

## OKSİDATİF STRESİN ENDOTEL DİSFONKSİYON OLUŞUMUNDAKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

**Ersin ÖZKAN**

Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, mrsersin38@gmail.com Hatay/TÜRKİYE

**Cem ABİDOĞLU**

Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, cemabidoglu@yahoo.com  
Hatay/TÜRKİYE

**Mehmet Fatih DAĞLI**

Dr., Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, [dr\\_fatih\\_dagli@hotmail.com](mailto:dr_fatih_dagli@hotmail.com)  
Hatay/TÜRKİYE

**Meral URHAN KÜÇÜK**

Doç Dr., Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, meralurhan@hotmail.com Hatay/TÜRKİYE

### ÖZET

Endotel, kardiyovasküler sistem içerisinde yer alan, damar iç çeperlerini saran, mezoderm kaynaklı tek katlı yassı epitel hücrelerinden oluşan ve bu hücrelerin sentezlediği çeşitli faktörler aracılığıyla vasküler tonusun, hücre adezyonunun, inflamasyonun, damar geçirgenliğinin ve koagülasyonun kontrolünün düzenlenmesinde önemli rol oynayan dokudur. Bu fizyolojik ve patolojik olaylardaki herhangi bir dengesizlik endotel disfonksiyonuna neden olmaktadır. Endotel disfonksiyonu, ateroskleroz, hipertansiyon, diyabet gibi birçok hastalığa neden olabileceği gibi bunların sonucunda da ortaya çıkabilir. Bu alandaki gelişmeler, aterosklerozis ve kardiyovasküler morbidite ve mortalite ile ilişkili risk faktörlerinden biri olan oksidatif stresin endotel disfonksiyon mekanizmalarını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Moleküler oksijenin reaktif ara maddeleri olan ROS (reaktif oksijen türleri)'un hücre içinde önemli rolleri vardır. Bununla birlikte, reaktif ROS üretimi ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengesizlik, hem metabolik hem de aterosklerotik hastalıklarda vasküler hasara yol açan endotel disfonksiyonunun oluşumunda birincil öneme sahiptir. Yani, artmış oksidatif stres endotel disfonksiyonunun patogeneziindeki ana mekanizma olarak kabul edilmektedir. Yapılması planlanan bu çalışmada amaç, oksidatif stresin endotel disfonksiyonunda, kilit rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin ekspresyon değişimleri üzerindeki etkisini araştırmaktır.

Çalışmamızda HUVEC hücreleri 4,5 g/L glukoz içeren (yüksek konsantrasyon glukoz /high glukoz) (HG) çoğaltılarak oksidatif stres modeli oluşturuldu. Kontrol grubu olarak 1 g/L glukoz içeren (Normal konsantrasyon glukoz/normo glukoz) (NG) besiyerinde çoğaltılan hücreler kullanıldı. HG besi yerinde çoğaltılan hücrelerde MDA düzeyi kontrol grubuna göre (NG besiyerinde kullanılan hücre grubu ) anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p < 0.05$ ). Oksidatif stresin HUVEC hücrelerinde ET1, eNOS ve VCAM1 genlerinin ekspresyon değişimleri incelendi. Gen ekspresyonları Real Time PCR kullanılarak yapıldı. HG besiyerinde çoğaltılan HUVEC hücrelerinde VCAM1, eNOS gen ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir artış gözlenirken ( $p < 0.05$ ), ET-1 gen ekspresyonunda bir fark gözlenmedi ( $p > 0.05$ ). Oksidatif stres endotelin ve eNOS'un gen ekspresyon arttırmak suretiyle endotel disfonksiyonuna sebep olmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Endotel disfonksiyon, Oksidatif stres, HUVEC, Gen ekspresyonu

## INVESTIGATION OF THE ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN ENDOTHELIAL DYSFUNCTION

### ABSTRACT

The endothelium is a tissue located in the cardiovascular system that surrounds the inner vascular walls and plays an important role in regulating vascular tone, cell adhesion, inflammation, vascular permeability and coagulation through mesoderm-originated single-layered flat epithelial cells and the various factors synthesized by these cells. Any instability in these physiological and pathological events causes endothelial dysfunction. Endothelial dysfunction can cause in many diseases such as atherosclerosis, hypertension, diabetes, hypercholesterolemia and heart failure, as well as in the result. Oxidative stress, one of the risk factors associated with these developments, atherosclerosis and cardiovascular morbidity and mortality, is thought to facilitate endothelial dysfunction mechanisms. ROS (reactive oxygen species), reactive intermediates for molecular oxygen, have important roles in the cell. However, the imbalance between reactive ROS production and antioxidant defense systems has a primary impetus in the formation of endothelial dysfunction leading to vascular injury in both metabolic and atherosclerotic diseases. That is, increased oxidative stress is regarded as the main mechanism in the pathogenesis of endothelial dysfunction.

In our study, oxidative stress model was created by growing HUVEC cells in medium containing 4.5 g/L glucose (high concentration glucose / high glucose) (HG). Cells grown in medium containing 1 g / L glucose (normal concentration glucose / normo glucose) (NG) were used as control group. MDA levels were significantly higher in cells grown in HG medium than in control group (NG medium group) ( $p < 0.05$ ). Expression changes of ET1, eNOS and VCAM1 oxidative stress genes in HUVEC cells were examined. Gene expressions were performed using Real Time PCR .While there was a significant increase in, eNOS VCAM1 gene expression levels in HUVEC cells grown in HG medium ( $p < 0.05$ ), no difference was observed in ET-1 gene expression ( $p > 0.05$ ). Oxidative stress caused endothelial dysfunction by increasing gene expression of endothelin and eNOS.

**Key words:** Endothelial dysfunction, Oxidative stress, HUVEC, Gene expression

### 1.GİRİŞ

Endotel, sentezlediği çeşitli faktörlerle fiziksel ve kimyasal sinyallere cevap oluşturan tek katlı bir hücre tabakasıdır (Carlomosti ve ark. 2016). Keşfedildiği ilk zamanlarda, damar duvarının iç yüzeyini döşeyen basit bir bariyer olarak düşünülen endotel (Adler ve ark. 2000, Kharbanda ve ark. 2001), zamanla bu tek katlı basit yapısına rağmen sentezlediği moleküllerle vücut homeostazının sürdürülmesine katkıda bulunan, vasküler tonusun, hücre adezyonunun, inflamasyon, damar geçirgenliği ve koagülasyonun kontrolünde anahtar rolü olan önemli bir organ olarak kabul edilmiştir (Fishman 1982). Durgun bir endotelyal fenotipten, savunma yanıtı oluşturulmuş duruma geçişi temsil eden endotel aktivasyonu olarak kabul edilen endotel disfonksiyonu (Hansson 2005), endotelyumun antikoagülan ve antiinflamatuvar özelliklerinin değişmesi, vasküler gelişim modülasyonunun bozulması gibi patolojik durumları ifade etmekte kullanılmasına rağmen genellikle damar duvarında nitrik oksit (NO) biyoaktivitesinin kaybına bağlı olarak, endotelde meydana gelen vazorelaksasyon bozukluğu şeklinde tanımlanmaktadır (Urbich ve ark. 2008). Endotel disfonksiyonu ateroskleroz, hipertansiyon, diyabet, hiperkolesterolemi ve kalp yetmezliği gibi hastalıkların oluşumunda rol alabildiği gibi bunların sonucunda da ortaya çıkabilir (Münzel ve ark. 2008).

Normal yaşamda, pro-oksidan (radikal oksijen türleri) ile radikal oksijen türlerinin reaktif özelliklerini baskılayabilen antioksidanlar arasında bir denge bulunmaktadır. Aerobik yaşam ancak

pro-oksidanların antioksidan defans sistemi tarafından dengelenmesi ile sürdürülebilir. Bu dengenin pro-oksidan moleküller lehine değiştiği durumlarda oksidatif stres, oluşmaktadır. Oksidatif stres sonucunda oluşan radikal oksijen türleri biyomoleküllere zarar vererek hücrel disfonksiyona neden olduklarından dolayı, aerobik canlılarda homeostazın sürdürülebilmesi için antioksidan kapasitenin uygun bir seviyede tutulması gerekir (Ross 1999, Emre ve Şan 2004).

Vasküler hücrelerde radikal oksijen kaynakları; mitokondriyal solunum, araşidonik asit yolağı enzimleri (lipoksijenaz ve siklooksijenaz), sitokrom p450 enzim sistemi, ksantin oksidaz, NADH/NADPH oksidaz, NO sentaz, peroksidazlar ve diğer hemoproteinlerdir (Anderson 1999). Radikal oksijen türlerinin, NO biyoaktivitesi kaybında ve dolayısıyla endotel disfonksiyonu oluşumunda rol alan etkenlerden biri olduğundan sağlıklı bir endotelyum için, vasküler hücrelerde pro-oksidan/antioksidan dengesinin sağlanması oldukça önemli (Kalem 2013 ) olduğu düşünülmektedir (Tiyekli 2016).

Normalde sağlıklı hücrelerde kontrol altında tutulan ROS (Johansen JS 2005; Hamamcıoğlu AC, 2017), hücre içi hiperglisemik koşullar altında polioll yolağındaki artan glikoz akışı, AGE'lerin oluşumu ve reseptörlerinin aktivasyonundaki artış, PKC izoformlarının aktivasyonu, hekzoamin yolunun aşırı aktivasyonu ve anti oksidan savunmasının azalışı gibi farklı metabolik yollar ROS oluşumu artışı indüklemektedir (Stratton IM 2000, Zoungas S 2012, Fiorentino TV 2013). Kronik hiperglisemi, hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak PKC izoformlarını aktive eden dolaşımdaki sitokin, büyüme faktörlerini, endotelin-I ve anjiyotensin II konsantrasyonlarını da arttırır ( Koya D 1997, Liu Y 2012, Fiorentino 2013). Hipergliseminin neden olduğu oksidatif stres, diyabette görülen mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar ile aterosklerozun altında yatan endotel disfonksiyonuna yol açmaktadır (Fiorentino TV 2013, Hamamcıoğlu AC 2017).

Endotel fonksiyonunda dolayısıyla da disfonksiyonunda endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS), endotelin 1 (ET-1), vasküler hücre adezyon molekülü 1 (VCAM 1) gibi moleküller önemli rol oynamaktadır. Endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) NOS3 geni tarafından kodlanan, 7q35-7q36 kromozom bölgesinde bulunan, vasküler endotel hücrelerinde NO sentezinden sorumlu enzimdir (Endemann ve Schiffrin 2004, O'riordan ve ark. 2005). Endotelyal disfonksiyonda eNOS enziminin ürünü olan NO seviyesi önemli ölçüde azalır (Al Suwaidi ve ark. 2000). Endotelin 1 (ET-1) hipertansiyon ve diğer kardiyovasküler hastalıklarda vasküler yeniden yapılandırmaya katkı sağlayan güçlü bir vazokonstriktördür. ET-1 ağırlıklı olarak endotel hücreleri tarafından sentezlenir ve endotel hücrelerinde yüksek miktarda ekspresyonu endotel disfonksiyona sebep olur (Dörtudak 2015). Vasküler hücre adezyon molekülü 1 (VCAM 1) lenfositler, monositler, eosinofiller ve bazofillerin vasküler endotelyuma adezyonunu düzenleyen önemli bir proteindir. Hipertansiyonda endotel disfonksiyonu sonucunda hemodinamik strese cevap olarak üretilen ve vazodilatasyona neden olan NO'nun salınımı azalırken anjiyotensin dönüştürücü enzim ve güçlü vazokonstriktör olan ET-1 yapımı artmaktadır. Vasküler dokuda yüksek konsantrasyona ulaşan anjiotensin 2; VCAM 1 ve ICAM 1 ile bazı sitokinlerin miktarının artmasına ve bu sitokinlerin hücre içine akışına neden olur (Ross 1999).

Bu çalışmada, yüksek konsantrasyon glukoz ile oluşturulan oksidatif stresin HUVEC (Human Umbilical Vein Endotelial Cells/İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücreleri) hücrelerinde, endotel fonksiyonunda kilit rol oynayan ET-1, eNOS ve VCAM1 gibi proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonu üzerindeki etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Ateroskleroz, hipertansiyonu içeren kardiyovasküler hastalıklar ile diyabet gibi birçok hastalığın patofizyolojisinde rol alan ve bazı hastalıkların oluşumunda köken teşkil eden endotel disfonksiyonunda kilit rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin ifadesinin oksidatif stres ile değişip değişmediğinin araştırılması, patofizyolojisinin altında endotel disfonksiyonun yatan hastalıkların oluş mekanizmasının aydınlatılmasına ve terapötik hedef belirlemede sunacağı katkı açısından önemlidir.

## 2. MATERYAL ve METOD

### 2.1. Hücre Kültürü

Çalışmamızda, human umbilical ven hücre hattı (HUVEC) kullanıldı. Hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC)'den temin edildi. HUVEC hücreleri, % 20 Fetal Bovine Serum (FBS) ve % 1 penisilin/ streptomisin, 10 mg/ml heparin varlığında 0,3 ng/ml EGF içeren vasatta %95 nem, %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C koşulları sağlayan inkübatörde (Thermo, HeraCell 150i) üretildi. Kültür vasatı haftada iki kez değiştirilerek hücreler flask yüzeyini %70-80 oranında kapladığında deneylerde kullanıldı.

### 2.2. Oksidatif stres modeli oluşturma

HUVEC hücreleri, tripan mavisi boyası testi kullanılarak sayılıp 75 cm<sup>2</sup>'lik flaslara 25.000 hücre/ml olacak şekilde, iki ayrı grup oluşturularak ekildi. Birinci grupta HUVEC hücreleri 4,5 g/L glukoz içeren (yüksek konsantrasyon glukoz /high glucose (HG)) vasatta (8-10 gün) çoğaltıldı. Hücrelerin büyütülüp çoğaltıldığı vasat içinde glukoz konsantrasyonunu sabit tutmak amacıyla ortalama 8-10 gün boyunca besiyeri her gün değiştirilerek oksidatif stres modeli oluşturuldu. Kontrol grubu olarak 1 g/L glukoz içeren (Normal konsantrasyon glukoz/normo glucose (NG)) besiyerinde çoğaltılan hücreler kullanıldı. Hücreler, flask tabanını % 70 oranında kapladığında, ilk olarak oksidatif stres oluşup oluşmadığını test etmek amacıyla malondialdehit (MDA) analizinde kullanıldı.

### 2.3. Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Belirlenmesi

MDA lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olmakla birlikte lipidlere ait peroksidasyonun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan önemli bir parametredir (Sezer K, 2014). MDA düzeyi, Jain SK (1986) tarafından bildirilen yöntemle göre belirlenmiştir (Jain 1986).

### 2.4. qRT-PCR gen ekspresyon analizi

Total RNA izolasyonu (Qiagen; RNeasy Mini Kit) ve cDNA sentezi (Thermo; High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit) aşamaları ticari kit kullanılarak yapıldı. Real-time PCR deneyleri ticari kit (Thermo; Applied Biosystems Power SYBR Green PCR Master Mix,) kullanılarak yapıldı. Çalışmada kullanılan ET-1, eNOS, VCAM genlerine ait primer dizileri tablo 1 de verilmiştir. Housekeeping gen olarak kullanılan  $\beta$ -aktin genine ait primer ise, ticari olarak (Qiagen) satın alındı. Spesifik olmayan ürünleri ve primer-dimer varlığını kontrol etmek için melting curve analizi yapıldı. Deneyler üç tekrarlı yapılmış olup, her örnek duplike olarak çalışıldı. Deney sonuçları kat değişimi (Fold-change) olarak verildi.

**Tablo 1.** Primer dizileri

Genler	Primerler	Kaynak
ET-1	Forward: 5' GACATCATTGGGTCAACACTC-3' Reverse: 5'-GGCATCTATTTTCACGGTCTGT-3'	(Yuan ve ark. 2013)
eNOS	Forward: 5'-GTTTGTCTGCGGCGATGT-3' Reverse: 5'-GTGCGTATGCGGCTTGTC-3'	(Wang ve ark. 2013)
VCAM1	Forward: 5'-TCTGGAAATGCAACTCTCACC-3' Reverse: 5'-CAAACCTCACAGGGCTCAGG-3'	(Engel ve ark. 2017)

## 2.4.İstatistiksel Analiz

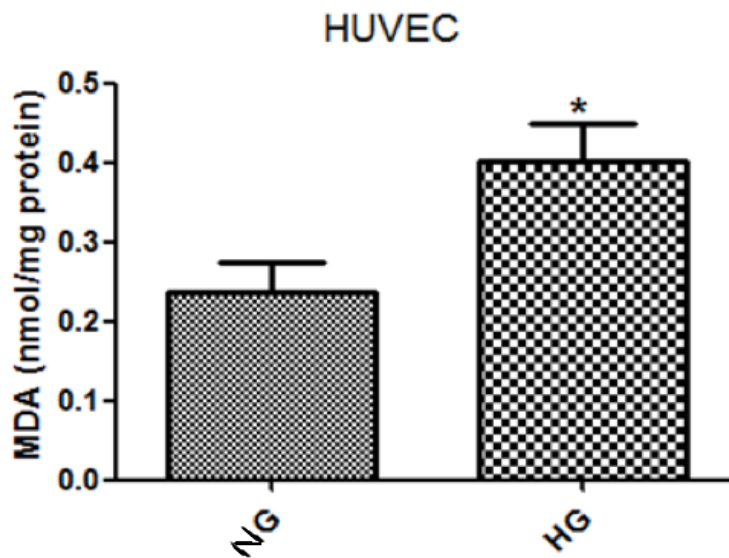
MDA verilerinin istatistiksel analizinde IBM SPSS Statistics 23 programı kullanıldı. Verilerin değerlendirilmesi Mann-Whitney U testi ile yapıldı.  $p<0.05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.Real-Time PCR verilerinin istatistiksel analizi RT2 Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5 ile yapıldı. Deneyle 3 defa tekrarlandı. Sonuçlar kat değişimi olarak verildi.  $p<0.05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 3.BULGULAR

### 3.1 Malondialdehit Düzeylerinin Belirlenmesi

75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara 25.000 hücre/ml olacak şekilde, 4,5 g/L glukoz içeren (HG) ile 1 g/L glukoz içeren (NG) besiyeri hergün değiştirilerek glukoz konsantrasyonu sabit kalması sağlanan vasat içinde çoğaltılan HUVEC hücre lizatı örneklerinde MDA ölçümü yapıldı.

HG vasatta çoğaltılan hücrelerdeki MDA düzeyi, kontrol grubuna (NG vasatta çoğaltılan hücreler) kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p=0,0326$ ) (Şekil 1).



136

**Şekil.1**HUVEC hücrelerinde MDA düzeyleri. Deneyle 3 defa tekrarlanmıştır

(\* $p<0.05$  ).

Yüksek konsantrasyon glukoz içeren vasatta çoğaltılan HUVEC hücrelerinde MDA analizi istatistiksel tanımlayıcı verileri Tablo 2’de gösterildi.

**Tablo 2:** HUVEC hücrelerinde MDA analizi tanımlayıcı verileri.

MDA (nmol/mg protein)			
Maruziyet	Ortalama ± Standart Sapma	Ortanca	<i>p</i>
Kontrol (NG)	0.2365± 0.0738	0,2186	
<b>HG</b>	0.4015± 0.0936	0,3868	0,0326

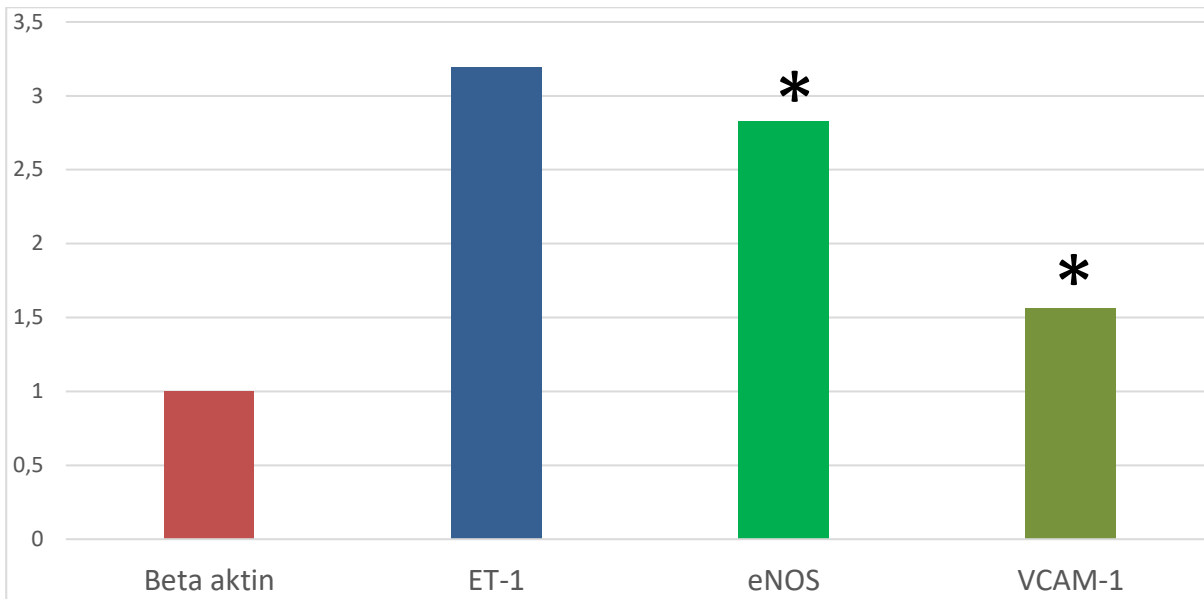


### 3.2 Gen Ekspresyon Analizi

HG besiyeri içinde çoğaltılan HUVEC hücrelerinden elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak ET-1, eNOS, VCAM1 gen ekspresyon analizleri yapıldı. Housekeeping gen olarak  $\beta$ -aktin kullanıldı. Sonuçlar kat değişimi olarak verildi. HG içinde çoğaltılan HUVEC hücrelerinde ET-1 genindeki kat değişimi değeri 3.19 ( $p > 0.05$ ) kat iken, eNOS genindeki kat değişimi 2.83 kat ( $p < 0.05$ ); VCAM-1 genindeki kat değişimi değeri 1.56 ( $p < 0.05$ ) olarak bulundu (Tablo 3). eNOS ve VCAM1 gen ekspresyon seviyelerinde, HG içinde çoğaltılan HUVEC hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlenirken ( $p < 0.05$ ), ET-1 de 3,19'luk bir artışa rağmen anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 2).

**Tablo.3** HG besiyeri içinde çoğaltılan HUVEC hücrelerinde ET-1, eNOS ve VCAM1 genlerine ait kat değişimi ve p değerleri.

Maruziyet	HG/NG	HG/NG
Gen sembolü	Kat değişimi	<i>p</i>
ET-1	3.19	0.140933
eNOS	2.83	0.002802
VCAM	1.56	0.022626
B aktin	1.00	0.000000



**Şekil 2:** HG besiyeri içinde çoğaltılan HUVEC hücrelerinde ET-1, eNOS ve VCAM1 gen ekspresyon düzeyi değişimleri. Deneyler 3 defa tekrarlanmış, sonuçlar kat değişimi olarak verilmiştir. (\* $p < 0.05$ ).

### 4.TARTIŞMA

Endotelyum, birbirine sıkı bağlantılarla bağlı endotel hücrelerden oluşan ve damarda en içteki lümeni kaplayan (Mizuno 2011) bir doku olup damar duvarı ile kan hücreleri arasında düzgün ve kesintisiz bir duvar oluşturur. Vasküler tonusun düzenlenmesi, kan dolaşımının sürdürülmesi, akışkanlık, pıhtılaşma ve inflamatuvar tepkiler dâhil olmak üzere birçok önemli işlevi kontrol eden pek çok vazo aktif madde ile bağ dokusu yapılarının sentezinden sorumlu olan endotel doku (Ross

1999, Gonzalez ve Selwyn 2003, Emre ve Şan 2004, Kalem 2013), bir yandan koruyucu görevi üstlenirken diğer yandan damar duvarının normal fizyolojik fonksiyonlarının sürdürülmesini de sağlar (Baykal 1998). Endotel fonksiyonunun bozulması (endotel disfonksiyonu); endotelin normal fizyolojik fonksiyonlarını yerine getirmesindeki yetersizlik olarak belirtilmektedir (O'Riordan ve ark. 2005, Park K H, 2015, Mason J, 2018). Normal endotelin damar homeostazında hayati bir rol oynamasından dolayı vazospazm, trombüs oluşumu ve damar proliferasyonu ile ilişkili hastalıkların patogeneğinde endotel işeyişindeki bozukluğun (endotel disfonksiyonu) önemli olduğu birçok çalışma ile ortaya konmuştur (O'Riordan 2005, Gavriilaki 2019).

Radikal oksijen türleri (pro-oksidan) ile bu moleküllerin reaktif özelliklerini baskılayabilen antioksidanlar arasında bulunan dengenin, pro-oksidan moleküller lehine değişmesi sonucu oluşan oksidatif stres, biyomoleküllere zarar vererek hücrel disfonksiyona neden olmaktadır. (Ross 1999, Emre ve Şan 2004). Hiperglisemi sonucu çeşitli yollarla oluşan oksidatif stres, endotelin yapı ve işlevlerini bozan endotel hasarına neden olmaktadır (Gürel 2009, Coco 2019).

Bu çalışmada, yüksek konsantrasyon glukoz ile oluşturulan oksidatif stresin HUVEC hücrelerinde, endotel fonksiyonunda kilit rol oynayan endotelin, eNOS ve VCAM gibi proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonu üzerindeki etkileri araştırıldı. 4,5 g/L glukoz içeren (HG) ve 1 g/L glukoz içeren (LG) besiyerlerine ekilen HUVEC hücreleri, daha fazla süre yüksek konsantrasyon glukoz içeren besiyerinde çoğalmalarını sağlamak amacıyla, 25000 h/ml ekildi ve besiyeri her gün değiştirilerek oksidatif stres hücre modeli oluşturuldu. Oksidatif stres modelinin oluşturulup oluşturulmadığı ise bu hücrelerin lizatından MDA ölçülerek yapıldı. Çalışmamızda HG vasatta çoğaltılan hücrelerdeki MDA düzeyi, kontrol grubuna (NG vasatta çoğaltılan hücreler ) kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p=0,0326$ ) lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA, lipidlere ait peroksidasyonun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan önemli bir parametredir (Sezer K, 2014). Çalışmamızda HG vasatta çoğaltılan hücrelerdeki MDA düzeyi, kontrol grubuna göre artmış olması yüksek konsantrasyondaki glukozun oksidatif hasar yarattığını ve oksidatif stres hücre modeli oluşturduğumuzu göstermektedir. Çalışmamızdaki MDA'ya özgü verilerimizle uyumlu olarak Shen ve ark ( 2019) çeşitli konsantrasyonlarda glukoz içeren vasatlarda çoğaltılan HUVEC hücrelerindeki MDA düzeyinin HG içeren vasatta çoğaltılan kontrole göre önemli düzeyde bir artış olduğu ortaya konmuştur (Shen 2019). Hipergliseminin neden olduğu oksidatif stres, diyabette görülen mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar ile aterosklerozun altında yatan endotel disfonksiyonuna yol açmaktadır (Fiorentino TV 2013, Hamamcioğlu 2017).

Çalışmamızda, eNOS ve VCAM1 gen ekspresyon seviyelerinde, HG içinde çoğaltılan HUVEC hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlenirken ( $p<0.05$ ), ET1 de 3,19 luk bir artışa rağmen anlamlı bir fark gözlenmedi. Yapılan bir çok çalışmada endotel disfonksiyonunda güçlü bir vazokontraksiyon faktörü olan ET-1, endotel disfonksiyonu durumlarında arttığı, vazodilatör faktör olan eNOS'un azaldığı, bir adezyon molekülü olan VCAM'ın ise endotel hücrelerinde düzeyinin normalde bazal düzeyde olduğu ancak endotel disfonksiyonu olduğu durumlarda arttığı ortaya konmuştur.

Padilla ve ark ( 2013) yüksek glukozun ET-1'i arttırdığını, artmış olan ET-1 in VCAM1 in artışına sebep olduğunu göstermişlerdir (Padilla 2013). Venkatesan ve ark ( 2013) yüksek glukozla indüklenmiş endotelial disfonksiyonda VCAM-1, arttığını ortaya koymuşlardır. (Venkatesan 2013). Bizim çalışmamızda ET- 1 3,19 kat lık bir artış olduğu halde anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Sen ve ark ( 2019) HG'nin HUVEC hücrelerinde eNOS düzeyini azalttığını ayrıca pNOS/eNOS oranında da bir azalmaya sebep olduğunu göstermişlerdir. Bittar ve arkadaşları (2005) obez olmayan tip II diyabet için kullanılan genetik hayvan modelinde yaptıkları çalışmada elde ettikleri veriler, beklenenin aksine diyabetin bir fonksiyonu olarak eNOS ekspresyonunun arttığını ortaya koymuştur. Bunun da genetik diyabet modeli olarak kullanılan sıçanların vasküler dokusunda eNOS ile ürünü NO düzeylerinin her zaman aynı yönde bir değişime uğramayabileceğini göstermiştir. Bizim çalışmamızda da eNOS gen ekspresyonunda HG de çoğaltılan HUVEC hücrelerinde arttığını gözlemledik.

Çalışmamızda, ateroskleroz ve hipertansiyonu içeren kardiyovasküler hastalıklar ile diyabet önemli komplikasyonlarından mikrovasküler ve makro vasküler bozukluklar gibi birçok hastalığın patofizyolojisinde rol alan endotel disfonksiyonu oluşumunda kilit rol oynayan proteinleri kodlayan genlerin ifadesinin yüksek konsantrasyon glukozu ile indüklenmiş oksidatif stres ile değişip değişmediğinin araştırılması, patofizyolojisinin altında endotel disfonksiyonun yatan hastalıkların oluş mekanizmasının aydınlatılmasına ve terapötik hedef belirlemede sunacağı katkı açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

## 5.SONUÇ

Yüksek konsantrasyondaki glukoz, HUVEC hücrelerinde oksidatif strese neden olarak, endotel disfonksiyonunda önemli rol oynayan endotelin-1, VCAM-1 gen ekspresyonlarında artışa sebep olurken eNOS gen ekspresyonunda endotel disfonksiyonunda beklenmeyen bir şekilde bir artışa sebep olmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. **Adler Y, Levinger U, Koren A, Tanne D, Fink N ve ark.** Relation of Nonobstructive Aortic Valve Calcium to Carotid Arterial Atherosclerosis. *The American Journal Of Cardiology*, **2000**, 86(10): s.1102-1105.
2. **Anderson TJ.** Assessment and Treatment of Endothelial Dysfunction in Humans. *J Am Coll Cardiol*, **1999**, 34: s.631–638.
3. **Baykal Y, Özet G, Kocabalkan F.** Endotel Fonksiyonları ve Hastalıklardaki Rolü. *Klin Tıp Bilimleri*, **1998**, s.150-58.
4. **Bitar MS, Wahid S, Mustafa S, Al-Saleh E, Dhaunsi GS, Al-Mulla F.** Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. *Eur J Pharmacol*. **2005** 21;511(1):53-64.
5. **Carlomosti F, D'Agostino M, Beji S, Torcinaro A, Rizzi R ve ark.** Oxidative Stress-Induced miR-200c Disrupts the Regulatory Loop Among SIRT1, FOXO1, and eNOS. *Antioxid Redox Signal*, **2017**, 20;27(6): s.328-344.
6. **Coco C, Sgarra LA, Nacci C, Pasculli B, Parrella P ve ark.** Can Epigenetics of Endothelial Dysfunction Represent the Key to Precision Medicine in Type 2 Diabetes Mellitus? *Int J Mol Sci*, **2019**, Jun 17;20(12). pii: E2949. doi: 10.3390/ijms20122949.
7. **Dörtdudak S.** Siroz ve Hepatorenal Sendromda Endotel Disfonksiyonu. Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Türkiye.
8. **Emre M, San M.** Endoteldeki İyon Kanalları ve İşlevleri. *Erciyes Tıp Dergisi*, **2004**, 26(4): s.168–93.
9. **Endemann DH, Schiffrin EL.** Endothelial Dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*, **2004**, 15(8): s.1983-92.
10. **Engel B, Müller G, Roch B, Schröder HE, Aringer M ve ark.** Serum of Patients with Antiphospholipid Syndrome Induces Adhesion Molecules in Endothelial Cells. *Atheroscler Suppl*, **2017**, 30: s.141-148.
11. **Fiorentino TV, Prioletta A, Zuo P, Folli F.** Hyperglycemia-Induced Oxidative Stress and Its Role in Diabetes Mellitus Related Cardiovascular Diseases. *Curr Pharm Des*. **2013**;19(32):5695-703.
12. **Fishman AP.** Endothelium: A Distributed Organ of Diverse Capabilities. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1982**, 401(1): s.1-8.



- 13. Gavriilaki E** Linking Complement Activation, Coagulation, and Neutrophils in Transplant-Associated Thrombotic Microangiopathy *Thromb Haemost* **2019**; 119(09): 1433-1440
- 14. Gonzales MA, Selwyn AP** Endothelial dysfunction, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease *The American Journal of Medicine* **2003** Vol 115 P 99-106
- 15. Gürel İ E.** Endotelin İşlevleri ve Hastalıklarla İlişkisi. *Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci* **2009**;21(3)
- 16. Hamamcıoğlu AC** The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetes Mellitus *Turkish Journal of Diabetes and Obesity* **2017**; 1: 7-13
- 17. Hansson GK.** Inflammation, Atherosclerosis, And Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine*, **2005**, 352(16), 1685-1695.
- 18. Jain SK.** Membrane Lipid Peroxidation in Erythrocytes of the Newborn. *Clin Chim Acta*, **1986**, 161(3): s.301-306.
- 19. Johansen SJ** Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice *Cardiovascular Diabetology* **2005**, 4:5
- 20. Kalem M.** Endotel Disfonksiyonu Olan Hipertansif Hastalarda Sarımsak Ekstresinin Akıma Bağlı Dilatasyon ve Endotel Fonksiyonu Üzerine Etkisi. *Tıpta Uzmanlık Tezi, Türkiye.*
- 21. Kharbanda RK, Deanfield JE.** Functions of The Healthy Endothelium. *Coronary Artery Disease*, **2001**, 12(6): s.485-491.
- 22. Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K, King GL.** Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *Clin Invest* **1997**; 100: 115-26.
- 24. Liu Y, Lei S, Gao X, et al.** PKC  $\beta$  inhibition with ruboxistaurin reduces oxidative stress and attenuates left ventricular hypertrophy and dysfunction in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clinical Science* **2012**; 122 (4): 161-73.
- 25. Mason J C.** Vascular Cytoprotection, Autoimmune Disease, and Premature Atherosclerosis. *Indian Journal of Rheumatology*, **2018**, 13/2: 121-128.
- 26. Mizuno, Y., Jacob, F.R., Mason, R.P.** İnflammation and the Development of Atherosclerosis-Effects of Lipid – Lowering Therapy. *Journal of Atherosclerosis Thrombosis*, (**2011**) 18;351-358.
- 27. Münzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E.** Pathophysiology, Diagnosis and Prognostic İmplications of Endothelial Dysfunction. *Annals Of Medicine*, **2008**, 40(3), 180-196.
- 28. O'Riordan E, Chen J, Brodsky SV, Smirnova I, Li H ve ark.** Endothelial Cell Dysfunction: The Syndrome in Making. *Kidney International*, **2005**, 67(5):1654-8.
- 29. Padilla J, Carpenter AJ, Das NA, Kandikattu HK, López-Ongil S, Martinez-Lemus LA, Siebenlist U, DeMarco VG, Chandrasekar B.** TRAF3IP2 mediates high glucose-induced endothelin-1 production as well as endothelin-1-induced inflammation in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **2018** 314(1):H52-H64.
- 30. Park KH ve Park WJ.** Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *J Korean Med Sci*. **2015**, 30(9):1213-1225.
- 31. Ross R.** Atherosclerosis-An İnflammatory Disease. *Nejm*, **1999**, 340: s.115 -126.
- 32. Sen CK.** Antioxidant and Redox Regulation of Cellular Signaling: İntroduction. *Med. Sci. Sports Exerc*, **2001**, 33 (3): s.368-370.
- 33. Sezer K, Keskin M.** Serbest Oksijen Radikallerinin Hastalıkların Patogenezisindeki Rolü. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **2014**, 28:1: s.49-56.

- 34. Shen J, Liu M, Xu J, Sun B, Xu H, Zhang W.** ARL15 overexpression attenuates high glucose-induced impairment of insulin signaling and oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Life Sci.* **2019** 220:127-135.
- 35. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, et al.** UK Prospective Diabetes Study Group. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35). *BMJ* **2000**; 321: 405-12.
- 36. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR Jr ve ark.** Long-Term Follow-Up Of Patients with Mild Coronary Artery Disease and Endothelial Dysfunction. *Circulation*, **2000**, 101(9): s.948-54.
- 37. Tiyekli Çelik ND.** Endotel Hücrenin Farklı Diyabet Stresleri Altında Mononükleer Hücreleri Bağlama ve Koruyucu Genleri İfadeleme Yanıtları. Doktora Tezi, Türkiye.
- 38. Urbich C, Kuehbach A, Dimmeler S.** Role Of Micrnas in Vascular Diseases, Inflammation and Angiogenesis. *Cardiovascular Research*, **2008**, 1;79(4):581-8.
- 39. Venkatesan B, Valente AJ, Das NA, Carpenter AJ, Yoshida T, Delafontaine JL, Siebenlist U, Chandrasekar B.** CIKS (Act1 or TRAF3IP2) mediates high glucose-induced endothelial dysfunction. *Cell Signal* **2013**. 25: 359–371
- 40. Wang B, Xing F, Liu N, Chen D, Li Z ve ark.** P38 $\alpha$  Subtype Is a Potential Target to Inhibit Enos Activity and No Production in Human Endothelial Cells. *Microvasc Res*, **2014**, 91: s.58-65. Doi: 10.1016/J.Mvr.2013.10.007. Epub 2013 Nov 4.
- 41. Yuan W, Zhao Md, Yuan Fl, Che W, Duan PG ve ark.** Association of Endothelin-1 Expression and Cartilaginous Endplate Degeneration in Humans. *Plos One*, **2013**, 8(4): E60062. Published Online 2013 Apr 2. Doi: 10.1371/Journal.Pone.0060062
- 42. Zoungas S, Chalmers J, Ninomiya T, et al.** ADVANCE Collaborative Group. Association of HbA1c levels with vascular complications and death in patients with type 2 diabetes: evidence of glycemic thresholds. *Diabetologia* **2012**; 55: 636-43.