyondan 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. Fluoresans şiddeti 485 nm eksitasyon ve 528 nm emisyonda multiplak okuyucuda (BIO-TEK Instruments Inc, USA) ölçüldü [18].

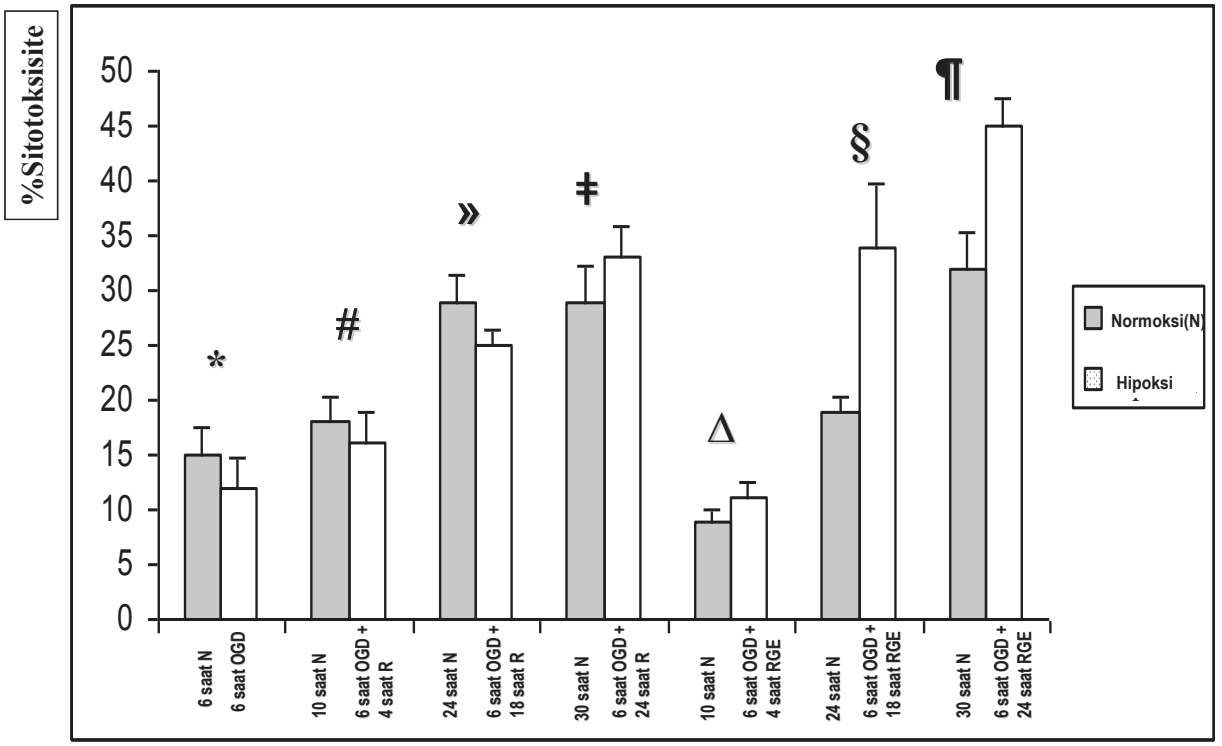
İstatistiksel analiz

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 sitotoksisite bulguları 5.5 mmol/L ve 25 mmol/L glukoz içeren ortamlarla OGD modeli uygulandı. 5.5 mmol/L glukoz içeren ortamla deney yapıldığında hem OGD ile hem de farklı sürelerde R/RGE uygulaması ile sitotoksisitenin 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 sitotoksisitenin 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]) sitotoksisite 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]) sitotoksisite değerlerinin zamanla değişimleri anlamlı idi (sırasıyla $p=0.003$ ve $p=0.001$).



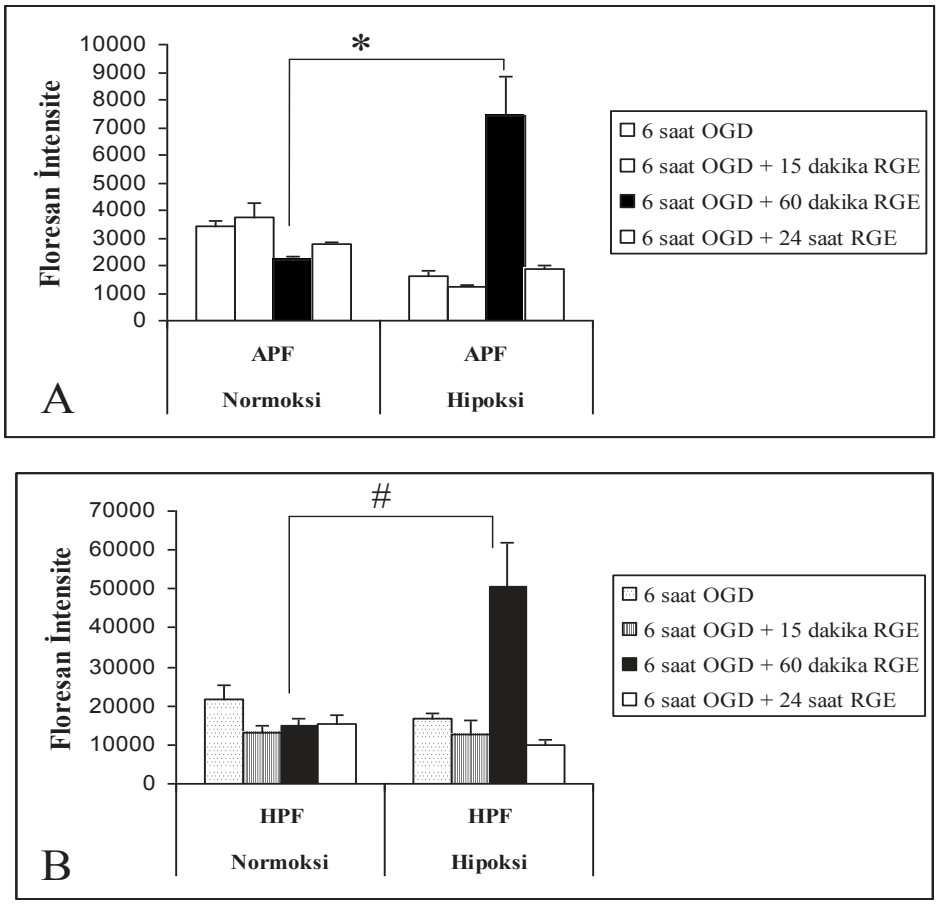
Şekil 2. Sitotoksisite sonuçları. 25 mmol/L glukoz + PBS ile ortamı değiştirilen ve değiştirilmeyen gruplarla yapılan deneyin %sitotosisite değerleri (Ortalama ± standart sapma). p değeri her koşulun hipoksi ve normoksi değeri arasındaki farkı göstermektedir (p değerleri: *0.117, #0.262, »0.100, □0.055, 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 problarıyla ayrı ayrı ölçümlenen ROT'un anlamlı olarak arttığı gözlendi (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 karşılaştırıldığında, 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 değiştirmediği 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 sürvivin 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 glukoz 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 hücresel fonksiyonlar üzerine etkili olan transkripsiyon faktörlerinden biri "hypoxia-inducible factor 1α" (HIF-1α)'dır. Hipoksi, pek çok hücrede HIF-1α'nın ekspresyonunu artırmakta ve bu artış da hücreyi hipoksi hasarından koruyan glukoz transporterları, glikolitik enzimler, vasküler endotelyal 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. Kardiak 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 hücresel 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. Kardiak 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 araştırmada, 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 TUBİTAK 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]. Sayın 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, Malyutina 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, Kuppusuamy P, Thompson-Gorman S, Klunk D and Lutty GA. (1994) Measurement and charactereization of free radical generation in reoxygenated human endothelial cells. Am J Phiysiol 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.