

157334

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN UMBİLİKAL VENLERİNDEN ELDE EDİLEN
ENDOTEL HÜCRE (HUVEC) KÜLTÜRÜNDE, VASKÜLER
ENDOTELİYAL BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN (VEGF),
VASKÜLER HÜCRE ADEZYON MOLEKÜLÜ-1 (VCAM-1) VE
İNTERSELLÜLER ADEZYON MOLEKÜLÜ-1 (ICAM-1)
EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Yusufhan YAZIR

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Doktora Programı İçin Öngördüğü
Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Hakkı DALÇIK

**KOCAELİ
2004**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Ünvanı Adı SOYADI

Prof. Dr. Süreyya CEYLAN


İMZA

Üye

Ünvanı Adı SOYADI

Prof. Dr. Sait POLAT


İMZA

Üye

Ünvanı Adı SOYADI (Danışman)

Prof. Dr. Hakkı DALÇIK


İMZA

Üye

Ünvanı Adı SOYADI

Doç. Dr. Melda YARDIMOĞLU


İMZA

Üye

Ünvanı Adı SOYADI

Yrd. Doç. Dr. Serdar FİLİZ


İMZA

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

02/08/2004



Prof. Dr. Nejat GACAR

Enstitü Müdürü

Mühür

ÖZET

İnsan Umbilikal Venlerinden Elde Edilen Endotel Hücre (HUVEC) Kültüründe, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünün (VEGF), Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1 (VCAM-1) ve İntersellüler Adezyon Molekülü-1 (ICAM-1) Ekspresyonu Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

İnsan umbilikal veni endotel hücresi iyi bilinmektedir. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) endotel hücresinin çoğalmasını ve bazı adezyon moleküllerinin sentezlemesini sağlamaktadır. Adezyon moleküllerinden İntersellüler Adezyon Molekülü-1 (Intercellular Adhesion Molecules-1; ICAM-1) ve Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1 (Vascular Cell Adhesion Molecules-1; VCAM-1), kan hücrelerinden bir kısmının inflamasyon sırasında damar dışına çıkmasına yardım etmektedir. Bu çalışmadaki amacımız, *in vitro* koşullarda, başka hiç bir hücrel ve humoral uyarın olmadan, sadece VEGF'ün endotel hücrelerinin sentezledikleri VCAM-1 ve ICAM-1 ekspresyonu üzerine etkisini görmektir. Bu amaçla, umbilikal venden elde edilen endotel hücreleri kültüre edildi. 5. pasajdan sonra endotel hücreleri %2 serumlu M-199 medyumunu ile 24 saat inkübe edildi. Deney grubuna, 8 saat süresince 10 ng/mL VEGF verildi. Kontrol grubu ise %2 serum ile 8 saat daha inkübe edildiler. Sonra bu hücreler %4 paraformaldehitte tesbit edildi. Fiksasyonu takiben, ICAM-1 ve VCAM-1 antikorları kullanılarak immünohistokimya protokolü uygulandı. Deney ve kontrol gruplarında pozitif ve negatif boyanan hücreler sayıldı. VEGF verilen grupta, ICAM-1 ve VCAM-1 sentezinin arttığı görüldü ve bu artışın anlamlı olduğu Ki-Kare testi ile gösterildi. Sonuçlarımız gösterdi ki; VEGF, HUVEC kültüründe, ICAM-1 ve VCAM-1'in sentezini tek başına arttıran önemli bir faktördür.

Anahtar Kelimeler: VEGF, İmmünohistokimya, ICAM-1, VCAM-1, Adezyon Molekülleri, HUVEC

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) on the Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) and Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) in Human Umbilical Vein Endothelial Cell Culture

The human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) is well described. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) plays an important role in endothelial cell proliferation and synthesis of the some cell adhesion molecules. Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) provides extravascular migration in some of the blood cells during inflammation. In this study, we investigated the effects of VEGF on VCAM-1 and ICAM-1 expression of the endothelial cells without any other cellular or humoral factors that may be effective *in vitro*. Umbilical vein-derived endothelial cells were cultured. Following the 5th passage, endothelial cells were incubated in M-199 medium supplemented with 2% serum for 24 hours. The group of study was incubated in M-199 medium supplemented with 2% serum containing 10 ng/mL VEGF for 8 hours. The control group was cultured only in M-199 medium supplemented with 2% serum for 8 hours. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde. Following fixation, immunocytochemistry was applied using monoclonal antibodies to ICAM-1 and VCAM-1. Positive and negative immunostained cells were counted. The expressions of ICAM-1 and VCAM-1 were increased in VEGF group. Using Chi-Square analysis the increase was statistically significant. Overall, we have demonstrated that, VEGF is an important factor that stimulates the synthesis of ICAM-1 and VCAM-1 in the cultured HUVECs.

Key Words: VEGF, Immunocytochemistry, ICAM-1, VCAM-1, Adhesion Molecules, HUVEC

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince ve tezimin hazırlanması sırasında bana yön veren, her türlü bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, hiçbir konuda yardımını esirgemeyen

değerli hocam ve danışmanım,

Prof. Dr. Hakkı Dalçık'a,

Eğitim sürem boyunca büyük desteğini ve yardımlarını gördüğüm hocam,

Prof. Dr. Süreyya Ceylan'a

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'na geldiğim ilk günden beri tüm bilgi ve tecrübelerini sunan ve her konuda destek veren hocam,

Doç. Dr. Melda Yardımoğlu Yılmaz'a,

Her zaman yanımızda olan Anabilim Dalı'mız değerli Öğretim Üyeleri,

Yrd. Doç. Dr. Süheyla Gonca ve Yrd. Doç. Dr. Serdar Filiz'e,

Değerli çalışma arkadaşlarım,

Arş. Gör. Pelin Coştur Bıyüksız, Arş. Gör. Arzu Taş, Dr. E. Yeşim Tekdemir'e,

Tez çalışmam için gereken hücrelerin elde edilmesini sağlayan,

Tubitak Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Çalışanlarına,

Tez çalışmam sırasında hücre kültürü ile ilgili tüm bilgi ve deneyimlerini hiç sakınmadan paylaşan ve bana manevi olarak destek olan, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi,

Doç. Dr. Seyhun Solakoğlu'na,

Hücre kültürü aşamasında laboratuvar ve ekipman olanağı sağlayan ve bilgi desteği veren, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim

Üyesi,

Prof. Dr. Ayhan Bilir'e,

Deney sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde yardımını esirgemeyen,

Yrd. Doç. Dr. Müge Filiz'e,

Hayatım boyunca beni yalnız bırakmayan, sonsuz desteğini gördüğüm biricik eşim,

Yasemin Yazır'a

Ve aramıza katıldığı günden beri yaşam kaynağımız olan canım kızım,

İpeksu'ya,

TEŞEKKÜR EDERİM...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER	1
1.1. Endotel Hücreleri	1
1.1.1. Endotel Hücrelerinin Gelişimi	2
1.1.1.1. Vaskülogenezis	2
1.1.1.2. Anjiogenezis	4
1.1.2. Endotel Hücrelerinin Yapısı	5
1.1.3. Endotel Hücrelerinin Salgı ve Fonksiyonları	7
1.1.4. Endotel Hücreleri İle Kan Hücreleri Arasındaki İlişki	10
1.2. Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü	11
1.2.1. Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörünün Tarihçesi	11
1.2.2. Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörünün Yapısı	12
1.2.3. Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörünün Vücutta Dağılımı	14
1.2.4. Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörünün Etkileri	15
1.3. Hücrelerin Adezyonu	20
1.3.1 Hücre Bağlantı Kompleksleri	21
1.3.2. Hücre Adezyon Molekülleri	22
1.3.3. Hücre Adezyon Molekülü Çeşitleri	23
1.3.3.1 Kaderinler	24
1.3.3.1.1. E-Kaderin	25
1.3.3.1.2. N-Kaderin	25
1.3.3.1.3. P-Kaderin	25
1.3.3.1.4. VE-Kaderin	26
1.3.3.1.5. R-Kaderin	26
1.3.3.1.6. T-Kaderin	26

1.3.3.1.7. M-Kaderin	27
1.3.3.2. İntegrinler	27
1.3.3.3. Selektinler	28
1.3.3.3.1. E-Selektin	29
1.3.3.3.2. L-Selektin	30
1.3.3.3.3. P-Selektin	30
1.3.3.4. İmmünoglobulin Süperailisi	31
1.3.3.4.1. Nöral (N)-CAM	32
1.3.3.4.2. Platelet-Endotel (PE)-CAM	32
1.3.3.4.3. Mukozal Adressin (Mad)-CAM	33
1.3.3.4.4. CD2 (LFA-2)	33
1.3.3.4.5. CD58(LFA-3)	33
1.3.3.4.6. İntersellüler (I) CAM	33
1.3.3.4.7. Vasküler (V)-CAM-1	36
1.3.4. Lökositlerin Damar Dışına Göçü	37
2. AMAÇ ve KAPSAM	40
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	42
3.1. Gereç	42
3.1.1. Cihazlar	42
3.1.2. Laboratuvar Malzemeleri	43
3.1.3. Kimyasal Maddeler	43
3.1.4. Hücre Kültür Solusyonları	44
3.1.5. İmmunositokimyada kullanılan kimyasal madde ve solusyonlar	44
3.1.6. Hazırlanan Çözeltiler ve Medyumlar	45
3.2. Yöntem	46
3.2.1. Endotel Hücrelerin Eldesi	46
3.2.2. Fibronektin Kaplama	48
3.2.3. Endotel Hücrelerin Çözülmesi ve Kültürü	48
3.2.4. Tripsinle Hücre Kaldırma ve Pasajlama	49
3.2.5. Hücrelerin Deneye Alınması	49
3.2.6. Hücrelerin Tesbiti ve Saklanması	50
3.2.7. Hücrelerin Gruplandırılması	51

3.2.8. Hücrelere İmmünohistokimya Uygulanması	51
3.2.9. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	52
4. BULGULAR	54
4.1. Endotel Hücre Kültürüyle İlgili Genel Bulgular	54
4.2. İntersellüler Adezyon Molekülü-1 (ICAM-1) İle İlgili Bulgular	55
4.3. Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1 (VCAM-1) İle İlgili Bulgular	59
5. TARTIŞMA	77
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	87
KAYNAKLAR DİZİNİ	89
ÖZGEÇMİŞ	101



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

HUVEC	: İnsan umbilikal veni endotel hücresi
VEGF	: Vasküler endoteliyal büyüme faktörü
VEGFR	: Vasküler endoteliyal büyüme faktörü reseptörü
ICAM-1	: İntersellüler adezyon molekülü-1
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
TGF	: Dönüştürücü büyüme faktörü
TF	: Doku faktörü
PDECGF	: Trombosit kaynaklı endotel hücresi büyüme faktörü
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
VLDL	: Çok düşük dansiteli lipoprotein
PAF	: Trombosit aktive edici faktör
NO	: Nitrik oksit
PGI ₂	: Prostaglandin-I ₂
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat
ADP	: Adenzin difosfat
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör-alfa
IL	: İnterlökin
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PIGF	: Plasenta büyüme faktörü
N-CAM	: Nöral hücre adezyon molekülü
PE-CAM	: Trombosit-endotel hücre adezyon molekülü
Mad-CAM	: Mukozal adresin hücre adezyon molekülü
APC	: Antijen sunan hücre
IFN- γ	: İnterferon-gama
LFA	: Lenfosit fonksiyon düzenleyen protein
FBS	: Fötal sığır serumu
ECGS	: Endotel Hücre Büyüme İlavesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1.	ICAM-1 grubunda immün pozitif hücrelerin toplam hücreler içindeki oranını gösteren grafik	57
Şekil 4.2.	ICAM-1 grubunda alan başına düşen ortalama immün pozitif hücreleri ve standart sapmalarını gösteren grafik	58
Şekil 4.3.	VCAM-1 grubunda immün pozitif hücrelerin toplam hücreler içindeki oranını gösteren grafik	61
Şekil 4.4.	VCAM-1 grubunda alan başına düşen ortalama immün pozitif hücreleri ve standart sapmalarını gösteren grafik	61
Şekil 4.5.	ICAM-1 kontrol grubu endotel hücrelerinin fotoğrafı x4	62
Şekil 4.6.	ICAM-1 kontrol grubu endotel hücrelerinin fotoğrafı x10	62
Şekil 4.7.	ICAM-1 kontrol grubu endotel hücrelerinin fotoğrafı x20	63
Şekil 4.8.	ICAM-1 kontrol grubu endotel hücrelerinin fotoğrafı x40	63
Şekil 4.9.	ICAM-1 kontrol grubu endotel hücrelerinin fotoğrafı x100	64
Şekil 4.10.	ICAM-1 deney grubu endotel hücrelerinin fotoğrafı x4	64
Şekil 4.11.	ICAM-1 deney grubu endotel hücrelerinin fotoğrafı x10	65
Şekil 4.12.	ICAM-1 deney grubu endotel hücrelerinin fotoğrafı x20	65
Şekil 4.13.	ICAM-1 deney grubu endotel hücrelerinin fotoğrafı x40	66
Şekil 4.14.	ICAM-1 deney grubu endotel hücrelerinin fotoğrafı x100	66
Şekil 4.15.	ICAM-1 primersiz grup endotel hücrelerinin fotoğrafı x4	67

Şekil 4.16.	ICAM-1 primersiz grup endotel hücrelerinin fotoğrafi x10	67
Şekil 4.17.	ICAM-1 primersiz grup endotel hücrelerinin fotoğrafi x20	68
Şekil 4.18.	ICAM-1 primersiz grup endotel hücrelerinin fotoğrafi x40	68
Şekil 4.19.	ICAM-1 primersiz grup endotel hücrelerinin fotoğrafi x100	69
Şekil 4.20.	VCAM-1 kontrol grubu endotel hücrelerinin fotoğrafi x4	69
Şekil 4.21.	VCAM-1 kontrol grubu endotel hücrelerinin fotoğrafi x10	70
Şekil 4.22.	VCAM-1 kontrol grubu endotel hücrelerinin fotoğrafi x20	70
Şekil 4.23.	VCAM-1 kontrol grubu endotel hücrelerinin fotoğrafi x40	71
Şekil 4.24.	VCAM-1 kontrol grubu endotel hücrelerinin fotoğrafi x100	71
Şekil 4.25.	VCAM-1 deney grubu endotel hücrelerinin fotoğrafi x4	72
Şekil 4.26.	VCAM-1 deney grubu endotel hücrelerinin fotoğrafi x10	72
Şekil 4.27.	VCAM-1 deney grubu endotel hücrelerinin fotoğrafi x20	73
Şekil 4.28.	VCAM-1 deney grubu endotel hücrelerinin fotoğrafi x40	73
Şekil 4.29.	VCAM-1 deney grubu endotel hücrelerinin fotoğrafi x100	74
Şekil 4.30.	VCAM-1 primersiz grup endotel hücrelerinin fotoğrafi x4	74
Şekil 4.31.	VCAM-1 primersiz grup endotel hücrelerinin fotoğrafi x10	75

Şekil 4.32. VCAM-1 primersiz grup endotel hücrelerinin fotoğrafi x20	75
Şekil 4.33. VCAM-1 primersiz grup endotel hücrelerinin fotoğrafi x40	76
Şekil 4.34. VCAM-1 primersiz grup endotel hücrelerinin fotoğrafi x100	76



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1.	ICAM-1 grubundaki immün pozitif ve immün negatif hücrelerin toplam yüzde değerleri	57
Çizelge 4.2.	ICAM-1 ve VCAM-1 gruplarında alan başına düşen ortalama hücre sayıları ve standart sapmaları	58
Çizelge 4.3.	VCAM-1 grubundaki immün pozitif ve immün negatif hücrelerin toplam yüzde değerleri	60



1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

Dolaşım sistemi kan ve lenf damarları sisteminden oluşmuştur. Kan damarları sistemi de kalp, arterler, kapillerler ve venlerden oluşur. Kan damarları en küçüğünden büyüğüne kadar üç tabakadan oluşmuştur. Bunlar, en dışta tunika adventisya, ortada tunika media ve en içte de tunika intima'dır. Tunika intima'yı en içte endotel hücreleri döşer (Junqueira et al., 1998).

Kan dolaşımı ilk defa 1628'de William Harvey tarafından tanımlandı. Kısa bir süre sonra da Malpighi, damar ağının varlığını ve kan ile dolaşım arasındaki fiziksel ayırımı yaptı. 1800'lerde von Reckinghausen damarların sadece boş tünellerden ibaret olmadığını, onların içlerinin hücreler tarafından sarıldığını keşfetti. 1953'de Palade'nin elektron mikroskopik ve 1959'da Gowen'ın fizyolojik çalışmaları sonucunda, endotel hücreleri ile kan damarlarının immünolojik, metabolik ve sekreter fonksiyonları tanımlandı (Cines et al., 1998).

1.1. Endotel Hücreleri

Damarların lümenine en yakın bölümünde yer alan ilk tabaka olan tunika intima tabakasında; en içte yassı epitel hücrelerinin oluşturduğu ve endotel hücreleri olarak isimlendirilen tek sıra hücre tabakası, onun altında bu hücrelerin tutunduğu bir bazal lamina ve daha altta ise subendotel tabaka denilen bir gevşek bağ dokusu tabakası yer alır. Endotel hücreleri organizmadaki tüm damarları içten örter ve beslenme maddelerini ve biyolojik olarak farklı aktif moleküller ile kan hücrelerinin akışını düzenler. Endotel hücreleri bu fonksiyonlarını; büyüme faktörleri, koagülan ve antikoagülan faktörleri içeren proteinleri, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) gibi lipid taşıyan partikülleri, nitrik oksit (NO) ve serotonin gibi metabolitleri ve endotelin-1 gibi hormonların dahil olduğu çok sayıda farklı moleküller için var olan membran bağımlı reseptörleri ve yine hücre-hücre veya hücre-matriks ilişkilerini de yöneten özel bağlantı proteinleri sayesinde gerçekleştirir (Cines et al., 1998).

Endotel hücreleri, kendilerinin sentezledikleri bazal lamina üzerine otururlar (Junqueira et al., 1998).

1.1.1. Endotel Hücrelerinin Gelişimi (Vaskülogenezis ve Anjiogenezis)

Damar oluşumu, meydana geliş zamanlarına bağlı olarak iki ana oluşum mekanizmasıyla açıklanır; vaskülogenezis ve anjiogenezis.

1.1.1.1. Vaskülogenezis

Her iki terim de damar oluşumuyla ilgili olmasına rağmen; vaskülogenezis, vasküler sistemin hiç oluşmadığı erken embriyonik dönemde, dokuların ihtiyacı olan kanı sağlayabilmek için oluşan tünellerin endotel hücreleri ile döşenerek ilk vasküler ağı oluşturmasıdır (Cines et al., 1998).

Kardiyovasküler sistem, gastrulasyon safhasındaki embriyoda oluşan ilk sistemdir. Üçüncü haftanın ortasına kadar beslenme gereksinimini yalnızca difüzyonla sağlayan embriyo, bu haftadan sonra yeni bir sisteme ihtiyaç duyar ve bu dönemde insan embriyosunun damar sistemi belirir (Sadler, 1996). Vaskülogenezis, sadece erken embriyonik dönemde oluşur. İmplantasyondan kısa bir süre sonra 3. haftanın başında, vitellus kesesi duvarındaki visseral mezoderm içinde yer alan mezenşimal hücreler arasında kan adacıklarını oluşturacak boşluklar gelişir. Sonra, bu boşluklar birleşerek kanalize olurlar ve ilk kan damarlarını oluştururlar. Böylece ekstraembriyonik kan damarlarının bir kısmı oluşmuş olur. Boşlukların çevresinde bulunan mezenşimal hücrelerin dış tabakasından farklılaşan anjiyoblastlar bu boşlukları örterler. Daha sonra bu anjioblastlar yassılaşılarak, endotel hücrelerine farklılaşırlar. Boşlukların içinde merkezde kalan mezenşimal hücrelerden farklılaşan anjioblastlar ise hematopoietik kök hücrelerine farklılaşırlar. Bunlar daha sonra kan hücrelerini oluştururlar (Risau and Flamme, 1995; Sadler, 1996). Aynı dönemde, bağlantı sapı ve villöz köklerin ekstraembriyonik mezodermi içinde de kapillerler ve kan hücreleri gelişerek, ekstraembriyonik kan damarlarının bir diğer kısmını oluştururlar. İntraembriyonik kan damarlarının oluşması ise; geç presomit embriyonun, yani yaklaşık 19. gündeki embriyonun splanknik mezodermal tabakasında bulunan mezenşimal hücrelerin altındaki endoderm tarafından indüklenmesiyle anjioblastlara farklılaşmasıyla olur. Bu anjioblastlar sefalik yönde dağılılarak ilk kan damarlarını ve daha sonra da kardiyovasküler sistemi oluştururlar.

Böylece, ekstraembriyonik ve intraembriyonik damarlar birbirleriyle temasa geçerler ve embriyo ile plasenta dolaşımını birleştirirler (Sadler, 1996). İlk anjioblastlar, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)'nin de indüklemesiyle, endotel hücrelerine farklılaşarak damarların oluşmasını sağlarlar (Palis et al., 1995). Vasküler gelişimin başlaması için bir takım büyüme faktörlerine ihtiyaç vardır. VEGF ve bazik-fibroblast büyüme faktörü (basic-Fibroblast Growth Factor; b-FGF) bunlardan en etkilileridir. Özellikle VEGF'in veya reseptörlerinin yokluğunda; hem endotel, hem de hematopoitik öncül hücrelerinin farklılaşması gerçekleşemediği için damarlar ve kan hücreleri oluşmamakta ve sonuçta erken embriyonik ölüm görülmektedir (Shalaby et al., 1995; Sato et al., 1995). Bir damarın arter veya vene farklılaşmasının kontrolünde efrin ailesinin üyelerinden efrin- β_2 'nin önemli etkisi bulunmaktadır (Cines et al., 1998). Endokardial ve ventriküler gelişmeyle birlikte; vasküler ağacın yayılması ve gelişmesi, ayrıca vasküler duvarın oluşması ve düzeni için bazı reseptörlere ihtiyaç vardır. Endotel yüzeyinde bulunan ve tirozin kinaz ailesinden olan tie-1 ve tie-2 adı verilen iki reseptör ve bunların ligandları olan angiopoietin ailesinin bazı üyeleri yukarıdaki gelişimleri kontrol eder. Tie-1 reseptörü epidermal büyüme faktörü (EGF) için özgül iken, tie-2 reseptörü anjiopoietin-1 ve anjiopoietin-2 için özgüldür ve bunlar gelişen damarların çevrelerindeki dokular tarafından salgılanırlar (Yancopoulos et al., 2000). Ligand reseptöre bağlandığında, reseptörün intrasellüler kısmındaki tirozinin otofosforilasyonuna sebep olur. Anjiopoietin-1 tie-2 reseptörüne bağlanarak, damar duvarı için gereken perisit ve/veya düz kas hücrelerinin çevre mezenşiminden farklılaşmasını sağlayan büyüme faktörlerinin oluşumunu stimüle eder (Folkman and D'amore, 1996). Anjiopoietin-2 ise Anjiopoietin-1'in antagonisti olarak görev yapar ve reseptöre bağlanarak onun bağlanmasını engeller. Bu sistemdeki bir hata; anormal kalp, zayıflamış ve mikroanevrizmaların bol olduğu bir damar yapısı ile sonuçlanır. Bu iki grup (VEGF ve tie) reseptörün ve ligandlarının sürekli ve düzenli salgılanması ile hem endotel hücre farklılaşması, damar oluşumu ve tüp formasyonunun başlaması; hem de kapiller yatak oluşması ve bunu izleyen dallanma ve damar duvarı oluşumu gerçekleşir (Cines et al., 1998). Damar duvarı gelişirken meydana gelen aşamalardan biri olan kapiller tüp oluşumu, sadece sitokin-reseptör komplekslerinin kontrolünde değildir. Bu kontrole aynı zamanda ekstrasellüler matriks de katılır.

Örneğin, tip-1 kollajen ile kaplanmış bir hücre flaskı içindeki endotel hücrelerine transforming büyüme faktörü (Transforming Growth Factor; TGF- β) verildiğinde, endotel hücreleri çoğalırken, aynı zamanda da tüp formasyonu oluşturdukları görülmüştür (Sankar et al., 1996). Fibronektin sentezi bozuk olan embriyolarda, kalp ve damar sisteminin kötü geliştiği ve erken embriyonik ölümlerin olduğu görülmüştür (Hynes, 1996).

1.1.1.2. Anjiogenezis

Embriyonun büyümesinin ileri aşamalarında, vaskülogenezis ile meydana gelen damarlar embriyonun gereksinimini karşılamaya yetmeyecek ve gerekli olan kan ihtiyacını sağlamak üzere ilk oluşan bu damarlardan yenileri gelişecektir. Var olan ilk damarlardan olan bu genişleme ve çoğalmaya ise anjiogenezis denir.

Anjiogenezis; fetal yaşamda, erişkinliğe ulaşırken, erişkinlerde menstrüel siklusta, yara iyileşmesinde ve tümör büyümesinde gözlenir (Ganong, 1999). Vaskülogeneziste olduğu gibi anjiogeneziste de VEGF, anjiopietin-1, anjiopietin-2 ve efrin- β_2 gibi büyüme faktörleri etkindir. VEGF ile damar oluşumu başlamakta, ama gevşek ve immatür olan bu damarlar, angiopietinler ile olgunlaşmalarını tamamlayarak sağlam ve herhangi bir etkiyle kolay bozulmayan bir yapı kazanırlar. Ayrıca efrin- β_2 damarların arter veya ven oluşumuna yönelmelerini belirler (Yancopoulos et al., 2000).

Anjiogenezis, sağlıklı ergin erkeklerde minimal düzeydeyken, dişilerin menstrüel sikluslarında oldukça fazla gözlenir. Ovarian folliküllerin VEGF ekspresyonu ve neovaskülarizasyon ovulasyondan hemen önce artarken, korpus luteum ovulasyondan kısa bir süre sonra VEGF sentezine başlar (Thomas, 1996). VEGF, erken implantasyon boyunca, implante olmuş embriyonal trofoblastlarca salgılanır.

Fibroblast büyüme faktörü, transforming büyüme faktörü- α ve β (TGF- α ve β), tümör büyüme faktörü- α , doku faktörü (TF), faktör V, anjiogenin, trombosit kaynaklı endotel hücresi büyüme faktörü (platelet-derived endothelial cell growth factor; PDEC GF) ve VEGF anjiogenezisi arttırırken; trombospondin-1, trombosit

faktörü-4 ve anjiostatin ise anjiogenezisi inhibe etmektedir (Ganong, 1999). Damar oluşumunda en kritik rolü VEGF oynar. Çünkü, hem gelişimdeki vaskülogenezis ve anjiogeneziste, hem de yetişkindeki anjiogeneziste son derecede önemli ve gereklidir (Yancopoulos et al., 2000). Tümör anjiogenezisinde; tümörler ev sahibi damarları kullanmak isterler. Büyüyen tümörü durdurmak isteyen organizma savunma olarak otokrin bir mekanizmayla anjiopietin-2 salgılar. Bu faktör, tümörün kullandığı damarların stabilizasyonunu engelleyerek, onu besleyen damarların kolayca bozulabilmesine ve kırılmasına yol açar. Sonra da apoptozisi uyararak damarların ortadan kalkmasını sağlar. Sonuçta tümör avasküler ve hipoksik olur. Ancak, bazı tümörler VEGF salgılayarak anjiogenezisi başarılı ve güçlü bir şekilde indükler ve yeni damarlar oluştururlar. Kendi VEGF'ünü salgılayan bu tümörler, organizma tarafından tümörü yok etme amacıyla küçültülen ve bozulan damarlarda yeniden angiogenezisi canlandırır. Sonuç olarak tümörler kendini besleyen bu damarların küçülmesini durdurup yeniden büyümesine sebep olarak beslenmelerini temin ederler. Ancak organizmanın anjiopietin salgılamasını durduramadığı için, sürekli olarak salınan anjiopietin de bu olaya katılarak yeniden oluşan bu damarların kolayca bozulabilmesine ve kırılmasına neden olur. Sonuç olarak bu bölgede kolayca kanayan, iyi olgunlaşmamış damarlanmaya sebep olurlar. Bu nedenle tümörlerin bulunduğu bölgede sık sık kanamalar görülür (Yancopoulos et al., 2000).

1.1.2. Endotel Hücrelerinin Yapısı

Endotel hücreleri damarlarda 10-15 μm eninde, 25-50 μm boyunda ve uzun eksenleri lümen etrafına dizilmiş şekildedir. Hücre çekirdeğinin merkezde olması ve şişkin olması dolayısıyla, merkezi bölgenin lümeneye doğru çıkıntı yaptığı gözlenir. Kenarlarda ise çekirdeğin yaptığı şişkinlik kaybolur ve kalınlığı 0,2 μm 'a kadar iner. Sitoplazmasında bir çekirdek, kutuplarında küçük bir Golgi kompleksi, az miktarda granüllü endoplazma retikulumu sisternası, mitokondri ve ribozom vardır. Ayrıca, sitoplazmada içinde su, makromolekül ve elektrolit içeren transport vezikülleri de bulunur. Çekirdek çevresindeki bölgede bol miktarda mikrofilaman vardır. Bunlar içerikleri bakımından çeşitli varyasyonlar gösterir. Bir kısmı desminden oluşurken,

bir kısmı da vimentin içerir. Bazıları ise her ikisini de içerirler (Gartner and Hiatt, 2001). Ayrıca sitoplazmalarında Weibel-Palade granülleri adı verilen, membranla çevrili granüller vardır. Bu granüller 0,1 μm eninde ve 0,3 μm boyunda olup, içlerinde kanın pıhtılaşmasına yardımcı maddelerden biri olan von Willebrand Faktör (faktör VIII) içerirler. Bu faktör endotel hücrelerine özgüdür (Junqueira et al., 1998).

Endotel hücreleri yetişkin bir insanda yaklaşık olarak $1-6 \times 10^{13}$ sayıda, 1 kg ağırlığında ve yine yaklaşık olarak 1-7 m^2 'lik bir alanı örtecek boyutlardadır (Augustin et al., 1994). Endotel hücrelerde gap junctionlar bulunur. Bunlar hücreler arasındaki haberleşme ve madde alışverişinden sorumludurlar (Junqueira et al., 1998).

Endotel hücreleri yapı ve fonksiyon bakımından buldukları yere göre değişik özellikler gösterir. Bu hücreler; sinir dokuları, ekzokrin bezler, bağ dokuları ve kas dokularında sıkı bağlantılarla bağlıdır. Sadece pinositotik veziküllerle kontrollü ve az geçiş sağlarlar. Endotel hücrelerinin oluşturdukları bu kapillerlere sürekli kapillerler denir. Özellikle beyinde ve retinada bu veziküller yok denecek kadar azdır ve kan-beyin ve kan-göz bariyerlerini oluşturur. Bir diğer kapiller tipi pencere kapillerlerdir. Bunları oluşturan endotel hücreleri de 60-80 nm boyunda pencereler içerir. Bu pencereler hücre membranından daha ince bir diafram ile örtülüdür. Amacı ise etkin ve verimli bir emilim, sekresyon ve filtre gereken seçici geçirgenliktir. Bunlar ince barsak villusları, böbrek ve endokrin bezler gibi kanla doku arasında hızlı madde alışverişi olan yerlerde görülürler. Bir de aralıklı kapillerleri oluşturan endotel hücreleri vardır ki, bunların duvarında diafram içermeyen aralıklar vardır. Bu kapillerler karaciğer, dalak ve kemik iliği gibi hematopoietik organlarda görülür (Dejana, 1996; Junqueira et al., 1998).

Farklı dokuların endotel hücreleri, protein ekspresyonu ve yüzey fenotipi açısından birbirlerinden farklıdır. Genellikle endotel hücre belirteci olarak kullanılan von Willebrand Faktör (Faktör VIII) tüm damar tiplerindeki endotel hücrelerince salgılanmalarına rağmen, bu salgılanma üniform değildir (Kumar et al., 1987; Levin and Osborn, 1997). Beyin, karaciğer ve diğer organlardan kültüre edilen mikrovasküler endotel hücreler; farklı hücre yüzey belirteçleri, farklı protein taşıyıcıları ve farklı intrasellüler enzimler salgırlar. Bu, dokuya özgü fenotipik farklılıklar, aynı doku kültür koşulları altında aynı sürelerde korunabilirler. Endotel

hücreleri aynı organda bile farklılıklar gösterebilir. Örneğin; karaciğerde iki farklı sinüzoidal endotel hücresi olan hepatik periportal endotel hücreleri trombosit-endotel hücre adezyon molekülü (Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1) ve CD34 salgılayan, sinüzoidal intrahepatik endotel hücreleri bunları salgılamamaktadır (Morin et al., 1984).

Endotel hücrelerinin fenotipine etki eden faktörler arasında mekanik güçler; suda eriyebilen büyüme uyarıcılar ve inhibitörler; sitokinler; trombin, plazmin ve antikorlar gibi plazma proteinleri; perisit ve düz kas hücreleri gibi doku hücreleri, dolaşımdaki hücreler, ekstrasellüler matriks, mikroorganizmalar ve bunların suda eriyebilen ürünleri vardır. Örneğin; aortik endotel hücreler, akciğer kaynaklı ekstrasellüler matriks üzerine kültüre edildiklerinde adezyon molekülü sentezlerken (Zhu et al., 1991), böbrek kaynaklı matriks üzerine kültüre edildiklerinde fenestra geliştirmektedirler (Milici et al., 1985).

1.1.3. Endotel hücrelerinin salgı ve fonksiyonları

Endotel hücrelerinin fonksiyonları ile ilgili detaylı çalışmalar, *in vitro* endotel hücresi kültür tekniklerinin 1970'lerde gelişmesiyle mümkün olmuştur (Jaffe et al., 1973). Kan ve damar duvarı arasında bulunan endotel hücrelerinin birçok önemli fonksiyonu vardır. Kan akışının ve damar tonusunun düzenlenmesi, koagülasyonun düzenlenmesi, inflamasyonda lökosit adezyonunun sağlanması, damar düz kası hücrelerinin gelişiminin düzenlenmesi bunlardan sadece bir kaçıdır (Moini, 1997).

Endotel hücreleri seçici bir bariyerdir. Küçük moleküllerin, sıvıların ve çözünmüş maddelerin kontrollü olarak pinositotik vesiküller içinde dokulara geçmesinde seçici geçirgen bir bariyer olarak görev alır. Daha büyük partiküllerin geçişi ise fenestralar vasıtasıyla olmaktadır. Yine LDL, kolesterol ve transferin gibi bazı moleküllerin geçişi ise reseptör aracılı endositoz ile gerçekleşmektedir (Ross et al., 2003).

Sağlıklı ve devamlılığı bozulmamış bir endotel tabakası; damar düzenleyici, lökosit ve trombosit adezyonunu önleyen antikoagülan bir yüzey oluşturur (Meredith et al., 1993). Endotel hücrelerinin can alıcı fonksiyonu trombosit yapışmasını ve pıhtılaşmayı önleyen antitrombotik bir yüzey sağlayarak kan akımını

kolaylaştırmaktır. Ancak, fiziksel güçler ve bazı özel kimyasal faktörler ile bu yüzey pıhtı oluşmasına hazır (protrombotik) hale gelir. Pıhtı oluşmasını engelleyici bariyer görevi için trombomodülin adı verilen bir antikoagülan salgılar. Endotel hücreleri; prostaglandin- I₂ (PGI₂), doku plazminojen aktivatörü gibi antitrombojenik ajanlar salgılar (Ross et al., 2003). Yaralanmada ise sitoplazmasında bulunan Weibel-Palade granülleri içindeki von Willebrand faktör ve plazminojen aktivatör inhibitörü salgılayarak trombin oluşumuna katkıda bulunurlar. Öncü pıhtılaştırıcı (prokoagülant) aktivitenin bir sonucu olarak oluşan fibrin tıkaç; travma, enfeksiyon ve inflamasyon ile başlayan vasküler yaralanmalarda yaralanan damarı sınırlayıp kapatarak, dokuları ve organları koruyucu bir fonksiyon yapar. Buna rağmen; pıhtılaşmayı engelleyici (antikoagülant) aktivitenin kaybı, bunları izleyen dönemlerde genel trombotik bozukluklara hazırlayıcı bir rol oynayabilir (Cines et al. 1998).

Endotel hücreleri; sadece dolaşım ve çevre dokular arasında yapısal bir bariyer değildir. Aynı zamanda kan akımı değişikliklerine, gerilmeye, dolaşımdaki çeşitli maddelere ve inflamasyon mediatörlerine yanıt olarak çeşitli maddeler salgılayarak kan akımını düzenlerler. Vazodilatatör olarak PGI₂ ve NO, vazokonstriktör olarak endotelin-1, trombosit aktive edici faktör (platelet activating factor-PAF) salgılar (Ganong, 1999).

PGI₂, araşidonik asitten siklooksijenaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla oluşur. Bir yandan trombosit agregasyonunu ve birikmesini inhibe ederken, diğer yandan damar duvarını gevşetir (Ganong, 1999). Özellikle damar içi basıncın arttığı durumlarda parakrin olarak sürekli değil ama, uyarıldıkça salınır.

NO, endotel hücrelerinin de aralarında bulunduğu birçok hücrede nitrik oksit sentetaz yardımıyla L-arjininden sentezlenir. NO, güçlü bir vazodilatatördür. Bundan başka, damarların temel tonusunu korur, lökosit yapışmasını engeller, trombosit yapışmasını, aktivasyonunu, sekresyonunu ve kümelenmesini engellerken trombositlerin dağılmasını sağlar, düz kas hücrelerinin göçü ve çoğalmasını engeller. Parakrin olarak ve sürekli salgılanır. Bu salgılanma trombin, ADP, bradikinin, substans P, muskarinik agonistler ve yoksunluk stresi ile olur (Cines et al. 1998).

Endotelin-1, başta endotel hücreleri olmak üzere nöronlar, astrositler, hepatositler tarafından salgılanan ve şu ana kadar bilinen en kuvvetli endojen

vazokonstriktör maddedir (Epstein and Levin, 1995; Ganong, 1999). Ayrıca kalpte, kalp kasının kasılma gücünü artırıcı (pozitif inotropik) ve kalbin ritmini artırıcı (pozitif kronotropik), akciğerlerde bronkokonstriksiyon yapıcı, böbrekte glomerül süzme hızını artırıcı, düz kas ve diğer birçok hücrede promototik etkileri vardır (Aromorai et al., 1992; Ganong, 1999). Ancak, endotel hücreleri yaptıkları Endotelin-1'i depo edemezler, hipoksi ve iskemi gibi uyarılar karşısında sentez ve salgılanmasını sağlarlar (Nakamura et al., 1990).

Endotel hücrelerinin yaptığı ve salgıladığı PAF vazokonstriksiyon yapmasının yanı sıra, endotel hücre yüzeyine lökositlerin yapışmasını artırır. PAF, şok ve diğer *in vivo* patolojik durumlarda, TNF- α ve lökotrienler gibi diğer mediatörlerle birlikte veya onlardan sonra salgılanır (Whatley et al., 1996).

Endotel hücreleri, immün cevabın düzenlenmesinde de rol alırlar. Sentezleyerek hücre membranına salgıladıkları adezyon molekülleri ile lökositlerin damar dışına çıkarak göçünü sağlamanın yanı sıra; IL-1, IL-6 ve IL-8 sitokinler ve MHC molekülleri sentezleyerek immün fonksiyonların düzenlenmesinde de rol alırlar (Forstermann et al., 1988; Ganong, 1999; Ross et al., 2003).

Ayrıca, endotel hücreleri LDL ve çok az dansiteli lipoprotein (very low density lipoprotein, VLDL) gibi lipoproteinleri okside ederek serbest radikal oluşumunu tetikler ve bu yolla aterosklerozise neden olurlar.

Endotel hücreleri kendi bazal laminalarını oluşturmak için tip II, tip IV ve tip V kollajen; fibronektin, laminin ve proteoglikanlar sentezler (Gartner and Hiatt, 2001; Ross et al., 2003).

Endotel hücreleri ayrıca, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör, granülosit koloni uyarıcı faktör, makrofaj koloni uyarıcı faktör, fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi büyüme faktörleri ve heparin salgırlarlar.

Yakın zamanlara kadar endotel hücrelerinin VEGF'e cevap verdikleri ancak kendilerinin sentezleyemedikleri düşünülmesine rağmen, bazı endotel hücrelerinin ölçülmesi son derece güç olacak kadar az miktarlarda sürekli ve/veya bazı özel durumlarda VEGF sentezleyebildikleri belirtilmiştir. Örneğin, beyin ve retina kapillerlerinden köken alan endotel hücrelerinin VEGF salgıladıkları ve salgıladıkları VEGF'e cevap verdikleri görülmüştür. Hatta aynı anda dışarıdan

verilen VEGF'e de cevap verebildikleri ve bu olayın kan-beyin bariyerindeki fenestraların korunması ve devamında önemli olduğu rapor edilmiştir (Ortega et al., 1998).

Endotel hücreleri, uzayan ve filizlenen damarlarda benzer hücrelerle kontakt kurması gereken hücrelerdir. Bu kontakt hücre-hücre adezyonları ile olur. Adezyonda rol alan moleküller de immünoglobülin süper ailesinden PECAM-1 ve vasküler endoteliyal kaderin (VE-kadherin)'dir. Her ikisi de endotel hücrelerince sentezlenirler.

Endotel hücreleri, vasküler gelişimde ekstrasellüler matrikste ilerleyebilen hücrelerdir. Bu ilerleme, integrinin aracılık ettiği hücre-matriks adezyon kompleksleri sonucu gerçekleşmektedir. (Cines et al., 1998).

1.1.4. Endotel hücreleri ile kan hücreleri arasındaki ilişki

Kan pıhtılaşmasında önemli rollere sahip olan endotel, aynı zamanda dolaşımdaki kan hücrelerinin trafiğini düzenleyen hücre yüzey moleküllerini de sentezler. Bu moleküller inflamasyon gibi normal olmayan durumlarda daha fazla olmak üzere, lökosit gibi bazı kan hücrelerinin migrasyonuna yardım eder. Kan içinde akan lökosit ve trombositler; enfeksiyon ve doku yaralanmalarına cevap olarak ve oluşan tümör hücrelerinin tanınıp yok edilmesi için endotel hücrelerine yapışırlar. Bu etkileşim, fizyolojik inflamasyonun ve kanamanın durdurulması için ilk adımlardır. Trombosit ve lökositler endotel hücrelerle damar yüzeyi boyunca etkileşirler. Bu etkileşimde, önce endotel hücre ve lökosit yüzeyindeki selektinlerle genellikle sağlam olmayan bir bağlantı oluşur (tethering). Sonra, hem endotel hücresi, hem de lökositler aktive olur ve selektinlerin yapımı artarken, kemokinler ve PAF sentezi gerçekleşir ve hücre dışına verilir. Ayrıca selektinlerin dışında adezyon moleküllerinden ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 ve mukozal-adressin hücre adezyon molekülü-1 (MadCAM-1) sentezi olur ve hücre yüzeyine verilirler. Daha sonra lökositler, bu adezyon moleküllerinin yardımıyla endotel hücresi boyunca yuvarlanırlar (rolling) ve güçlü bağlanma aktive olur. Sonunda; ICAM-1, VCAM-1 ve PECAM-1 ile migrasyon ve kemotaksis gerçekleşir. Lökositler sıklıkla postkapiller ventüllerden çıkarlar (Cines et al., 1998).

Trombositler, kanama sırasında endotel hücrelerinin ölmesi ve dökülmesi ile altından açığa çıkan tunika intimanın subendotelial tabakadaki ekstrasellüler komponentleriyle karşı karşıya gelir ve hemen aktive olurlar. Bunun sonucunda, ekstrinsik ve intrinsik yollarla oluşan trombin, fibrinojenin fibrine dönüşümünü sağlar ve bu da trombositleri sıkıca birleştirerek sağlam hemostatik tıkaçı oluşturur (Ganong, 1999; Cines et al., 1998).

1.2. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF)

Bu çalışmada kullanılan VEGF multifonksiyonel bir büyüme faktörü olup, bir çok etkisinin yanında, özellikle vasküler endotel hücreleri için özgül etkilere sahiptir. VEGF; embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör büyümesi, miyokardial iskemi, oküler neovasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıkları da kapsayan bir dizi fizyolojik ve fizyopatolojik olaylardaki kan damarı oluşumundaki (anjiogenezis ve vaskülogenezis) rolü yüzünden yoğun ilgi odağıdır (Zachary, 1998).

1.2.1 Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünün Tarihçesi

Dolaşım sistemi, vücuttaki tüm dokulara besin ve oksijen sağlanması, metabolik artık ürünlerin uzaklaştırılması ve immün yetenek kazanmış lökositlerin gelmesi için gerekli bir sistemdir. Anjiogenezis; vasküler sistem gelişimi için gerekli olan yeni kapillerlerin ortaya çıkmasıdır. Sonuç olarak büyüme ve/veya gelişme sağlanır. Anjiogenik proteinler, FGF ailesinden birkaçını kapsar ki bunlar, 1980'lerde saflaştırılmış ve tanımlanmışlardır. Bunlar yalnızca vasküler endotel hücreler için değil, aynı zamanda diğer hücre çeşitleri, doku büyümesi ve tamirinin düzenlenmesinin bir parçası olan anjiogenezisi düzenleyen mitojenik ajanlar olarak bulunmuşlardır. VEGF ilk keşfedildiğinde, kobay derisinde bir vasküler sızıntı başlattığı için vasküler permeabilite faktörü olarak isimlendirilmişti (Ferrara, 2001). 1980'lerin sonunda, bu aileden ilk özel anjiogenik büyüme faktörü ayrıştırıldı ve

buna vaskülotropin veya vasküler endotelial büyüme faktörü adı verildi (Thomas, 1996).

Vasküler gelişimin başlangıcında ve daha sonraki dönemlerde meydana gelecek anjiogenezde; endotel hücreleri, çoğalabilmek için veya adezyon molekülleri sentezleyebilmek için bir takım büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. VEGF bu büyüme faktörlerinin başında gelir. Ve aynı zamanda endotele özgüdür (Shalaby et al., 1995). Damar oluşumunda en kritik rolü VEGF oynamaktadır. Çünkü hem gelişimde hem de yetişkinde vaskülogenezis ve anjiogeneziste önemli ve gereklidir (Yancopoulos et al., 2000).

1.2.2. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünün Yapısı

Son 10 yıl içinde VEGF ailesinin üzerine yapılan çalışmalar, bu ailenin VEGF-A (Human-VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Placenta büyüme faktörü (Placenta growth factor; PlGF) adı verilen üyelerden meydana geldiği gösterilmiştir (Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Ortega et al., 1998). Bu 5 gen, kendi sinyal peptitlerinin bölünmesinden sonra sekrete edilen glikozillenmiş dimerlerden oluşur. VEGF'ün cDNA dizileri salgı aktivitesini düzenleyen hidrofobik ve sekretuar bir baş olan N-terminal dizilerinde şifrelenmiştir (Thomas, 1996).

VEGF-A'nın geni, kromozom 6p21.3'teki lokalizasyonda kodlanmıştır. Şu ana kadar bilinen altı adet izoformu vardır. Bu izoformlar, 8 ekson içeren tek bir genden oluşur. Bunlar VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆ olarak isimlendirilmişlerdir ve isimlerindeki sayılar içerdikleri amino asit sayılarını göstermektedir (Zachary, 1998; Ferrara and Davis-Smyth, 1997). Benzer yapıdaki VEGF izoformları, dimerik proteinler olarak yapılır ve glikozillenir. Bu izoformlardan VEGF₁₂₁ hariç, hepsi heparine bağlanır. Tüm izoformlar bir sinyal dizisine sahiptir ve bu dizilerle bağlanarak sinyal oluştururlar. Bu izoformlardan VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅ ve VEGF₁₆₅ salgılandığında kolayca diffüze olur ve erimiş formları saptanabilir. VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆ izoformları ise salgılandığı halde hücre aracılı olarak kalır ve bazı testlerle varlıkları kolayca saptanamaz. (Zachary, 1998). VEGF₂₀₆, VEGF'ün orijinal karakteristik formu olup yaklaşık 34-46 kDa ağırlığında homodimerik bir glikoproteindir. Amino asit dizilişi PDGF-A ve PDGF-B ile %20

oranında aynıdır. VEGF alt ünite amino asit dizileri 3 adet disülfit bağı içerir ve ayrıca alt ünitelerde birbirlerine 2'şer disülfit bağıyla bağlanmıştır. (Thomas, 1996; Zachary, 1998).

VEGF-A geni, eksonları kodlayan 8 polipeptidten oluşur. Proteinin bu kısa formu 1, 2, 3, 4, 5 ve 8. eksonlar tarafından kodlanır. Exon 7 tarafından kodlanan katyonik polipeptid dizisinin katılımı, 165 amino asitli formu meydana getirir. Bu form VEGF₁₂₁'in aksine hücre yüzeyindeki veya ekstrasellüler matriksteki proteoglikanlara ve heparine bağlanan formdur. Exon 6 tarafından kodlanan çok katyonik 24 amino asitli dizisi VEGF₁₈₉'un endojen polianyonlara daha sıkı bağlanmasını sağlar. Heparin'e ve heparan sülfat proteoglikanına bağlanmayı tetikler ve artırır. VEGF'ün heparan sülfat proteoglikanlarını bağlayan formları heparinaz ve plazmin yardımıyla hücre yüzeyleri ve ekstrasellüler matriksten kurtarılır (Thomas, 1996).

VEGF-B, başlangıçta VEGF-A ile %23'ü homolog olan bir sinyal peptidinin bölünmesinden sonra, 186 amino asitli bir protein olarak oluşur. Sonra, ekson-6'da oluşan bir alternatif splicing ile tamamen farklı terminal COOH- grupları içeren 167 amino asitli bir proteine dönüşür (Ortega et al., 1998). VEGF-B, vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-1 (VEGFR-1)'e bağlanarak monosit aktivasyonu ve farklılaşmasında rol alır (Clauss, 2000).

VEGF-C, VEGF-benzeri protein olarak da bilinir. VEGF-A ile %16'sı benzer 388 amino asitten oluşmuştur (Ortega et al., 1998). Lenfanjiogenezde rol oynamaktadır. VEGFR-2 ve 3'e bağlanarak vasküler ve lenfatik endotelial hücrelerde mitojenik etki yapar (Clauss, 2000). Yapılan bir deneyde, transjenik farelerin derisinde VEGF-C'nin fazla salgılanmasının endotel hücre proliferasyonuna ve lenfatik damarlarda genişlemeye neden olduğu, bununla beraber vasküler doku oluşmadığı rapor edilmiştir (Jeltsch et al., 1997). VEGF-C'nin Kaposi sarkomunda önemli oranda rol aldığı da bildirilmiştir (Detmar, 2000-a).

VEGF-D, 334 amino asitten oluşan ve VEGF-A'ya %31 oranında benzeyen amino asitler içeren bir proteindir (Achen and Stacker, 1998). C- terminal uçlarında zengin sistein domainleri içerir. VEGFR-2 ve 3'e bağlanarak etki eder. (Ortega et al., 1998). VEGF-C ile benzer etkilere sahiptir (Clauss, 2000).

VEGF-E, güçlü bir mitojen ve permeabilite artırıcı faktördür. VEGFR-2'ye seçici olarak bağlanarak etki eden, uzunluk olarak VEGF₁₆₅'e benzeyen ama VEGFR-1'e bağlanmayı başaramayan bir büyüme faktörüdür. İlk olarak koyun, keçi ve bazen de insanları etkileyen bir parapoxvirüs olan orf virusu genomunda, önceden tanımlanmış bir gen ile kodlanan ve memeli VEGF'ü ile amino asit dizilimi %25 aynı olan bir polipeptittir. VEGFR-2'ye bağlanarak etki eder (Clauss, 2000).

PIGF, VEGF ailesinin tanımlanan ilk üyesidir. Sinyal peptitlerinin bölünmesi sırasında önce 131 amino asite sahiptir. Daha sonra yeni aminoasitlerin eklenmesiyle VEGF-A ile %37 oranında benzeşen ve 152 amino asit içeren son şekli oluşur (Ortega et al., 1998). VEGF-B gibi VEGFR-1'e bağlanarak etki gösterir (Clauss, 2000).

1.2.3. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünün Vücutta Dağılımı

Anjiogenezis; sağlıklı ergin erkeklerde daha az gerçekleşirken, dişilerin menstrüel sikluslarında önemli miktarlarda oluştuğu görülür. Ovaryum folliküllerinin VEGF salgılaması ve ovulasyondan hemen önce yeni damarların oluşumu artarken, ovulasyondan sonra bu görevi kısmen korpus luteum üstlenir. VEGF erken implantasyon döneminde bu dönem boyunca implante olan embriyo trofoblastlarınınca salgılanır (Thomas, 1996). Embriyolojik gelişimin ilk dönemlerinin sonuna doğru VEGF biraz azalırken, organogenezis döneminde oldukça yükselir. Bundan başka VEGF mRNA'sı; yetişkinde akciğer alveolar hücrelerde, böbrek glomerüllerinde, proksimal tübüllerde ve düşük seviyede de olsa karaciğer hepatositleri ve beyinde gösterilmiştir (Monacci et al., 1993). Ayrıca, adrenal korteksin tüm hücrelerinde ve testiste testosteron üreten Leydig hücrelerinde VEGF mRNA'sının sentezlendiği gösterilmiştir. VEGF'ün demonstrasyonu için immunositokimyasal çalışmalar yapılmış ve aktive makrofajlarda, arteriollerini çevreleyen fibroblastlarda, bronşiyal ve koroid pleksus epitelinde, renal glomerül visseral epitelinde varlığı gösterilmiştir (Thomas, 1996).

VEGF mRNA transkripsiyonu çeşitli faktörler tarafından başlatılır. Bunlardan birkaçı; trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB (PDGF-BB), keratinosit büyüme faktörü (FGF-7), epidermal büyüme faktörü (EGF), tümör nekrosis faktör- α (TNF-

α), transforming büyüme faktörü- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) ve interlökin- $\beta 1$ 'dir. Bu faktörler endotel hücre kültürü çalışmaları ile gösterilmişlerdir. Bu maddelerin hiçbirisinin mitojenik olmadığı, ancak VEGF salgılanmasına yol açarak mitojeniteyi arttırdıkları gösterilmiştir (Thomas, 1996).

Ayrıca protein büyüme faktörlerinin haricinde, bazı küçük mediatörlerin de VEGF ekspresyonunu düzenledikleri görülmüştür. Örneğin; Forbol esterlerinin insan keratinositlerinin sentezledikleri VEGF seviyelerini 5 kat arttırdıkları belirtilmiştir. Prostaglandin E_2 'nin (PGE_2), osteoblastlardaki VEGF mRNA'sını arttırdığı da gösterilmiştir (Harada et al., 1994).

Hipoksi, belki de, anjiogenezisi başlatan en etkili stimuluslardan biridir. Düşük oksijen seviyesi, VEGF ve onun reseptörlerinin yapımını indükler. Aynı olay tümörlerin beslenemeyen hipoksik merkezlerinde de olmakta ve VEGF'ün aynı şekilde ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır. Yine tıkanmış kalp damarlarına bağlı gelişen hipoksi sonrasında da VEGF ekspresyonu artmaktadır. Hipoksinin VEGF'ü artırma mekanizmasının sadece bir kısmı çözülebilmıştır. VEGF yapımı hipoksi tarafından tetiklenirken, CO tarafından da inhibe edilmektedir (Shweiki et al., 1992).

1.2.4. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörünün Etkileri

VEGF, vasküler sistem boyunca dizilmiş endotel hücreleri için bilinen en özgül mitojendir (Ferrara and Davis-Smyth, 1997).

Ayrıca, vasküler endotel hücrelerin non-mitojenik cevaplarından olan kemotaktik olaylara (Thomas, 1996) ve dokular içine doğru ilerleyecek kapillerlerin penetrasyonuna yardımcı olan kollajenaz ve plazminojen aktivatörlerinin ekspresyonuna yardımcı olur (Ferrara and Davis-Smyth, 1997).

VEGF'ün intradermal tek bir enjeksiyonu 5 dakika içerisinde vasküler bir sızıntı başlatır ve 15-20 dakika sonra da sona erer. Bunun aksine, VEGF'ün sürekli endojen parakrin ekspresyonu ise, ekspresyonun olduğu yere komşu pencereci endoteliumda (böbrekte ve beyin koroid pleksustaki gibi) sürekli bir vasküler permeabilite artışına sebep olabilir. Ancak, ne VEGF'ün intravasküler enjeksiyonu, ne de sağlam bir kan-beyin bariyeri içeren serebellar granül hücre tabakası gibi vaskülarize nöral dokularda eksprese olan VEGF, vasküler sızıntıya neden olmaz. Bu

da göstermektedir ki VEGF'ün indüklediği vasküler sızıntıyı henüz bilinmeyen başka maddeler de kontrol etmektedir (Monacci et al., 1993).

VEGF, *in vivo* modellerde belirgin anjiogenik cevabın çeşitliliğini sağlar. Bu faktörün geri çekilmesi halinde vaskülarizasyonun gerilediği gözlenmiştir (Ferrara, 2001). Kemirgenlerin dermal yaralanmalarında, normal doku tamirinin ayrılmaz bir parçası olan anjiogenezis, yaralanmadan hemen sonra yüzeyel epidermal keratinositler tarafından salgılanan VEGF tarafından indüklenir. Buna rağmen iyileşmenin bozulduğu diabetik kemirgenlerde, yeni damar oluşumu oldukça düşük seviyelerdedir. Eksojen VEGF, yeni damar oluşumunu indükler, iskemik tavşan ekstremitelerinde perfüzyonu artırır ve domuz koroner arterlerinde azalmış kan akımına cevap olarak yine kan perfüzyonunu artırır (Shweiki et al., 1992).

Bunun yanında, yükselmiş VEGF ekspresyonu bazı hastalıkların ilerlemesine sebep olabilir. Örneğin; devamlı büyüyen solid tümörlerin anjiogenezise bağımlı oldukları, bu yüzden bu tümör hücrelerinde VEGF'e ait mRNA'ların arttığı ve tümöre komşu endotel hücrelerinde de VEGF reseptörlerine ait mRNA'larının arttığı gösterilmiştir. Anti-VEGF antikorları canlı farelerde insan tümörlerinin büyümesini ve vaskülarizasyonu inhibe etmesine rağmen, hücre kültüründe tümör hücrelerinin büyümesini durduramamıştır. Bu yüzden de VEGF ekspresyonu ile oluşan tümör büyümesinin anjiogenezisin parakrin olarak stimülasyonunun bir sonucu olduğu ortaya çıkmaktadır. VEGF, patolojik neoanjiogenezis olarak adlandırılan bazı oküler hastalıklarda, retina yakınında veya içinde oluşan yeni damarların sebebidir. Yine, yükselmiş VEGF ekspresyonu, tipik olarak artmış anjiogenezisle karakterli bazı inflamatuvar durumlarda görülür. Romatoid artritte sinovial dokularda yüksek seviyede VEGF mRNA'sı görülür. Psöriaziste ve kontakt dermatitte, deride VEGF ve reseptörlerine ait mRNA'ların arttığı rapor edilmiştir (Thomas, 1996).

VEGF'in fonksiyonlarından bir diğeri de; NO salınımını ve NO aracılı vazodilatasyonu uyarmasıdır. Bu da hipotansif bir etki yaratır. Ayrıca von-Willebrand faktörün salgılanmasını indükler ve PGI₂ üretimini uyarır. Monosit kemotaksisini de sağlar. Yine araziidonik asit salınımını ve MAP-kinaz bağımlı sitozolik fosfolipaz A₂ aktivasyonunu sağlarlar (Zachary, 1998).

VEGF'ün anjiogenik etkileri, bazı hastalık durumlarında klinik olarak faydalı olabilir. Balon anjioplastiyi takiben arterlerde yeni intima tabakası oluşumunun

baskılanmasına ve endotel rejenerasyonuna öncülük eder. Ayrıca, miyokardial ve periferik uzuv iskemilerinde kollateral damar oluşumuna öncülük eder (Asahara et al., 1996).

VEGF'ün anjiogenik etkileri yanında, endotelial hücrelerin migrasyon aktivitesini uyarır. İnflamasyonda da önemli rol alan VEGF, vasküler permeabiliteyi arttırmada histamin, bradikinin, lökotrien-B₄, C₄ ve E₄'den daha etkilidir. Bu da inflamasyonu hızlandırmakta ve inflamasyon cevabının artmasına yol açmaktadır. İnflamasyonun geç dönemlerinde etkili olan monositler için güçlü bir kemotaksindir. Ayrıca, monosit-makrofaj kökenli sitokinlerle birlikte endotelial doku faktörünün artışı sağlayarak, koagülasyonun major komponentleri arasına da girer. Bunun yanı sıra, koloni uyarıcı madde stimüle ederek granülosit-makrofaj progenitör hücrelerin koloni oluşturmasını sağlar (Ferrara and Davis-Smyth, 1997).

Bazı çalışmalarda, VEGF'in inflame dermiste lökositlerin toplanmasına yardım ettiği ve bu etkisini ICAM-1 ve VCAM-1 gibi özgül adezyon moleküllerinin salgılanması ile yaptığı gösterilmiştir. Bu salgılanmanın doğal öldürücü (natural-killer; NK) hücrelerin endotel hücrelerine adezyonunu aktive ettiği söylenmektedir (Melder et al., 1996; Ferrara and Davis-Smyth, 1997).

Yapılan son çalışmalarda, VEGF'ün endotel hücrelerinin yaptığı adezyon molekülleri sentezini arttırdığı görülmüştür (Kikuchi, 2000; Kim et al, 2001-a ve b).

Yine yapılan çalışmalarda mast hücrelerinin adezyonuna da indirekt olarak yardım eden VEGF, bu etkisini endotel hücrelerinden mast hücre aktive edici faktörler salgılanmasını uyararak yapmaktadır (Detmar, 2000-b).

Gelişim sırasında oluşan endokondral kemik oluşumunda da VEGF'ün önemli etkileri vardır. Epifizyal büyüme plaklarında hipertrofik kondrositler tarafından VEGF salgılanır, çünkü birtakım sinyaller gelmesi için yeni kan damarlarına ihtiyaç vardır. Bu sinyaller de kemik oluşumunda hipertrofik kondrositlerin apoptozisi için gereklidir (Ferrara, 2001).

VEGF endotel hücresinden bazı adezyon moleküllerinin salgılanmasını da uyarır ki bunlar da, tümör damarlanmasına naturel-killer hücrelerin seçici adezyonunu açıklar. Ayrıca VEGF'ün insan deri epitel hücrelerinde yaşlanmayı geciktirici etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Ortega et. al., 1998). Yapılan araştırmalarda, VEGF'in sadece belirli hedefleri etkilemekle kalmayıp, ayrıca IL-2

bağımlı lenfositleri stimüle ettiği ve dendritik hücrelerin farklılaşmasını engellediği de gösterilmiştir (Ortega et. al., 1998). Ek olarak, VEGF, retinal pigment epiteliyal hücreleri, saçlı deri papilla hücreleri, neonatal hemanjiomalardan elde edilen stromal kültür hücreleri için de otokrin bir büyüme faktörüdür. Ayrıca VEGF'ün, etkilediği hücrelerin başka hücrelere değişimini de uyardığı belirtilmiştir (Ortega et. al., 1998).

VEGF'in endotel hücresinde etki gösterebilmesi için öncelikle ona bağlanabilmesi gerekir. Bir başka deyişle, endotel hücreleri VEGF'den faydalanabilmek için onun bağlanabileceği özgül reseptörleri sentezlemesi gerekir. Bu reseptörler VEGF reseptör-1 (VEGFR-1) ve VEGF reseptör-2 (VEGFR-2)'dir. Bunlar ilk defa erken embriyogenez sırasında sentezlenirler (Thomas, 1996).

Bu iki reseptörün amino asitlerinin %44'ü ortaktır. Bu reseptörler yaklaşık 1300 amino asitten oluşur ve iki bölüm içerirler. Birinci bölüm, hücre içinde kalan ve tirozin kinazın etkinlik alanlarını içeren intrasellüler bölgedir. İkinci bölüm ise, hücre dışında (ekstrasellüler alanda) kalan tek kısa membran köprüleri dizisi ve ligand bağlama bölgeleri içeren 7 adet immünoglobülin benzeri yapıdan oluşmuştur. VEGFR-1, VEGF-A ve PlGF'e yüksek affinite ile bağlanırken, verimli bir DNA sentezi (proliferasyon) ve kemotaktik endotel hücre cevabı elde edilemez. Ancak, PlGF'e bağlanmayan, ama VEGF'e sıkıca bağlanan VEGFR-2 ile iyi cevap alınır (Thomas, 1996).

Diğer büyüme faktörlerinin transmembran tirozin kinaz reseptörleri gibi VEGF reseptörleri de, özgül ligandlarına bağlandığında dimerizasyon geçirmekte ve bu da hücre içerisindeki mekanizmaları tetikleyerek cevap vermektedir. VEGF'ün uyardığı endotel hücre reseptörleri sinyal iletisi sağlayan birkaç proteini fosforile eder. Bu da ikincil habercilerin oluşmasına katkıda bulunarak, mesajın hücre içinde taşınmasını sağlar (Millauer et al., 1994).

VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin farklı sinyal özellikleri olduğu gösterilmiştir. Bu reseptörlerden yoksun domuz aortik endotel hücrelerine sadece VEGFR-2 kodlayan bir plazmid verildiğinde bu hücrelerin mitoz geçirdikleri ve kemotaksiste yer aldıkları gösterilmiştir (Shibuya et al., 1990). VEGFR-1'e seçici olarak bağlanmış VEGF mutantları permeabiliteye ilaveten anjiogenezis ve normal endotel hücrelerde kemotaksis ve çoğalmayı uyarabilir (Dellian et al., 1996). Ayrıca, VEGFR-2'yi aktive eden anti-idiotipik antikorlar tümör anjiogenezisini de tetikleyebilirler.

VEGFR-2 aktive olduğunda serumsuz ortamdaki HUVEC'te anti-apoptotik etkiler için gerekli olduğu gösterilmiştir (Ferrara and Davis-Smyth, 1997). PlGF'ün ise VEGFR-1'e kuvvetle bağlanarak etki ettiği ama VEGFR-2'ye bağlanmadığı gösterilmiştir. Bu da PlGF'ün endotel hücrelerinde direk mitojenik ve permeabilite artırıcı etkisinin olmadığı veya etkin olarak tirozin fosforillenmesinin eksik kaldığını göstermiştir (Frank et al., 1995). Yapılan çalışmalar VEGFR-1 VEGF'ün etki mekanizmasında önemli olan bir reseptör olmayıp, aksine tuzak ve yanıltıcı bir reseptör olduğunu göstermiştir. VEGFR-2 VEGF'ün etkilerine aracılık ederken, VEGFR-1 ise ya yanıltıcı olarak görev yapmakta, ya da VEGFR-2 aracılığıyla sinyalizasyonu baskılayarak negatif bir etki göstermektedir (Yancopoulos et al., 2000).

Embriyonik kan damarlarının gelişiminde VEGF'ün etkin rolü; farelerde VEGF'ün sadece bir allelindeki bozukluğun bile, anjiogenezis ve yeni kan adacıklarının oluşumunda öldürücü etkileri olduğunun görülmesiyle kanıtlanmıştır (Risau, 1997). Farelerde yapılan çalışmalarda, VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin aksaması vaskülarizasyonu ve normal embriyonik gelişimi engeller. VEGFR-2'nin noksan veya bozuk ekspresyonunda farelerin hematopoitik prekürsörlere, farklılaşmış endotel hücrelerine ve organize kan damarlarına sahip olmadıkları görülmüştür. Bu da VEGFR-2'nin hem endoteliyal, hem de hematopoitik öncül hücrelerin gelişimi için zorunlu olduğunu düşündürmektedir. Bunun aksine; VEGFR-1'in yapımındaki aksaklıklarda, olgun endoteliyal hücreler oluşabilmesine rağmen, aşırı genişlemiş ve yapısal bozukluklara sahip damarlar oluşmaktadır. Bu olay, hücre-hücre veya hücre-matriks etkileşimlerinin kontrolü ile doku mimarisinin belirlenmesinde VEGFR-1'in rolünün olduğunu göstermiştir. Daha sonraki çalışmalarda bir başka VEGF reseptörü daha bulundu ve VEGFR-3 adı verildi. Bu reseptörün özellikle lenfatik damarların anjiogenezinde rol alan VEGF-C ve VEGF-D'nin bağlandığı reseptörler olduğu saptandı (Risau, 1997).

Sonuç olarak **VEGFR-1**, VEGF-A, VEGF-B, PlGF için özgüldür; **VEGFR-2** VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E için özgüldür; **VEGFR-3** ise VEGF-C ve VEGF-D için özgüldür (Ferrara and Davis-Smyth, 1997).

VEGF'ün, vertebralaların gelişiminde önemli rolü olan kemik gelişiminde de vazgeçilmez olduğu bilinmektedir. Epifizial büyüme sırasında hipertrofik

kondrositlerden VEGF mRNA'ları sentez edilip, salınmaktadır. VEGFR-1'in sadece endotel hücrelerinde değil, osteoblastlarda da sentez edildiği bildirilmektedir. Bazı çalışmalarda, VEGF'ün sığır osteoblastları üzerinde kemotaktik etkileri olduğu bulunmuş ve bu etkinin VEGFR-1 üzerinden olduğu gösterilmiştir (Ferrara and Davis-Smyth, 1997).

1.3. Hücrelerin Adezyonu

Hücreler birbirlerine membranlarında bulunan çeşitli yapıların yardımıyla yapışırlar ve bu sayede hem birbirlerine bağlanırlar, hem de birbirlerinden haberdar olurlar (Junqueira et al., 1998). Yine sadece hücrelere değil, ekstrasellüler matrikse de bağlanarak belli bir yerde lokalize olup doku ve organları oluştururlar. Hücre adezyonu dokuların oluşumu, normal fonksiyonunu yapabilmesi ve üç boyutlu yapısının korunabilmesi için çok önemlidir (Aplin et al., 1998). Dokuların oluşumu ve devamlılığı hücrelerin sürekli olarak yapıp yenilediği, yani tekrar tekrar düzenlediği bazı moleküllerle sağlanır.

Hücreler arasındaki bağlanma seçici olmalıdır, çünkü gelişim sırasında bir çok farklı tipteki hücre, göçleri sırasında birbirleriyle karışıklık olmadan, uygun şekilde bağlanabilmelidir. Ayrıca göç eden bu hücreleri dokuyu oluşturacakları yere çekecek kimyasal maddelere ihtiyaç vardır. Hücrelerin gidecekleri yere ulaşmaları için, geçecekleri yoldaki hücrelerin yüzeylerinde ve ekstrasellüler matrikste adezyon molekülleri yapılması gerekir. Hücrelerin buldukları ortamda benzer hücrelere yapıştıkları ve bunu sağlayan tanıma sistemleri olduğu bilinmektedir (Alberts et al., 2002). Yapılan çalışmalarda farklı dokulara ait hücreler bir kültür ortamında birleştirildiklerinde; aynı dokudan olan hücrelerin biraraya geldikleri gözlenmiş ve buna da adezyon moleküllerinin yol açtığı düşünülmüştür (Takeichi, 1988).

Hücre adezyonuna aracılık eden biyokimyasal yapılar; adezyon moleküllerini (reseptörlerini), ekstrasellüler matriks moleküllerini ve adezyon plak proteinlerini içeren üç belli başlı sınıfı kapsayan multiprotein komplekslerdir (Alberts et al., 2002).

1.3.1 Hücre Bağlantı Kompleksleri

Vertebrallarda hücreler birbirlerine değişik bağlantı kompleksleriyle bağlanırlar. Bunlar sıkı (occluding) bağlantılar, tutturucu (anchoring) bağlantılar ve gap junctionlar (neksus)'dır.

Sıkı (occluding) bağlantılar; hücreler arasından madde geçişine izin vermeyen, bir bariyer görevi yapan bağlantılardır. Bağlanan iki hücre arasında hiç intersellüler boşluk bulunmamaktadır. Bunlar claudin ve okludin adlı iki transmembran proteininin, her birinin intersellüler alandaki ucu ile komşu hücrede benzeriyle bağlanmalarından oluşur. Bu proteinlerin hücre içindeki ucu ise Zonula Okludens Protein-1,2 ve 3 (ZO-1,2,3) adı verilen intrasellüler proteinlerdir ve bunlar ile hücre iskeletindeki aktine bağlanırlar (Alberts et al., 2002; Ross et al., 2003).

Tutturucu (anchoring) bağlantılar; bir kısmı, aktin flamanlarının bağladığı hücre-hücre (adherens bağlantılar) ve hücre-matriks (focal adhesion) bağlantılarından oluşurken, bir kısmı, intermediate flamanların bağladığı hücre-hücre (desmozom) ve hücre-matriks (hemidesmozom) bağlantılarından oluşur. Tutturucu bağlantılarda iki protein molekülü ön plana çıkar. Birincisi hücre içinde bulunan ve aktin veya intermediate flamanlarla transmembran proteinleri arasındaki bağı sağlayan intrasellüler tutturucu proteinler (katenin, vinkulin, α -aktinin, desmoplakin, plakoglobin, talin, paxillin) ve diğeri de bir ucuyla aynı hücrede bulunan intrasellüler tutturucu protein ile bağlanan diğeri ucuyla da diğeri hücrede kendine benzer proteinle bağlanan transmembran adezyon proteinleridir. Transmembran adezyon proteinleri iki farklı şekil içerir. Birincisi, tutturucu bağlantıların hücre-hücre bağlantılarını (hem adherens, hem de desmozomlarda) sağlayan kaderin ailesidir (e-kaderin, desmoglein, desmokolin). Diğeri ise, tutturucu bağlantıların hücre-matriks bağlantılarını (fokal adezyon ve hemidesmozom) sağlayan integrin ailesidir. Tutturucu bağlantıların hücre-hücre bağlanması alt grubunda yer alan adherens bağlantıların transmembran proteinleri E-kaderindir. E-kaderinler ekstrasellüler uçlarıyla birbirlerine bağlanırken, hücre içinde aktin flamanlarına katenin, α -aktinin ve vinculin proteinleriyle bağlanmaktadır. Yine, hücre-hücre bağlanması alt grubunda yer alan desmozomlar, desmoglein ve desmokolin kaderinlerle hücrelerarası alanda birbirlerine bağlanmakta, hücre içinde ise desmoplakin ve plakoglobin proteinleri ile

intermediate flamanlara bağlanmaktadır. Tutturucu bağlantıların hücre-matriks bağlantıları alt grubunda yer alan fokal bağlantıların transmembran proteinleri integrinlerdir. İntegrinler hücre dışındaki ekstrasellüler matrikste fibronektin ve diğer ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlanırken; hücre içinde talin, vinkulin, α -aktinin ve paxillin proteinleri ile aktin flamanlarına bağlanmaktadır. Yine hücre-matriks bağlantıları alt grubunda yer alan hemidesmozomların transmembran proteinleri integrinlerdir. İntegrinler, hücre dışındaki ekstrasellüler matrikste laminin-5, kollajen-4 ve diğer ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlanırken; hücre içinde desmoplakin-benzeri proteinlerle intermediate flamanlara bağlanmaktadır (Alberts et al., 2002).

Gap junctionlar (Neksus); 6 adet konneksin proteininin oluşturdukları konneksonlar, bağlantı kurulan komşu hücrelerde karşı karşıya gelerek intersellüler kanalları oluşturarak, iyon ve 1000Da altındaki küçük moleküllerin geçişine olanak sağlamaktadırlar (Ross et al., 2003).

1.3.2. Hücre Adezyon Molekülleri

Hücreler; hem ekstrasellüler matrikse, hem de diğer benzer ya da farklı hücrelere sürekli veya geçici olarak bağlanırlar. İşte bu bağlantı yerinde oluşan kompleks yapıda bulunan ve yukarıda açıklanan üç ana yapıdan birisi hücre adezyon molekülleridir (Aplin et al., 1998).

Hücrelerin diğer hücrelerle ve ekstrasellüler matriksle etkileşimlerinde görev alan adezyon moleküllerinin; embriyogenez, hücre büyümesi ve farklılaşması, sitotoksiste, antijen sunumu, virus ve parazitlere bağlanma, inflamasyon, damar dışına çıkma, tümör hücreleriyle etkileşim, tümör invazyonu ve metastazı, dokuya özel gen ekspresyonu, sinyal iletimi gibi birçok olayda rolü olduğu bilinmektedir (Syrigos et al., 1999). Adezyon moleküllerinin sentezi nöral uyarı, büyüme faktörleri, cAMP, hormonlar ve nörotransmitterler ile düzenlenir (Desmet, 1996). Adezyon molekülleri hem hücre göçü ve yayılması gibi olaylarda hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde, hem de gen transkripsiyonu, apoptozis, proliferasyon, reseptör aktivasyonu ve sekresyon gibi olayları gerçekleştirmede rol alan sinyal iletiminde görev alırlar (Hope and Meredith, 2003). Birçok hücre içi sinyal yolu hücrenin özel

ekstrasellüler moleküllere bağlanması ile aktive olur. Bu sinyal oluşumu tirozinin fosforillenmesi, mitozisi aktive eden protein kinaz aktivasyonu, pH değişiklikleri, bazı dokuya özel gen aktivasyonunu içerir (Syrgos et al., 1999).

Adezyon molekülleri membrana bağlı olduğu gibi, bazen de membrandan ayrılarak çözülmüş şekilde plazmada bulunabilir. Ama bu, miktar olarak oldukça azdır. Hücre yüzeyindeki adezyon molekülleri seviyesi ile bunların plazmada çözülmüş halde bulunan şekillerinin seviyesi arasında bir bağlantı olduğuna dair kanıtlar bulunamamıştır. Buna rağmen, insanlarda aterosklerozis patogenezinde hücre membranına bağlı adezyon molekülü seviyesi ile plazmada çözülmüş halde bulunan adezyon molekülleri seviyesinin ilişkili olduğu gösterilmiştir (Hope and Meredith, 2003).

Hücre adezyonunda Ca^{+2} oldukça gerekli bir iyondur. Ca^{+2} iyonu içermeyen medyumlarla yapılan çalışmalarda hücreler arasındaki birtakım bağlantıların zayıfladığı ve kaybolduğu görülmüştür. Bununla birlikte, bağlantıların bir kısmı devam etmiştir. Bundan yola çıkılarak, bu bağlantı mekanizmaları ikiye ayrılmıştır. Ca^{+2} bağımlı (calcium-dependent system; CaDS) ve Ca^{+2} bağımsız sistem (calcium-independent system; CIDS) (Takeichi, 1977). Ca^{+2} bağımlı sistem, Ca^{+2} iyonu varlığında tripsin ve diğer proteolitik enzimlere karşı Ca^{+2} 'un koruyuculuğu altındadır ve dolayısıyla Ca^{+2} bağımsız sisteme göre daha dayanıklıdır. Ama, Ca^{+2} iyonu yokluğunda durum tam tersi olur (Atsumi and Takeichi, 1980).

1.3.3. Hücre Adezyon Molekülü Çeşitleri

Hücre adezyon molekülleri dört ana grupta incelenir. Bunlar Kaderinler, İntegrinler, Selektinler ve İmmünoglobulin Süperalesi'dir Bu moleküllerin hemen hepsi transmembran glikoproteinleridir (Löster and Kannicht, 2000). Kaderinler, integrinler ve selektinler Ca^{+2} bağımlı sisteme dahil moleküllerdir. İmmunoglobülin süperalesinden olanlar ise Ca^{+2} bağımsız sisteme dahildirler (Löster and Kannicht, 2000; Alberts et al., 2002).

1.3.3.1 Kaderinler

Kaderinler, herbirinde 1 ile 3 arasında Ca^{+2} bağlama alanları içeren 3-5 homolog polipeptit tekrarları içerirler (Löster and Kannicht, 2000). Kaderinler, 723 ile 748 amino asit uzunluğunda, molekül ağırlıkları 120-140 kD arasındadır (Filiz et al., 2002-a) ve sadece kendine benzer moleküllerle yani homofilik olarak bağlanırlar. Ca^{+2} bağımlı sisteme dahil, hücre-hücre adezyonunda yer alan, embriyoda doku farklılaşmasından erişkinde seçici hücre tanınmasından ve tüm yaşam boyunca normal doku mimarisinden sorumlu transmembran glikoproteinleridir (Hyafil et al., 1981). Hücrelerde bulunan ve birbirleriyle bağlanarak komşu hücrelerin birbirleriyle bağlanmasını sağlayan kaderinler; hücrelerin haberleşmesini, tanınmasını ve pozisyonlarını etkileyen sinyal iletiminde rol alırlar (Behrens, 1994). Doku oluşumunda da rol alan kaderinler, gelişmekte olan embriyodan apoptozisin düzenlenebilmesine ve farklı hücre gruplarının dokuları oluşturmak için biraraya gelmesine kadar birçok olayda görev alır. Hücrelerin fazla çoğaldığı durumlarda kaderinlerin kontakt inhibisyona neden oldukları bilinmektedir (Vleminckx and Kemler, 1999). Tümörler gelişirken bu inhibisyonu durdurmak için kaderin yapımını azalttıkları veya başka nedenlerle kaderinlerdeki azalmayı takiben tümör geliştiği görülmüştür (Behrens, 1994). Örneğin; metastaz yapma aktivitesi yüksek olan over tümörlerinde E-kaderin sentezinin düşük bulunduğu rapor edilmiştir (Hashimoto et al., 1989).

Kaderinlerin yedi çeşidi vardır. Genellikle buldukları dokuya göre isimlendirilirler. Ancak tanımlanmış bu kaderinlerin hiçbiri dokuya özel değildir. Kaderinler; Epitelyal (E)-kaderin, Nöral (N)-kaderin, Plasental (P)-kaderin, Vasküler endotelyal (VE)-kaderin, Retinal (R)-kaderin, Truncated (T)-kaderin ve Muscle (M)-kaderin olarak isimlendirilmişlerdir (Edelman, 1984).

Bir hücrenin farklı zamanlarda ve farklı fonksiyonlarına bağlı olarak sentezlediği kaderin tipleri de farklı olur (Edelman, 1984).

1.3.3.1.1. E-Kaderin

Sıklıkla epitel hücrelerinde bulunmaktadır. Bu hücreler arasında adherens tipi hücresel bağlantılar kurarak, onların stabilizasyonuna yardım ederler. 124 kD ağırlığında ve komşu hücrelerle homofilik bağlantılar yaparlar (Furukawa et al., 1997). Ayrıca, embriyonun iki hücreli döneminden onaltı hücreli dönemine kadar olan dönemde hücrelerin birarada olmasından en fazla sorumlu olan adezyon molekülüdür (Hyafil et al., 1980). E-kaderinin tümör dokusunda azalması durumunda metastaz veya invazyonun arttığı görülmüştür (Vleminckx et al., 1991).

1.3.3.1.2. N-Kaderin

Esas olarak nöral hücreler arasındaki seçici adezyonu sağlayan 127 kD ağırlığında bir moleküldür. Bir çok erişkin dokuda hem geçici hem de kalıcı olarak sentez edilirler. Mezodermden köken alan birçok yapıda, özellikle de kalp kasında kalıcı olarak sentez edilirler (Filiz, 2000). İskelet kası, lens ve fibroblastlarda da bulunurlar (Alberts et al., 2002). Gastrulasyonu takiben invajinasyon sırasında bazı ektoderm hücrelerinin hem E-kaderin hem de N-kaderin sentezlediği bilinmektedir. Ancak, bunlardan mezoderme farklılaşan hücrelerin E-kaderin sentezi yapmadıkları ama N-kaderin sentezine devam ettikleri görülür (Takeichi, 1988).

1.3.3.1.3. P-Kaderin

P-kaderin 118 kD ağırlığında ve adından da anlaşılacağı üzere plasentada bol bulunan ve adherens bağlantılar yapan bir kaderin tipidir. İlk olarak ekstraembriyonik dönemde görülürler. Blastosistin uterus epitel hücrelerine yapışmasında E-kaderin rol oynarken, gömülmesinde P-kaderin rol oynamaktadır (Filiz, 2000). P-kaderin diğer kaderin tiplerinden farklı olarak daha nadir görülür. Epidermiste bazal hücrelerinin membranında, meme epitelinde, kornea endotelinde ve mezotelde görülür (Furukawa et al., 1997).

1.3.3.1.4. VE-Kaderin

Endotele özel ve homofilik adezyona aracılık eden bir kaderindir. Endotel hücrelerinin özellikle lateral yüzeylerinde bulunur ve burada bariyer görevi olduğu düşünülmektedir. VE-kaderinin azalmasında permeabilitede ve nötrofillerin damar dışına çıkmasında bir artış olduğu gözlenmiştir. Sadece endotelde bulunmadığı ayrıca periferik sinirlerin perinörümünde da bulunduğu ve burada kan-sinir bariyerine eşlik ettiği düşünülmektedir. Embriyo gelişiminde vaskülogenezis ve endotel hücre farklılaşmasında rol oynar (Filiz, 2000).

1.3.3.1.5. R-Kaderin

İlk olarak civciv retinasında bulunduğu için bu isim verilmiştir. Ayrıca; beyinde, timusta ve akciğerdeki düz kaslarda da bulunur. Gastrointestinal sistemde mide bezlerinin çukurcuk bölgeleri ve ince barsak absorptif hücrelerinde de sentezlenmektedir. Pankreasta; duktus hücrelerinde, ekzokrin bezleri epitelial kanal hücrelerinin apikal ve bazolateral bölgelerinde ve asiner hücrelerin apikal bölgelerinde bulunmaktadır (Sjodin et al., 1995).

1.3.3.1.6. T-Kaderin

Timusta CD4+ ve CD8+ timositlerce sentezlenir. İnsan aortik medial membranlarında LDL'yi bağladığı bilinmektedir. Nöronlarda ve kasta da bulunmaktadır (Alberts et al., 2002). Hücre büyümesi üzerine olumsuz etkileri olduğu düşünülmektedir (Kuzmenko et al., 1998). Embriyonik gelişimde nöral krest hücrelerinin göçünde de rolü vardır (Ranscht and Dours-Zimmermann, 1991).

1.3.3.1.7. M-Kaderin

Gelişim sırasında çok spesifik olarak kas dokusunda bulunduğu belirlenmiştir. İlk olarak 11. ve 12. günlerde oluşan kaslarda ortaya çıkar ve doğuma kadar ekspresyonu devam eder ama doğumda sentezi azalır. Erişkinde ise nöromusküler bileşkede, periferik sinirlerde özellikle ranvier düğümlerinde ve kasta olduğu bilinmektedir. Ayrıca, doğumun 11. gününde beyinciğin granüler hücre tabakasındaki sinaptik bağlantıların kurulmasından sonra da sinaptik alanlarda varlığı gösterilmiştir (Filiz, 2000).

Ayrıca kaderinlerden sınıflandırmaya girmeyen ve desmozomlarda yer alan Desmocollin ve Desmoglein'ler vardır. Bunlar deride bulunmakta ve hücre-hücre bağlantılarında yer almaktadır. Yine sınıflandırmaya girmeyen protokaderinler vardır ki, bunlarda kimyasal sinapslarda yer alan ve nöronlarda görülen haberleşme bağlantılarında yer alırlar (Alberts et al., 2002).

1.3.3.2. İntegrinler

Bir hücrenin ekstrasellüler matrikse ve bazal membrana bağlanabilmesi için hücre iskeletini buraya bağlayacak moleküllere ihtiyacı vardır. İntegrinler ekstrasellüler matriks proteinlerinden olan fibronektin, laminin ve kollajene bağlanan bu transmembran proteinleridir (Alberts et al., 2002). İntegrinler de Ca^{+2} -bağımlı sisteme dahildirler. Hücrelerin bazal membran ve ekstrasellüler matrikse bağlanmasında ve migrasyonlarında hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerine aracılık eden adezyon moleküllerindedir. İntegrinler insan vücudunda ki hemen tüm hücrelerde bulunurlar ve embriyo gelişmesinden savunma mekanizmalarına kadar birçok fizyolojik olayda rol alırlar (Luscincas and Lawler, 1994).

İntegrinlerin birçok alt tipi vardır. Birbirine non-kovalent bağlarla bağlı α ve β alt ünitelerinden oluşmuş heterodimerik yapıda plazma membran glikoproteinleridir. α alt ünitesi, birbirinden farklı α_1 ve α_2 alt ünitelerinin disülfit köprüleriyle birbirlerine bağlı ağır ve hafif zincirlerinden oluşur (Löster and Kannicht, 2000). Yirmiye yakın α ve ondan fazla β alt tipi tanımlanmıştır ve

bunların değişik kombinasyonlarla oluşturduğu yirmiden fazla çeşide ayrılırlar (Löster and Kannicht, 2000).

β_1 -integrinler; kollajen, fibronektin, laminin, vitronektin, von Willebrand faktör ve trombospondin gibi ekstrasellüler matriks proteinleri için birer reseptör yani bağlanma noktalarıdır ve geç aktive olurlar. Yine bir başka bir integrin VLA-4 ve LPAM-1 integrinleri bir başka hücredeki VCAM-1 için; LFA-1 ve Mac1-integrinler de ICAM-1-3 için ligand görevi görürler ve çeşitli hücrelerin endotele yapışmasına aracılık eder. β_2 -integrinler lökosit integrinleridir. β_3 -integrinler endotel hücrelerindeki vitronektin ve trombositlerdeki reseptörleri oluştururlar. Bazı tümör tiplerinin invazyonunda integrinlerin bir kısmının azaldığının görülmesi, tümör invazyonunda da rolleri olabileceğini düşündürmüştür. İntegrinlerin önemli bir özelliği de inaktif olarak kalabilmeleri ve gerektiğinde aktiveşebilmeleridir (Filiz, 2000).

Kaderinler, homofilik bağlantılarla sadece kaderinlerle bağlanmalarına karşın, integrinler heterofilik bağlantılar yaparlar. Dolaşımdaki lökositlerin damar endoteline tutunup yapışmasına ve inflamasyon alanlarına göçüne aracılık ederler. Timusta progenitör T hücrelerinin yuvalanmasını, kemik iliğinde ise T ve B hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlarlar. Ayrıca, ekstrasellüler sinyallerle haberleşmeye de katkıda bulunurlar. Hücreler büyümek ve farklılaşmak için bir substrata bağlanmaya ihtiyaç duyarlar. Bağlanamazlarsa apoptozise giderler. Bu bağlanmada ana rolü integrinler üstlenmektedir (Frenette and Wagner, 1996-a).

1.3.3.3. Selektinler

Selektinler lektin-benzeri küçük bir adezyon molekül ailesidir (Aplin et al., 1998). Selektinler üç bölge içerir; en dışta N-terminal Ca^{+2} -bağımlı karbonhidrat tanıma bölgesi, EGF-benzeri bir bölge ve CRP-benzeri bir bölge (Löster and Kannicht, 2000). Diğer adezyon molekülleri proteinlere bağlanmasına rağmen; selektinler, lökositlerin ve endotel hücrelerinin üzerindeki karbonhidrat olan ligandlarıyla birleşirler. Heterofilik bağlantı kurarlar ve hücre-hücre adezyonunda rol alırlar (Aplin et al., 1998). İntegrinlerle bağlantı kurarlar. Selektinler glikolipidler ve

glikoproteinler üzerindeki oligosakkaritlere bağlanırken, integrinler spesifik proteinlere bağlanırlar. Selektinler integrinlere göre daha zayıf bağlantı yaparlar. Bu da lökositlerin kan akımıyla yuvarlanmasına neden olur. Bu yuvarlanma integrinler ve Immünoglobülin süperailisi ile karşılaşınca kadar devam eder. Bunlarla karşılaştığında güçlü adezyon olduğu için artık damar dışına çıkmaya başlarlar (Alberts et al., 2002). Vasküler ve hematolojik sistemde kan hücreleriyle endotel hücreleri arasındaki bağlantılarda yer alırlar. Damar duvarına tutunma ve yuvarlanma sırasında inflamatuvar hücrelerin vasküler endotele adezyonunda ve lenfositlerin yüksek endotelli venüller boyunca yuvarlanmasına katkıda bulunurlar (Springer, 1995).

Bu küçük ailenin üç üyesi vardır. Bunlar Endoteliyal (E)-selektin, Lökosit (L)-selektin ve Platelet (P)-selektin'dir. Selektinlerin her üç elemanı da lökositlerin endotele zayıf olarak yapışmasına ve yuvarlanmasına neden olarak onların damar dışına çıkması için ilk şartı yerine getirmiş olurlar. Kardiyak iskemide yapılan çalışmalarda, selektinlere özel monoklonal antikolarla bu moleküllerin baskılanması sonucu nekrozun önlendiği görülmüştür (Kansas, 1996). Sonuç olarak, iskemi ve reperfüzyonda oluşan doku hasarı, endotel hücreleriyle lökositlerin ilişkisinin kesilerek lökositlerin migrasyonu engellendiğinde en aza indirilmektedir (Frenette and Wagner, 1996-b).

1.3.3.3.1. E-Selektin

Eskiden ELAM-1 olarak isimlendirilen E-selektinler, aktive olmuş endotel hücrelerinde geçici olarak sentezlenirler (Asimakopulos and Taylor, 1998). İnflamasyon sırasında ortaya çıkan interlökin-1 ve tümör nekrozis faktör- α gibi sitokinlerle aktive olan endotel hücreleri tarafından yapılarak, 4-6 saatte bu hücrelerin yüzeyine eksprese edilirler (Hope and Meredith, 2003). Bu moleküllerin lökositlerin, özellikle nötrofillerin endotele adezyonunun erken safhalarında rol aldığı bilinmektedir. Hem endotel hücre membranına yapışık, hem de çözünür formu endotel hücre aktivasyonun belirlenmesinde iyi bir belirteçtir (Asimakopulos and Taylor, 1998). Kolşisin, endotel hücrelerindeki E-selektin moleküllerinin dağılımını değiştirerek nötrofillerin endotel hücrelerine yapışmasını azaltır (Filiz, 2000).

1.3.3.3.2. L-Selektin

Hemen tüm beyaz kan hücrelerinde, özellikle nötrofiller, monositler, T ve B lenfositler ve naturel killer hücrelerde sentezlenirken, hafıza hücrelerinin bazılarında sentezlenmezler. Lökositlerin aktivasyonunu takiben L-selektin ekspresyonu geçici olarak artar ve çok çabuk yok olurlar. Lökosit yüzeyindeki L-selektinde bir azalma veya saçılma varsa, bu daha önce bir lökosit aktivasyonu olduğunu gösterir. L-selektinin azalması lökositlerin daha az bağlanmasını sağlayan muhtemel bir anti-inflamatuvar kontrol mekanizmasıdır (Asimakopulos and Taylor, 1998). Araştırmalar göstermiştir ki; L-selektin, lenfositlerin dolaşımdan lenf noduna geçişinde rol oynamakta ve sentezlenmediğinde bu lenfositler lenf noduna geçememektedir (Kansas, 1996).

1.3.3.3.3. P-Selektin

P-selektin, TNF- α ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin upregülasyonu ile trombositlerde sentezlenip onların α -granüllerinde, endotel hücrelerinde sentezlenip, onların ise sitoplazmalarındaki Weibel-Palade cisimciklerinde depolanırlar (Hope and Meredith, 2003). Ayrıca, trombin ve histamin gibi non-sitokin mediatörlerin stimülasyonu da 10 dakika içinde hücre yüzeyine eksprese edilirler, ama çok kısa bir süre içinde anlamlı olarak azalırlar (Asimakopulos and Taylor, 1998; Hope and Meredith, 2003). Bu moleküller lökositlerin endotele yapışıp, yuvarlanmalarına ve trombositlere bağlanmasına yardım ederler. Kardiyak doku hasarlarında P ve L-selektinin bloke edilmesi, dokunun daha kolay iyileşmesini sağlamaktadır (Asimakopulos and Taylor, 1998).

1.3.3.4. İmmünoglobulin Süperailisi

İmmünoglobulin süperailisinin ismi, ekstrasellüler kısmında bulunan amino asit dizilerinin bir veya daha fazla bir bölümü immünoglobulinlerin ağır ve hafif zincirlerinin amino asit dizilerine benzedikleri için verilmiştir. Ayrıca, fonksiyon olarak da benzedikleri söylenebilir (Hope and Meredith, 2003). Bu immunoglobulin benzeri ünitelerin her biri 70-110 aa uzunluğunda ve birbirlerine β zincirleri arasındaki disülfid köprüleriyle bağlıdır. Diğer üç grup adezyon moleküllerinin aksine, bu grup Ca^{+2} -bağımsız sisteme dahildir (Syrigos et al., 1999).

Bu ailenin üyeleri tipik olarak büyük bir aminoterminal ekstrasellüler domain, tek bir transmembran helikal segment ve sitoplazmik bir uç içerirler. İmmüglobulin domainleri V, C₁ ve C₂ gibi tiplere ayrılır. V ve C₁ tipleri genelde immün sistemde rol alırken, C₂ tipi daha çok hücre adezyon moleküllerinde bulunur (Williams, 1987). Yine bu ailenin bazı üyeleri immünoglobulin domainlerinin altına bağlı fibronektin tip III tekrarları içerir (Löster and Kannicht, 2000). Transmembran bölümü ise membranla glikan fosfotidilinositol aracılığı ile iletişim içindedir. Çok geniş ve farklı hücre tipleri üzerinde bulunurlar ve birçok farklı biyolojik olaya eşlik ederler (Aplin et al., 1998). İmmünglobulin ailesi için belirtilecek belki de en önemli şey; bu ailenin gelişen sinir sisteminde aksona yol gösteren ve nöral bağlantıları kuran, bunların bakım ve devamını sağlayan birçok farklı üyesinin olmasıdır (Aplin et al., 1998). Bu ailenin üyelerinin birçok bakımdan benzeşmesi ortak prekürsör bir genden evrimleştiklerini düşündürmektedir. İmmünoglobulin süperailisinin üyeleri işlev gördükleri yere ve eksprese oldukları hücrelere göre isimlendirilirler. Bunlar Nöral-CAM (N-CAM), İntersellüler-CAM (ICAM), Vasküler-CAM (VCAM), Platelet-Endotel-CAM (PE-CAM), Mukozal Adressin-CAM (Mad-CAM), CD2 (LFA-2) ve CD58 (LFA-3)'dür.

Homofilik veya heterofilik bağlantı yapabilirler. N-CAM ve PECAM gibi immünoglobülin süperailisine dahil bazı adezyon molekülleri; hem homofilik, hem de heterofilik bağlantı yapabilirken, I-CAM ve VCAM-1 gibi bazıları ise sadece heterofilik bağlantılar yapabilmektedir (Williams, 1987; Alberts et al., 2002; Hope and Meredith, 2003).

1.3.3.4.1. Nöral (N)-CAM

N-CAM hem komşu hücrelerin N-CAM'i ile homofilik, hem de heparin, heparan sülfat gibi ekstrasellüler matriks proteinleri ile heterofilik olarak bağlanabilir (Tugay et al., 2003). Ca^{+2} -bağımsız sisteme dahildirler (Filiz et al., 2002-b). Gelişim sırasında belirli zamanlarda sentezlenmesi, onun hücre adezyonunda, hücre farklılaşmasında, hücre bölünmesinde ve hücre göçünde rolü olduğunu göstermektedir. Genellikle sinir sisteminde bulunması nedeniyle bu isim verilmiştir. Embriyo ve erişkin sinir sisteminde nöronal membranlarda bol bulunur (Edelman and Crossin, 1991; Dalcık et al., 2003). Nöron agregasyonunda, nörit büyümesinde, sinir demetlenmesinde ve kas-sinir etkileşimlerinde rol alır. Glial hücrelerde ve epidermis gibi diğer hücrelerde bulunmasıyla sadece sinir sisteminde değil, gelişmekte olan kalp, böbrek, kas, kıkırdak, deri gibi mezenşimal dokularda da etkin olduğu gösterilmiştir. Öğrenme ve hafızada etkili olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (Filiz, 2000).

1.3.3.4.2. Platelet-Endotel (PE)-CAM

PE-CAM en sık endotel hücrelerinde sentezlenir. Bu adezyon molekülü sürekli eksprese edilir. Yapılan çalışmalarda özgül antikolarıyla blokajı yapıldığında, lökositlerin migrasyonunun engellendiği görülmüştür (Desmet, 1996). N-CAM gibi, homofilik adezyonun yanında heterofilik adezyon da yapabilmektedir (Aplin et al., 1998). Heterofilik bağlantı yapımları nedeniyle; hem trombosit, polimorfonükleer lökosit, monosit ve bazı T hücre alt gruplarının yüzeyinde, hem de transmigrate olacakları damar bölgelerindeki endotel hücre yüzeyinde bulunan intersellüler bileşke (bağlantı noktaları)'lerde bulunduğu ve bu hücrelerin migrasyonunda rol aldığı bilinmektedir (Hope and Meredith, 2003).

1.3.3.4.3. Mukozal Adressin (Mad)-CAM

Mukoza ile ilişkili lenfoid dokunun yüksek endotelli ventüllerinde eksprese edilir. Peyter plakları, intestinal sistemin lamina propriası ve lenf nodüllerindeki endotelde bulunurlar ve integrinlerle ($\alpha4\beta7$ ve $\alpha4\beta1$) birleşerek lökositlerin ve lenfositlerin endotele yapışarak, yuvarlanmasına ve migrasyonuna yardım ederler (Desmet, 1996).

1.3.3.4.4. CD2 (Lökosit Fonksiyon Antijen-2; LFA-2)

T lenfositler ve Naturel-Killer (NK) hücrelerden eksprese olurlar. T lenfositler için hedef hücre olarak kabul edilecek olan hücrelerde eksprese edilen immünoglobulin süperailisinin bir başka üyesi olan LFA-3'e bağlanarak T hücrelerin aktivasyonuna ve hedef hücrelere adezyonuna katılırlar (Jhonson, 1991).

1.3.3.4.5. CD58 (LFA-3)

Endotel, epitel, fibroblast, eritrosit ve lökositlerde sentezlenirler. T ve NK hücreler üzerindeki LFA-2 ligantlarına bağlanarak T hücrelerin hedef hücreler ve makrofajlarla olan ilişkilerine aracılık ederler. Ayrıca, T hücrelerle eritrositlerin birbirlerine bağlanarak rozet formasyonu oluşturmasını sağlarlar. (Jhonson, 1991).

1.3.3.4.6. İntersellüler (I) CAM

İntersellüler adezyon molekülleri, vücutta endotel ve lökositleri de içeren bir çok hücrede sentezlenir. Genellikle inflamasyona cevaben lökositlerin endotelden geçerek inflamasyon alanına göçlerinde rol alırlar. Kendi aralarında üç gruba ayrılırlar; ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 (Hope and Meredith, 2003).

ICAM-1; Ig süperailisinden bir glikoprotein olup 80-115 kDa molekül ağırlığındadır (Pawankar et al., 1998). ICAM-1'in geni insanda 19. Kromozom

üzerine lokalizedir. ICAM-1'in üçüncü ve dördüncü Ig-benzeri kısmı (domaini) arasındaki ayırıcı bölgesi kısa olan, beş adet Ig-benzeri bölümü içerir. LFA-1 integrinlerle 1. ve 2. kısmı ile bağlanırken, Mac-1 ile 3. kısmı ile bağlanır (Etzioni, 1996).

Endotel hücrelerinde sentezlenir. İnflame olan dokuların postkapiller venüllerinin içinde lökositlerin yuvarlanmasına ve sıkı yapışmasına aracılık ederler. Ama yuvarlanmadan daha çok, sıkı bağlanarak emigrasyona ve mikrovasküler permeabilite artışına sebep olurlar (Eppihimer et al., 1998). Endotel yüzeyindeki ICAM-1, lökosit yüzeyindeki Lökosit Fonksiyon Antijen-1 ve Mac1-integrinlerle heterofilik bağlantı yapar (Desmet, 1996). Bunun yanında T hücre aracılı host savunma sisteminde önemli rolü vardır (Stolpe and Saag, 1996). Antijen sunan monosit-makrofaj gibi hücrelerde (APC) eksprese edilen ICAM-1, T lenfositlerdeki LFA-1 ile etkileşime girer. Histamin gibi sitokin inhibitörleri monositlerdeki ICAM-1 yapımını inhibe eder (Nishibori et al., 2003).

ICAM-1 normalde endotel hücrelerinde ve lenfositlerde oldukça az miktarlarda sentezlenirken; endotoksin, TNF- α ve IL-1 gibi sitokinlerle sentezi çok ciddi olarak artmaktadır (Hope and Meredith, 2003).

ICAM-1 sağlıklı insanda normal damar düz kas hücre yüzeyinde bulunmamasına rağmen, aterosklerotik lezyonlu damarlarda düz kas hücrelerinde VCAM-1 ile birlikte bulunmaktadır (Hope and Meredith, 2003).

ICAM-1'in sentezini arttıran faktörlerin başında Tümör Nekrozis Faktör- α , İnterlökin-1 β gibi sitokinler, lipopolisakkaritler ve endotoksinler gelir. Ayrıca IL1- α , IFN- γ ve TGF- β da ICAM-1 sentezini arttırırken, IL-4 ve IL-10 bu sentezi değiştirmemektedir. Yapılan hücre kültürü çalışmalarında; özellikle endotoksinler, TNF- α , IL-1 β 'nin ortama verildikten 8 saat sonra, ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonları artarak maksimuma ulaştığı ve 48-72 saat yüksek seviyede kaldığı görülmüştür (Eppihimer et al., 1998). *İn vivo* çalışmalarda ise, bu maddelerle yapılan endotel aktivasyonundan 2 saat sonra ICAM-1 seviyeleri yükselmeye başlamış, 5 saatte maksimal düzeye erişmiş ve 24 saat bu yüksekliğini korumuştur (Eppihimer et al., 1998). VCAM-1'in de-novo ekspresyonunu arttırırken, ICAM-1'i upregüle etmektedir (Kelly et al., 2001).

IFN- γ ile aktive olan süperfisial mesane kanser hücreleri ICAM-1'i yeniden eksprese ederken, IFN- γ ile muameleden önce ICAM-1 ekspresyonu yapmamaktaydı. ICAM-1; lenfokinlerle aktive olmuş NK hücrelerin, mesane kanser hücrelerine bağlanarak onları öldürmesini sağlamaktadır (Syrigos et al., 1999).

Endotel hücreleri tarafından sentezlenen nitrik oksit, sitokinlerin arttırdığı ICAM-1 ve VCAM-1 üzerinde azaltıcı bir etkiye sahiptir. Aterosklerozun başlangıç safhalarında, nitrik oksitin azalmasına ikincil olarak ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonunda yükselme olmasının etkisiyle aterosklerozda artma olduğu görülmüştür (Hope and Meredith, 2003). İskemi ve reperfüzyondan sonra endotel hücrelerindeki disfonksiyondan kaynaklanan NO azalması ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonunda artmaya, bu da endotel-lökosit etkileşiminin artarak transmigasyonuna yol açmaktadır. Hasar bu lökositlerle oluşmaktadır. Bu etkileşimler en çok akışın yavaş seyrettiği venüllerde olmaktadır (Lefer, 1999).

Mekanik güçler ve düzenli yoksunluk stresi, ICAM-1 de artmaya yol açarken, VCAM bu olaydan artma ya da azalma yönünde etkilenmemiştir (Hope and Meredith, 2003).

ICAM-1 sentezi aynı zamanda hipoksi ile de arttırılmaktadır. Miyokard endotelinde sürekli olarak yapılan ICAM-1 iskemi ve reperfüzyonu takiben artmaktadır (Eppihimer et al., 1998).

Adezyon molekülleri bir çok hastalıkta anahtar bir rol oynarlar. Örneğin, rhinoviruslar nasal epitele epitel hücresi membranındaki ICAM-1 ile tutunarak enfeksiyona neden olurlar (Frenette and Wagner, 1996-a). Orta kulak kolesteatomalarında da ICAM-1 ekspresyonunun normale göre çok fazla arttığı gösterilmiştir (Bujia et al., 1994). Yine, ekstrahepatik kolestaziste inflamasyon alanına nötrofil göçü olması dolayısıyla yapılan çalışmalarda ICAM-1'in arttığı görülmüştür (Gulubova, 1998). ICAM-1'in viral hepatitlerde hepatosit ve lenfosit etkileşimlerinde de rolü olduğu rapor edilmiştir (Volpes, 1996).

ICAM-1'in bir de çözünür formu (sICAM-1) vardır ki; bunların alternatif splicing ile oluştuğunu düşündüren çalışmalar vardır. Yani, ICAM-1 ile sICAM-1 farklı mekanizmalarla sentezlenmektedir Bunlar göstermiştir ki; TNF- α 'nın indüklediği çözünür-ICAM-1 5 saatte oluşmakta ve 12 saat yüksek kalmaktadır. Membrana bağlı ICAM-1 bozukluğu olan ve TNF- α ile stimüle edilen farelerde

yapılan bir çalışmada sICAM-1 seviyelerinin anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (Eppihimer et al., 1998).

ICAM-2 de ICAM-1'e benzer bir moleküldür. Amino asit dizilimindeki benzerlik yaklaşık %35 kadardır (Bujia et al., 1994). İnsan ICAM-2'si 17. Kromozom üzerinde tek kopyalı bir gen olarak lokalizedir. Sadece 2 adet Ig-benzeri domaini vardır ve LFA-1'e bağlanan bölgesi bu iki domainidir (Etzioni, 1996). Diğer integrinler bu moleküle bağlanamamaktadır. ICAM-2 ekspresyonu ICAM-1 ve ICAM-3'ün aksine daha sürekli, ama ICAM-1'e göre daha azdır (Figarella-Branger et al., 2003). ICAM-2 ekspresyonu sitokinlerden etkilenmemektedir. Bu yüzden de hücrelerin normal fonksiyonlarında rol aldıkları düşünülmektedir (Etzioni, 1996).

ICAM-3 ise; endotel hücrelerinde değil, non-aktif (dinlenen) lökositlerin yüzeylerinde daha güçlü eksprese edilirler. Bu hücreler aktive olduğunda onların podlarında (uzantıları) toplanarak daha fazla lökosit ile etkileşimi ve agregasyonu kolaylaştırır ve inflamasyon alanına hücreleri toplar ICAM-1 ile %48 oranında benzerlik göstermektedir.. ICAM-1 ile oldukça benzeyen 5 adet Ig-benzeri bölgeye sahiptir ve sadece LFA-1 ile bağlanabilir (Etzioni, 1996). ICAM-1 ile LFA-1 arasında koreseptör olarak rol aldıkları düşünülmektedir (Malik and Lo, 1996).

1.3.3.4.7. Vasküler (V)-CAM-1

Vasküler hücre adezyon molekülü, ICAM-1'in aksine çok az hücrede görülmektedirler. Endotel hücresi, makrofaj ve kemik iliği stromal hücresi yüzeyinde görülür (Desmet, 1996). VCAM-1 7 tane Ig-benzeri yapı içerir ve ligandıyla (VLA-4) ilk domainde yer alan NH₂ terminaliyle bağlanır (Etzioni, 1996).

Endotel yüzeyinde bulunan VCAM-1, inflamasyon bölgesinde lenfosit yüzeyindeki LPAM-1 ve nötrofil dışındaki lökositlerin yüzeyinde bulunan VLA-4 integrinlerle heterofilik olarak bağlanır (Abbas and Lichtman, 2003; Hope and Meredith, 2003). VCAM-1'in tek bir geni vardır. Birkaç değişik integrin bağlanma alanı oluşumu ise, alternatif splicing ile olur. VCAM-1 de ICAM-1 gibi sağlıklı insanda normal damar düz kas hücre yüzeyinde bulunmamasına rağmen, aterosklerotik lezyonlu damarlarda düz kas hücrelerinde eksprese edildiği görülmüştür (Hope and Meredith, 2003). Transform olmuş endotel hücreleri ve

tümör hücrelerinde, hem ICAM-1 hem de VCAM-1 ekspresyonu olabilmesine rağmen; normal endotel hücrelerinde TNF- α , IL-1 α , IL-1 β ve IL-4 gibi inflamatuvar mediatörlerle yapımları uyarılmaktadır (Hope and Meredith, 2003). Ama IFN- γ , IL-10 ve TGF- β ile değişmemektedir (Kelly et al., 2001). Değişik kaynaklardan elde edilen endotel hücreleriyle yapılan hücre kültür çalışmalarında, VCAM-1 ve ICAM-1 ekspresyonlarının farklı olduğu görülmüştür (Kelly et al., 2001). Nötrofilin damar dışına çıkması sırasında endotele ilk bağlanmada (tethering) selektinler en önemli rolü oynarken, lenfosit bağlanmasında VCAM-1 en önemli rolü oynamaktadır. IL-4 de VCAM-1 ekspresyonuna ve dolayısıyla mononükleer hücre göçüne sebep olmaktadır (Fisher et al., 1996).

TNF- α ve IL-1 β 'nin ortama verilmesini takiben 24 saat içinde VCAM-1 ekspresyonu artar ve 72 saat yüksek seviyede kalır (Kelly et al., 2001).

Primer biliyer siroz ve primer sklerozan kolanjitiste ICAM-1 seviyeleri normale göre çok artarken, VCAM-1'in kontrol grubundan farklı olmadığı görülmüştür (Broome et al., 1996).

VCAM-1'in de çözünür formu vardır. Bazı inflamatuvar hastalıklarda çözünür VCAM-1'in hastalığın aktivitesiyle korole olduğu görülmüştür (Etzioni, 1996). Örneğin, romatoid artritli hastaların sinoviasında bol olarak bulunması hastalığın patogeneğinde rol aldığını göstermektedir (Frenette and Wagner, 1996-b). Bu çözünür formlar, lokal inflamasyon alanları veya dolaşım boyunca dağılarak inflamasyona uzak alanlardaki hücrelerin aktivasyonunda önemli rol oynarlar (Etzioni, 1996).

1.3.3. Lökositlerin Damar Dışına Göçü

Vücudun herhangi bir bölgesinde oluşan inflamasyon ve açığa çıkan sitokinler; bu bölgeye damarlar vasıtasıyla savunma hücrelerinin gelmesini ve bu hücrelerin damar duvarından çıkarak inflamasyon alanına gitmesini, bir başka deyişle lökositlerin inflamasyon alanına migrasyonunu sağlar. Hücrelerin damar dışına çıkması bir kaç aşamada olur.

Bağlanma (tethering); ilk aşama bağlanmadır. Bu safhada normalde dolaşımda serbestçe sürüklenen ve endotele yapışmayan lökositler, üzerlerinde bulunan L-selektin ile post-kapiller venüllerin duvarındaki endotel hücrelerinin membranında bulunan P-selektin yardımıyla zayıfça yakalanırlar (Kelly et al., 2001).

Yuvarlanma (rolling); ikinci aşamadır. Yakalanan lökositlerin endotel hücreleriyle oluşturdukları zayıf bağlar kan akımının da etkisiyle ayrılır. Ancak biraz ileride tekrar yakalanırlar ve bu olay bir süre devam ederek lökositin iyice yavaşlamasına kadar devam eder. Bu aşamada L-selektin ve P-selektinin yanısıra endotel membranında bulunan E-selektin de olaya katılır. Yine sICAM-1 ve sVCAM-1 de bu olayda görev alır (Steinhoff and Brandt, 1996). Ayrıca lökositlerin yuvarlanması, üzerlerindeki sitokin reseptörleriyle inflamasyon bölgesinden gelen sitokin ve kimokinlerin etkileşimini artırır (Figarella-Branger et al., 2003). Bu maddelerin lökositlerle etkileşimi lökosit membranı üzerindeki integrinlerin aktivasyonunu sağlar (Abbas and Lichtman, 2003).

Sıkı bağlantı (tight adhesion); iyice yavaşlayan ve membranlarındaki integrinler aktive olan lökositler endotel üzerinde bulunan immunoglobulin süperailisinden bazı üyelerle sıkıca bağlanarak oldukları yerde kalırlar. İmmunoglobulin süperailisinden ICAM-1, LFA-1 ve Mac-1 integrinlerle; VCAM-1 ise VLA-4 ve LPAM-1 ile bağlanır (Hope and Meredith, 2003; Figarella-Branger et al., 2003).

Göç (transmigration); bu son aşamada ise inflamasyon alanına gitmek üzere lökositler endoteli geçerler. Bu geçiş PECAM, ICAM-1 ve VCAM-1 yardımıyla olur (Steinhoff and Brandt, 1996).

Bu olaylar zinciri bir takım birlikteliklerle uyarılırlar. Örneğin IL-8, E-selektin ve ICAM-1 sentezleri nötrofillerin damar dışına çıkmasını tetiklerken; VCAM-1, ICAM-1 ve MIP-1 β kemokininin oluşumu daha çok lenfositlerin damar dışına çıkmasını tetikler (Fisher et al., 1996).

Adezyon moleküllerinin sentezinin fazla olması doku hasarlarına sebep olabilir. Burada ön plana çıkan nötrofiller özellikle iskemi ve reperfüzyon ile oluşan yaralanmalarda önemli ve iyi bilinen bir role sahiptirler. P-selektin veya L-selektine karşı antikörlerin verilmesi ile oluşturulan selektin inhibisyonu deneysel bir kardiyak iskemi modelinde nötrofillerle oluşan nekroze karşı koruyucu olmuştur (Frenette

and Wagner 1996-b). Normal karaciğer hepatik ve sinüzoidal endotelde ICAM-1 salgısı minimal düzeyde, E-selektin ise hiç salgılanmazken; alkolik hepatitiste vasküler endotelyumda E-selektin ve güçlü bir ICAM-1 ekspresyonu vardır. Alkolik sirozda ise hem vasküler hem de sinüzoidal endotelde ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonu olmaktadır (Fisher et al., 1996).



2. AMAÇ ve KAPSAM

Damar oluşumu embriyonal, fetal ve büyüme döneminde, yara iyileşmesinde, tümörlerin büyümesinde ve kan yoluyla metastazında son derece önemlidir. Ayrıca immünite ve inflamasyon olaylarının düzenlenmesinde de önemlidir. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü, Anjiogenin ve Efrin gibi büyüme faktörleri damar oluşumunda önemli rol oynarlar. VEGF, bir yandan endotel hücrelerinin proliferasyonunu ve migrasyonunu uyararak damar oluşumuna sebep olurken, diğer yandan da inflamasyonda lökositlerin damar dışına çıkmasında (ekstravazasyon) rol alan önemli bir faktördür. Yapılan çalışmalarda, dokuların büyümesi, tümörlerin büyüüp yayılabilmeleri için yeni damarlara ihtiyaç duyduklarından, VEGF üzerinde önemle durulmaktadır. Son yıllardaki çalışmaların önemli bir bölümü, VEGF'ün endotel hücrelerinin adezyon molekülleri sentezlemesi ve inflamasyonun tüm alanlarındaki rolleri üzerine gerçekleşmektedir.

Endotel hücreleri komşu endotel hücreleriyle veya farklı hücrelerle ve ekstrasellüler matriks ile etkileşimler kurmak için adezyon molekülleri olarak isimlendirilen bazı moleküller sentezlerler. Yine son yıllarda yapılan çalışmalar; embriyogenez, hücre büyümesi ve farklılaşması, sitotoksite, antijen sunumu, bazı kan hücrelerinin damar dışına çıkması, virus ve parazitlere bağlanma, tümör hücreleri ile etkileşim ve hatta sinyal iletimi gibi bir çok olayda adezyon moleküllerinin önemli rolleri olduğunu göstermiştir.

İntersellüler adezyon molekülü-1 ve vasküler hücre adezyon molekülü-1, immünooglobulin süperalesinden olan ve hücre-hücre etkileşimlerini sağlayan adezyon moleküllerindendir. Bunlar, özellikle inflamasyon sırasında olmak üzere, bir çok olayda aracılık etmektedirler.

Birçok faktörün yanı sıra özellikle VEGF'in indükleyici etkisiyle, endotel hücrelerinin; birbirleri, diğer hücreler ve matriksle olan bağlantılarını ve iletişimini sağlayan adezyon moleküllerinden olan VCAM-1 ve ICAM-1 moleküllerinin; VEGF'den başka hangi moleküllerin indükleyici etkisi altında, ne kadar miktarda sentezlendiğinin bilinmesi son derecede önemlidir. Ayrıca, VCAM-1 ve ICAM-1

moleküllerinin sentezinde VEGF'ün tek başına mı etki ettiği, yoksa başka molekül veya hücrelerin buna yardımı olup olmadığı konusu açık değildir. Diğer moleküllerin etkisi, varsa hangilerinin ne oranda bu etkiye yardım ettiğinin belirlenmesi ve bunların engellenebilmesi ancak her birinin etkilerinin ayrı ayrı belirlenmesi ile mümkün olur. Bu sorulara cevap verebilmek için endotel hücrelerinin organizmadan ayrılması ve tek başlarına kalmalarının sağlanması gerekir. Böylece diğer hücrelerin endotel hücrelerine direkt ya da indirekt olarak etkilemelerinin engellenmesi gerekmektedir. Yine sadece VEGF'ün etkilerini görmek, başka hormon veya moleküllerin bu olayda olası rollerini engellemek için de deneylerin öncelikle *in vitro* olarak sürdürülmesi gerekir.

Bu çalışmada amacımız; insan göbek kordon veninden elde edilen endotel hücrelerin kültürünü yapmak ve diğer çalışmalara temel olması amacıyla endotel hücrelerinin ICAM-1 ve VCAM-1 açısından VEGF'e gösterdiği cevabı, başka hiçbir hücre veya molekülün etkisi olmadan tek başına görmektir.

Bunun için endotel hücreleri bir süre kültür ortamında beslenerek bu ortama alıştırdı. Sonra deney için %2 Fötal Sığır Serumunu (Fetal Bovine Serum, FBS) içeren medyum ile sınırlı bir süre beslendiler. Bu sayede sadece canlılıklarını sürdürebilecekleri; çoğalmalarını, sentezlerini, çevreyle ve birbirleriyle iletişimlerini minimuma indirdiler. Daha sonra beslenme medyumlarına sadece belirli bir miktar VEGF eklenerek, sınırlı bir süre sonunda hücreler tesbit solusyonu ile tesbit edildiler. Sonrasında ise, endotel hücrelerinin sadece VEGF etkisi altında belirli bir sürede sentezleyerek hücre yüzeyine ICAM-1 ve VCAM-1 molekülleri eksprese edip etmedikleri immünohistokimyasal yöntem kullanılarak incelendi. Bu arada endotel hücrelerinin morfolojisi de gözlemlendi.

Bu çalışmamızda elde edilecek sonuçlar kolay ve güvenilir bir endotel hücresi kültür modeli yaratacak; akut ve kronik inflamasyon, iltihabi reaksiyonlar ve hücre göçü ile bunlara etki eden faktörlerle ilgili bir çok çalışmaya temel teşkil ederek, ışık tutacaktır.

Sonuç olarak; bu ve benzeri çalışmalarla, kolay ve güvenilir bir endotel hücresi kültür ortamı oluşturularak, hem inflamasyon ile ilgili bilgiler gelişecek, hem de bu olaylar bazı aşamalarda bloke edilerek akut veya kronik bir çok hastalığın tedavisinde yeni klinik yaklaşımlara ulaşılabilecektir.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereç

Bu tezde kullanılan tüm araç-gereç markaları ve ülkeleri ile birlikte aşağıda belirtilmiştir.

3.1.1. Cihazlar

Araştırma mikroskobu (Fotograf ataçmanlı), Olympus BX 50 (Japan)

Fotograf ataçmanı, Olympus PM 20 (Japan)

İnverted mikroskop, Leitz (Germany)

Laminar Flow, Özge A.Ş. (Türkiye)

İnkübatör CO₂'lü, Heraeus auto zero (Japan)

Santrifüj, Nüve NF 815 (Türkiye)

Çalkalamalı su banyosu (Ben Mari Shaker), Nüve ST 402 (Türkiye)

Sıvı nitrojen tankı, Linde LR 31 (Germany)

Sıvı nitrojen taşıma kabı, MVE Lab 4 (USA)

Soğutucu (-25), Bosch (Germany)

Soğutucu (-86), Nuire (USA)

PH metre, Hanna (Portugal)

Hassas terazi, Scaltec SPB 42 (Canada)

Manyetik karıştırıcı, Velp Scientifica (İtaly)

Pasteur fırını, Elektro-Mag 6040 BP (Türkiye)

Pipet aid, Drummond (Japan)

Distile su cihazı, GFL 2012 (Germany)

Otoklav, Schaerer Ecoline (Germany)

Mikropipet seti, Eppendorf (Germany)

Filtre (cam) 0,22 µm, Sartorius AG (Germany)

Vortex, Nüve NV 110 (Türkiye)

Laboratuvar saati, Möller (Germany)

Humidity chamber, BioGen (Türkiye)
Thoma Lamı, Isolab (Germany)

3.1.2. Laboratuvar Malzemeleri

Mikropipet ucu, Eppendorf, (Germany)
Lam, Temas (Germany)
Lamel, Marienfeld 15mm (Germany)
Steril disposable Filtre, Milipore millex 0,22-0,45 µm (USA)
Filtre kağıdı 0,22 µm, Sartorius AG (Germany)
Steril enjektör (0,5-2-5-10-20-50 ml), Hayat (Türkiye)
Steril hücre kültür flaskı, TPP 25-75 cm² (Switzerland)
Steril petri kabı, TPP 50 cm² (Switzerland)
Steril hücre kültür plate, TPP 12well/plate (Switzerland)
Steril santrifüj tüpü, TPP 15-50 ml (Switzerland)
Steril cryotube- TPP 2 ml (Switzerland)
Mikrocerrahi set, Lipshaw (Germany)
Beher, Isolab 100-600 ml (Germany)
Steril plastik pipet, LP Italiana SPA 2-5-10-25 ml (Italy)
Mezür, Isolab 100-250-500 ml (Germany)
Steril Gazlı bez, (Türkiye)
Fotograf filmi, Kodak 100/36 (Japan)
Pap-pen, Zymed (USA)
Bidistile H₂O, (GFL 2012 ile elde edilmiş)
Aluminyum folyo, Koroplast (Türkiye)

3.1.3. Kimyasal Maddeler

Paraformaldehit, Merck (Germany)
NaH₂PO₄*2H₂O, Merck (Germany)
HNa₂O₄P*12H₂O, Merck (Germany)

Sodyum klorür, Sigma (USA)
Etanol absolute, Riedal de Haen (Germany)
%96 Etanol, Tekel (Türkiye)
Gentamisin 80 mg Genthaver, Biosel (Türkiye)
Hidrojen peroksit, Raftel (Türkiye)
Metanol absolute, Merck (Germany)
Tripan blue, Sigma (USA)

3.1.4. Hücre Kültür Solusyonları

HEPES, Sigma (USA)
L-Glutamin, Sigma (USA)
Sodyum bikarbonat, Sigma (USA)
Fenol red, Sigma (USA)
Penisilin-Streptomisin Solusyonu 20 ml, Biological Industries (Israel)
Tripsin-EDTA solusyonu 100 ml, Biological Industries (Israel)
Fetal Calf Serum 500 ml, Biological Industries (Israel)
Fibronektin 1 ml, Biological Industries (Israel)
Medium-199 (for 5 L) powder, Biological Industries (Israel)
Hank's balanced Salt Solution, Sigma (USA)
Endothelial Cell Growth Supplement, BD Biosciences (USA)
Vascular Endothelial Growth Factor, BD Biosciences (USA)

3.1.5. İmmünotokimya da kullanılan kimyasal madde ve solusyonlar

ICAM-1 (fare monoklonal) sc 8539 200 µg, Santa Cruse (USA)
VCAM-1 (tavşan poliklonal) sc 8539 200 µg, Santa Cruse (USA)
%10 goat blocking serum 15 ml, Zymed 50-197 (USA)
Biyotinle işaretli Sekonder Ab 15 ml (geniş spektrum), Zymed 50-441 (USA)
Streptavidin-Peroksidase 15 ml, Zymed 50-420 (USA)
Likid DAB+Substrate kit, Zymed 00-2020 (USA)

Bovin Serum Albumin, Sigma A 3912 (USA)

Triton X-100, Sigma (USA)

3.1.6. Hazırlanan Çözeltiler ve Medyumlar

Ca⁺²-Mg⁺² free fosfat tamponu (CM-free PBS); NaCl 8 g, KCl 0,25 g, KH₂PO₄ 0,25g, Na₂HPO₄ 1,44 g bir kaba koyulur ve üstüne 1 L'ye tamamlanuncaya kadar bidistile su konarak manyetik karıştırıcıda karıştırılır. Bu çözeltinin pH'sı 7.4 olmalıdır.

Fosfat tamponu saline (PBS); 1 L distile suya 11,4 g Na₂HPO₄, 2,4 g NaH₂PO₄ koyularak manyetik karıştırıcıda 20 dakika karıştırılır ve sonra üzerine 9 g sodyum klorür eklenir.

PBS-Tx; 1 L PBS içerisine 0,4 mL Triton X-100 koyularak manyetik karıştırıcıda 1 saat karıştırılarak hazırlanır.

Bikarbonat-Fenol Red solusyonu; 200 mL bidistile suya 8,8 g sodyum bikarbonat ve 6 mg fenol red koyularak hazırlanır.

Serumsuz medyum; 400 mL M-199 medyumuna içine, 5 mL Penisilin-Streptomisin, 20 mL Bikarbonat-Fenol Red solusyonu koyulur.

Kültür medyum; 80 mL serumsuz medyum, 20 mL FBS koyularak %20 FBS içeren M-199 (kültür medyum) hazırlanmış olur.

%2 serumlu kültür medyum; 98 mL serumsuz medyum içerisine 2 mL FBS koyularak hazırlanır.

ECGS içeren Kültür medyum; ise her 1 ml kültür medyumuna 50 µg ECGS koyularak hazırlanır.

VEGF içeren deney medyum; 120 ng VEGF, 12 mL %2 serumlu medyum içine koyularak mL'de 10 ng olacak şekilde hazırlanır.

%4'lük Paraformaldehit solüsyonu; 1 L distile suya 11,4 g Na₂HPO₄, 2,4 g NaH₂PO₄ koyulup manyetik karıştırıcıda 20 dakika karıştırılarak fosfat tamponu hazırlanır. 1 L fosfat tamponunun içine 40 g paraformaldehit eklenir ve solusyon berraklaşınca kadar yaklaşık 60 °C'de karıştırılır ve süzülür.

%1'lik Buffer one; 100 mL PBS içerisine 1 g Bovine Serum Albumin koyularak hazırlanır.

%3'lük Hidrojen peroksit (H₂O₂) solüsyonu; 100 mL absolute metanol içine 3 mL H₂O₂ koyularak karıştırılır.

DAB solüsyonu; 1 mL distile suya DAB kitinde bulunan reagent 1'den bir damla koyularak vortex ile iyice karıştırılır. Sonra üzerine birer damla reagent 2 ve reagent 3 damlatılarak vortex yardımıyla yine iyice karıştırılır. Ve bu karışım hemen kullanılır.

DAB-enhancer solüsyonu; 1 mL distile suya DAB kitinde bulunan reagent 4'den (enhancer) bir damla koyularak vortex ile iyice karıştırılır. Hemen kullanılmalıdır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Endotel Hücrelerin Eldesi

Kocaeli SSK Bölge Hastanesi Doğum Servisi'nden sezaryen ile gerçekleştirilen ve HBs Ag, Anti-HCV, Anti-HIV 1-2 testleri negatif olan bir doğumdan göbek kordonu alındı. Sezaryen ile doğumun tercih edilme nedeni, buradan elde edilecek olan insan göbek kordonunun daha steril şartlarda alınacak olması ve normal doğumdaki gibi kordonu travmatize edecek tekniklerin daha az kullanılması dolayısıyla kordonun ve endotel hücrelerinin mümkün olan en az hasarla elde edilmesidir. Yine kordonun travmanın daha az olduğu bebek tarafındaki kısmı tercih edildi. Normalde 55-65 cm uzunluğunda olan (Sternberg, 1997) kordonun, bebeğe yakın olan yaklaşık 35'lik cm kısmı alınarak, hemen içinde HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), Hapes, Gentamicin ve sodyum bikarbonat olan steril kord saklama solusyonuna koyuldu. 3 saat içinde kullanılmak üzere +4 °C de saklanarak, Tübitak Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Moleküler Hücre Biyolojisi Laboratuvarına götürüldü. Burada laboratuvar personeli tarafından gerekli işlemlerden geçirilerek endotel hücreleri elde edildi. Daha sonra yine bu laboratuvar tarafından elde edilen hücreler kültüre edildi. Konfluent olan

hücrelerin bir kısmı ileri pasajlara alınırken, diğer kısmı elde edilen endotel hücrelerinin başka hücrelerle karışık olup olmadığının belirlenmesi için (saf kültür) immünohistokimyasal incelemeye alındı. Bu incelemede endotel hücrelerine spesifik olan von-Willebrand faktör immünohistokimyasal yöntemle görüntülendi. Saflığı kanıtlandıktan sonra; ileride yapılacak olan çalışmalarda kullanılmak üzere, değişik pasajlara kadar kültüre edilerek bu farklı pasajlar soğuğa dayanıklı kriyotüpler içinde ilk önce saatte 1 °C olmak üzere -80 °C'ye kadar donduruldu ve sonra -196 °C sıvı nitrojene koyularak kullanılacağı zamana kadar bu ısıda saklandı.

Endotel hücresi elde etmek amacıyla insan göbek kordonları üzerinde yapılan çalışmalar sırasında, dikkat edilmesi gereken bazı önemli noktalar vardır. Endotel hücre kültürünün mümkün olduğunca saf kültür olabilmesi ve diğer hücre çeşitleriyle kontamine olmaması için bazı tedbirler alınması gerekmektedir. Öncelikle kan hücrelerinin endotel hücreleri arasına karışmasının engellenmesi için, göbek kordonunun hücre ayırma işlemine alınmadan önce PBS ile bir kaç kez iyice yıkanması önemlidir. Ayrıca fibroblast ve düz kas hücrelerinin endotel hücreleri arasına karışmasının engellenmesi için kollajenaz ile muamele edilecek olan göbek kordonunun zedelenmiş ve hasarlı bölgelerinin çalışma dışında tutulması gerekir. Yine kollajenaz enzimi uygulama süresinin çok iyi belirlenmesi gerektiği; fazla uygulanması durumunda düz kas hücreleri ve fibroblastlar kültüre karışmakta, az uygulanması durumunda ise yeterli miktarda endotel hücresi elde edilememektedir.

Çalışmamızda kullandığımız endotel hücreleri, yukarıda elde edilişi anlatılan bu hücre hattının 4. pasajından alındı.

Kriyotüp içinde Tübitak'tan alınan 4. pasaj endotel hücreleri, özel bir sıvı-nitrojen taşıma kabıyla İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Bölümü'ne götürüldü. Hücre kültürü ile ilgili çalışmalar buradaki Hücre Kültür Laboratuvarı'nda yapıldı.

3.2.2. Fibronektin Kaplama

Endotel hücreleri fibronektine bağlanarak daha iyi ve sağlıklı bir şekilde büyüdükleri için, kültüre edilecekleri flaslara ve deney yapılacak kuyucukların (well) içine koyulacak yuvarlak lamellere fibronektin kaplanması işlemi yapıldı. Bu işlem de hücre kültüründe bir çok basamakta olduğu gibi laminar flow altında yapıldı.

Flaslara fibronektin kaplama; 40 µg/mL olarak hazırlanmış fibronektin su banyosunda 37 °C'ye getirilerek 75 cm²'ye 12 mL olacak şekilde koyuldu. 30-40 dakika beklendi. Sonra bu sıvı uzaklaştırıldı.

Lamellere fibronektin kaplarken; önce lameller laminar flowda %96'lık alkolde yıkıldı ve kuyucukların içine yerleştirildi. Sonra ise herbirinin üzerine 50 µL fibronektin koyularak 30-40 dakika beklendi, sıvı geri alındı ve lameller kullanıma hazır hale getirildi.

3.2.3. Endotel Hücrelerin Çözülmesi ve Kültürü

Kriyotüp sıvı nitrojenden çıkarıldı ve hemen 37 °C su banyosuna koyulup çalkalanarak çözüldü ve hemen %70 alkol ile silinerek laminar flowa alındı. Hafifçe pipetlenerek hücreler dağıtıldı ve %20 Fetal Bovine Serum (FBS) ve M-199 içeren kültür medyumunun olduğu steril bir tüpe alındı. Sonra 5 dakika sanrifüj edildi. Santrifüj bittiğinde tüp tekrar alkolle silinerek laminar flowa alındı. Burada üstte kalan medyum çekilerek atıldı. Kalan pellet elle karıştırıldı. Sonra tekrar medyum eklenip, pipetlenerek karıştırıldı. Eldeki canlı hücrelerin sayısını belirlemek için bu hücre karışımından bir miktar alınarak Thoma Lamı'nda sayıldı. Daha parlak olanlar (canlı hücreler), gri ve mat olanlardan (ölü hücrelerden) ayrılarak sayıldı. Daha sonra bu hücreler önceden fibronektin kaplanmış 75 cm²'lik steril kültür flaslarna ekildiler. Üzerlerine de ECGS içeren kültür medyumunu konarak laminar flow'dan çıkarıldı ve 37 °C'deki karbondioksit inkübatörüne koyuldular. Dondurmayı takiben ilk kez çözülen hücrelerin medyumunu ertesi gün değiştirilerek tazelendi. Daha sonraki

değiştirmeler ise medyumun rengine ve hücre artıklarına da bağlı olarak 2-3 günde bir yapıldı.

3.2.4. Tripsinle Hücre Kaldırma ve Pasajlama

Sayıları oldukça artan, birbirlerine iyice yaklaşan ve konfluent olan (çoğaldıkları yüzeyi tam olarak dolduran) hücreler daha rahat çoğalacakları flasklara bölünebilir, eğer gerekiyorsa bir kısmı bu numaralı pasajda dondurularak saklanabilir ya da deneye alınabilirler.

Sonuçta pasajlanarak çoğalmaya devam edecek hücrelerin, tripsin ile yapıştıkları yüzeyden kaldırılmaları gerekmektedir. Bunun için ilk önce flasklar alkolle silinerek laminar flow'a alındı. Üzerlerindeki medyum alındı ve yerine 4 mL tripsin-EDTA solusyonundan konularak yaklaşık 3 dakika beklendi. Sonra üzerine 8-10 mL kadar medyum ilave edildi ve yerlerinden kalkmış hücreleri içeren karışım 5 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan medyum steril şartlarda uzaklaştırıldıktan sonra, kalan pelletin üzerine medyum koyularak karıştırıldı ve 2 veya 3 yeni flaska paylaştırıldı. Ancak artık bu hücreler bir ileri pasaj numarasıyla adlandırıldılar.

3.2.5. Hücrelerin Deneye Alınması

Büyüme medyumunu, M-199 medyumunu içine %20 fötal sığır serumu koyularak hazırlanır. Bunun içerisine konan %20 serum endotel hücrelerinin büyüme ve protein sentezi yapmak için ihtiyacı olan vasküler endotel büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü, endotel hücre büyüme faktörü gibi birçok büyüme faktörü, ayrıca birçok hormon, enzim vb maddeleri içerir. Aynı zamanda endotel hücreleri *in vivo* olarak başka hücrelerle de etkileşim içindedir.

Bu çalışmada endotel hücreleri elde edilerek, *in vitro* koşullarda sadece bu hücrelerinin bulunduğu bir kültür ortamı yaratıldı. Bu kültür ortamında, endotel hücreleri başka hiçbir uyarıcı büyüme faktörü, hormon ve hücre etkileşimi olmadan, VEGF ile inkübe edildi. Bu inkübasyon belirli miktarda ve belirli sürede gerçekleştirildi. Tüm bu uygulamalarla endotel hücrelerinin bu büyüme faktörüne

karşı sentezlediği ICAM-1 ve VCAM-1 cevabı araştırıldı. Bunun için de endotel hücreleri deneye alınmadan önce %20 serumun etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla, içinde yaşayabilecekleri minimum miktar olan %2 serumlu medyumda 24 saat bekletildi.

Son pasajlamadan yaklaşık 6-8 gün geçtikten sonra, tekrar konfluent olan hücreler tripsinizasyondan sonra bir kısmı deneye alınmak üzere Thoma Lami'nda sayıldı. Deneye katılmayacak olan hücreler donduruldu. Deneyden kısa bir süre önce fibronektin kaplanan lamellerin içinde bulunduğu 12 kuyucuk içeren kültür kapları, (plate) %70'lik alkol ile silinerek laminar flowa alındılar. Sayılarak miktarları ayarlanan hücreler herbir lamele onbin hücre olacak şekilde ekildiler ve fibronektine yapışmaları için 2 saat geçirmek üzere 37 °C sıcaklıkta ve %5 karbondioksit ayarlı inkübatöre koyuldular. İki saatin sonunda yüzeye yapıştıkları inverted mikroskopta izlendikten sonra, üzerlerine ECGS içeren kültür medyumu koyularak karbondioksit inkübatöründe 37 °C'de 22 saat daha inkübe edildiler. Sonra laminar flowda medyumları alınan hücrelere, deney koşullarına hazırlanmaları amacıyla içinde ECGS içermeyen, %2 serumlu medyum ile 24 saat inkübe edildiler. Hücreler %2 serum içeren bu medyumda 24 saat geçirdikten sonra deney aşamasına geçildi. Bu aşamada verilen %2 serumlu medyum uzaklaştırılıp, kuyucuklardaki tüm hücreler artıklarından kurtulmaları için PBS ile yıkandı. Hücreleri içeren kuyucukların yarısına içerisinde mL'de 10ng VEGF içeren 1'er mL deney medyumu konuldu ve bu grup deney grubunu oluşturdu. Kontrol grubunu oluşturmak için ise hücrelerin bulunduğu kuyucukların diğer yarısına içerisinde %2 serum olan 1 mL medyum verildi. Her iki grup da sekizer saat 37 °C'deki karbondioksit inkübatöründe inkübe edildiler. Geçen 8 saatin sonunda medyum geri alınarak hücreler tesbit edildi ve deney sonlandırıldı.

3.2.6. Hücrelerin Tesbiti ve Saklanması

Deneyin sonunda hücrelerin medyumları çekildi ve 2'şer mL PBS ile yıkandılar. Sonra hücrelerin tesbit edilmesi için 2'şer mL %4'lük paraformaldehit solüsyonu verilerek 1 saat beklendi. Tesbitin tamamlanmasının ardından paraformaldehitin uzaklaştırılması için herbir kuyucuk içindeki lameller ikişer kez

2'şer mL PBS ile yıkandı. Sonra ise saklanmaları amacıyla, +4 °C'de PBS koyulup, bu ısı korunarak laboratuvarımıza nakledildiler.

3.2.7. Hücrelerin gruplandırılması

Boyanmaya hazır olan hücreler gruplara ayrıldı. Hücrelerin bir kısmı ICAM-1 grubu ve bir diğer kısmı da VCAM-1 grubu olmak üzere ikiye ayrıldı. Yine her bir grup primersiz, kontrol ve deney olmak üzere kendi arasında üç alt gruba bölündü. Sonuç olarak ICAM-1 grubunun alt gruplardan birincisi; ICAM-1 grubundaki hücrelerin bir bölümüne VEGF verilmeyerek kontrol grubunu, ikincisi; hücrelerin bir bölümüne de 10 ng/mL VEGF verilerek deney grubunu, üçüncüsü de; yine deney grubundaki hücrelerin bir kısmına boyanmanın negatif kontrolü olmalarını sağlamak amacıyla, ICAM-1 primer antikoru uygulanmayarak primersiz negatif kontrol grubunu oluşturular. Primersiz grubun deney grubundan seçilmesinin amacı deney grubunun daha fazla immün pozitif boyanacağını tahmin edilmesiydi. Aynı gruplama işlemi VCAM-1 grubu içinde yapıldı.

3.2.8. Hücrelere İmmünohistokimya Uygulanması

İlk önce, +4 °C'de buzdolabında saklanan well-plate'lerin içindeki lameller üzerinde fikse edilmiş olan endotel hücreleri üzerindeki PBS uzaklaştırıldı. Sonra lamellerin endotel hücrelerinin bulunduğu yüzeyine zarar vermeden kuyucukların içinden çıkarıldılar. Daha sonra bu lamellerin her biri bir lam üzerine yapıştırılarak, immünohistokimya protokolünün uygulanabilmesi için hazırlandılar. Sonra uygulamaya geçildi.

İlk önce 10 dakika PBS'te bekletilen lamlar, daha sonra hücrelerdeki endojen peroksidaz aktivitesini yok etmek için saf metanol içinde %3'lük H₂O₂ solüsyonunda 15 dakika bekletildi. Bu reaksiyonu sona erdirmek ve hücre membranında delikler açmak için PBS-Tx'de 5 dakika bekletilen hücreler, antikorların hücrelerde bir başka yere bağlanmasını engellemek amacıyla, 15 dakika non-immün serum ile muamele edildiler. Bu sürenin sonunda oluşan bağlantıların kopmaması için, non-immün

serum yıkanmadan sadece dökülerek bir sonraki basamak olan primer antikor uygulanması aşamasına geçildi. Hem kontrol grubu, hem de deney grubundaki hücrelerin yarısına buffer-one ile 1:100 oranında dilüe edilmiş primer antikor olan anti-ICAM-1 antikorunu, diğer yarısına ise yine buffer-one ile 1:200 oranında dilüe edilmiş diğer primer antikor olan anti-VCAM-1 antikorunu nemli ortamda ve oda ısısında 24 saat uygulandı. Ayrıca, negatif kontrolü sağlamak amacıyla bir grup hücreye de primer antikor yerine sadece onun dilüe edildiği buffer-one kondu. 24 saatin sonunda tüm hücreler 5'er dakika süreyle ikişer kez PBS-Tx'de yıkandı. Sonra, biyotinle işaretli sekonder antikor aşamasına geçilerek, hücreler 30 dakika inkübe edildiler. Bu sürenin sonunda tekrar 5'er dakika süreyle ikişer kez PBS-Tx'de yıkandı ve tüm gruplar streptavidin-peroksidaz ile 15 dakika muamele edilerek tekrar yıkama aşamasına geçildi. Yine 5'er dakika süreyle ikişer kez PBS-Tx'de yıkandıktan sonra, taze hazırlanan DAB solüsyonu ile kontrollü olarak 3-4 dakika muamele edildiler. Distile suda üç kez 5'er dakika iyice yıkandıktan sonra, oluşan rengi kuvvetlendirmek için 1-2 dakika kontrollü olarak DAB-enhancer solüsyonunda tutuldular. Renklenmenin uygun olduğuna kanaat getirildikten sonra, distile suyla tekrar iki kez 5'er dakika yıkandılar. Yıkanmanın ardından çekirdeğin daha net görülebilmesi ve ayrılabilmesi için 1-2 dakika kontrollü olarak hematoksilin ile zıt boyama yapıldı ve tekrar 10 dakika çeşme suyunda yıkandı. Daha sonra sırasıyla %70, %80, %90, ve %100'lük etanol serilerinden 5'er dakika geçirilerek suyu alındıktan sonra, hücreleri şeffaflaştırmak için iki kez 5'er dakika ksilolden geçirildi. En sonunda iyice şeffaflaşmış kapanmaya hazır hale gelen hücreler, entellan ile kapatılarak 24 saatliğine kurumaya bırakıldı.

3.2.9. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Her bir grup için ikişer lamel üzerinde rastgele seçilen ve 40x10 büyütmede onar alanda sayım yapıldı. Hücrenin immün pozitif olması için, kahverengi boyanması kriteri olarak kabul edildi. Kahverengi boyanmayan hücreler immün negatif kabul edildi. Sonuç olarak her bir ana grup (ICAM-1, VCAM-1) için 20 kontrol, 20 de deney (VEGF+) grubundan toplam 40 alan seçilerek immün pozitif olan ve immün negatif olan hücreler sayıldı. Aynı işlem VCAM-1 grubunda da

yapıldı. ICAM-1 grubu için deney ve kontrol alt grupları birlikte ve yine VCAM-1 grubu için de aynı alt gruplar birlikte değerlendirildi. ICAM-1 ve VCAM-1 gruplarına ayrı ayrı ki-kare testi uygulanarak istatistiksel olarak anlamlılığına bakıldı. **P< 0,05** değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Endotel Hücre Kültürüyle İlgili Genel Bulgular

Endotel hücrelerinin yapışması ve çoğalması için kültüre edilecekleri kültür kaplarının fibronektin ile kaplandığında, kaplanmadan ekilen hücelere göre daha hızlı yapıştıkları ve konfluent oldukları görüldü. Kordonlardan elde edilen endotel hücreleri, flasklara ekildiklerinde hem tek tek, hem de gruplar halinde rastgele dağıldıkları görüldü. Bu hücrelerin yapışmaları ve çoğalmaları incelendiğinde; tek tek ve birbirinden uzak yerleşenlerin daha zor ve uzun sürelerde, birbirlerine daha yakın ve gruplar halinde olanların ise daha kolay ve hızlı çoğaldıkları gözlemlendi. Fibronektin kaplı bir alana ekilen hücrelerin ilk 30-60 dakikada yapışmaya başladıkları, 2-3 saat sonunda da çoğunun yapışmalarını tamamladıkları ve yüzeye yayıldıkları görüldü. Yapışan hücre kolonilerinin yıldız şeklinde yayıldığı ve sonunda birleşerek 7.-9. günlerde konfluent oldukları görüldü. İkinci ve sonraki pasajlarda ise hücrelerin 6. ile 8. günler arasında konfluent oldukları görüldü. Ancak bu rakamın hücre yoğunluğu ile de orantılı olduğu ve az hücre içeren kültürlerde daha da uzadığı tesbit edildi. Endotel hücrelerinin çoğalma safhasında, yani daha konfluent olmadıklarında ince ve uzun sitoplazmik uzantılara sahip oldukları, ancak konfluent olduklarında şekillerinin poligonal olduğu ve uzantılarının azaldığı görüldü. Konfluent olan ve pasajlama yapılması için tripsinlenen hücrelerin bir kısmında kullanılan tripsin-EDTA solüsyonunun 5 dakikanın üzerinde uygulandığı durumlarda, pasajlanan hücrelerin yapışma ve çoğalmalarının daha da uzadığı görüldü. Yine uzun süre tripsin-EDTA solüsyonunda kalan hücrelerin canlılık oranlarının da azaldığı (%70'lere indiği) tesbit edildi. Bu azalmanın tripsinin hücelere toksik olmasından dolayı meydana geldiği düşünüldü. Hücrelerin tripsin-EDTA solüsyonuna maruz kaldıkları süreyi kısaltmak amacıyla, bu kimyasal ayırma işlemine ek olarak, eş zamanlı mekanik ayırma işlemi de uygulandığında, hücrelerin canlılık oranlarının arttığı ve yapışma sürelerinin azaldığı saptandı.

Dondurulan hücreler çözülürken de benzer sorunlarla karşılaşıldı. Burada etkenin dondurma solüsyonunda bulunan dimetilsülfoksit (DMSO) olduğu

düştünüldü. Bu sorunu çözmek ve oranları yükseltmek amacıyla; hem dondurulan hücrelerin çözüme esnasında DMSO'ya daha az maruz kalmasını sağlamak için bu işlem mümkün olduğunca hızlandırıldı, hem de dondurma solüsyonunda bulunan kültür medyumundaki FBS oranlarını %20'den %50'ye çıkarılarak hücrelerin çözüldüklerinde ilk olarak karşılaştıkları sıvı ortam serumdan daha zengin hale getirildi. Böylece bir yandan canlılık oranları yükselirken, diğer yandan hücrelerin yapışma ve konfluent olma zamanlarının düştüğü tesbit edildi.

Deneye alınmadan önce, tripan mavisi ile yapılan canlılık testleri ile canlılık oranının yaklaşık %94-96 arasında olduğu saptandı. Deneye hazırlanan hücreler, pasajlamalar sırasında pasajlamanın olumsuz etkilerini yok etmek amacıyla, 24 saat %20 serum ve ECGS içeren kültür medyumunda tutulduğunda, tabana daha iyi yapıştıkları ve yayıldıkları görüldü. Sonra minimum yaşam koşullarına alınmak üzere %2 serum içeren medyumda 24 saat tutulan endotel hücreleri, bu ortamın etkilerini saptamak amacıyla yeniden incelendiğinde; çoğalmalarının durma aşamasına geldiği ve çoğalma göstergesi olan mitoz çekirdeği görüntülerine sadece iki veya üç alanda bir rastlandığı tesbit edildi (Şekil 4.7). Geçen 24 saatlik sürenin sonunda; hücrelerin 1/3 gibi önemli bir kısmının yapıştığı fibronektini bıraktığı ve ölererek yüzeyde toplandığı tesbit edildi. Ölen hücrelerin yerlerinde büyük boşluklar olduğu görüldü (Şekil 4.20). Yine %2 serumlu medyumda kalan hücrelerin morfolojileri incelendiğinde; bazılarının sitoplazmalarında var olan vakuollerin arttığı gözlemlendi (Şekil 4.9 ve 4.14). Bu vakuollerin önemli bir kısmının özellikle çekirdek çevresinde toplandığı görüldü (Şekil 4.14). Ancak incelendiğinde bu hücrelerin çekirdeklerinin sağlam olduğu ve çekirdekçiklerinin görüldüğü saptandı (Şekil 4.8).

4.1. İntersellüler Adezyon Molekülü-1 (ICAM-1) İle İlgili Bulgular

ICAM-1 grubunda sadece %2 serumlu medyum verilen kontrol (VEGF-) grubuna bakıldığında; 8 saatlik deneyin sonunda hücrelerin bir kısmının daha ölererek yüzeye çıktıkları ve sitoplazmalarında vakuollerin varlığının devam ettiği görüldü (Şekil 4.9). Ancak, tabana tutunan hücrelerin çekirdeklerinin sağlam olduğu ve çekirdekçiklerinin de izlenebildiği görüldü. Hücrelerin morfolojik yapıları

incelendiğinde; poligonal şekilli, hücre sınırları çok belirgin olmayan, merkeze yerleşmiş bir çekirdek ve içerisinde seçilebilen bir ya da iki adet çekirdekçik olduğu saptandı (Şekil 4.8). Çoğalan hücrelere nadir olarak rastlandı.

Kontrol grubunda anti-ICAM-1 ile yapılan immünohistokimyasal boyamada; bazı hücrelerin immün pozitif reaksiyon vererek kahverengi boyandıkları görüldü (Şekil 4.6, 4.7 ve 4.9). Kahverengi boyanarak immün pozitif reaksiyon veren hücrelerin, toplam hücrelere oranının %22,6 olduğu görüldü (Çizelge 4.1; Şekil 4.1). ICAM-1 grubunda immün pozitif hücrelerin sayılan alan başına düşen ortalama hücre sayısı hesaplandığında, kontrol grubunda $4,4 \pm 1,6$ olduğu saptandı (Çizelge 4.2; Şekil 4.2). İmmün reaktivitenin bazı hücrelerde oldukça belirgin olmasına rağmen, bazılarında daha az belirgin olduğu görüldü (Şekil 4.6 ve 4.7). Geri kalan hücrelerde ise boyanma olmadığı, sadece çekirdeklerinin hematoksilin ile maviye boyandıkları görüldü (Şekil 4.9.). İmmün reaktivite göstermeyen bu hücrelerin de %77,4 oranında bulunduğu saptandı (Çizelge 4.1).

İçinde 10ng/mL VEGF olan %2 serumlu medyum verilen deney grubunda ise; VEGF verilmesini takiben geçen 8 saat sonunda, mitoz çekirdeklerinin artmaya başladığı gözlemlendi (Şekil 4.11 ve 4.12). Ayrıca kuyucuk yüzeyinde toplanan ölü hücrelerde, kontrol grubuna kıyasla önemli bir azalma olduğu görüldü. Yine bu grupta hücrelerin sitoplazmalarında vakuollerin varlığının devam ettiği görüldü (Şekil 4.12 ve 4.13).

Deney grubunda anti-ICAM-1 ile yapılan immünohistokimyasal boyamada, bir çok hücrenin immün reaksiyon vererek kahverengi boyandığı gözlemlendi (Şekil 4.13). Hücreler sayıldığında immün reaktivite oranının %92 olduğu görüldü (Çizelge 4.1; Şekil 4.1). Deney grubunda alan başına düşen ortalama immünoaktif hücre sayısının $18,9 \pm 4,1$ olduğu saptandı (Çizelge 4.2; Şekil 4.2). Deney ve kontrol gruplarında ortalama immünoaktif hücre sayıları karşılaştırıldığında, $P < 0,001$ bulundu ve anlamlı fark olduğu görüldü.

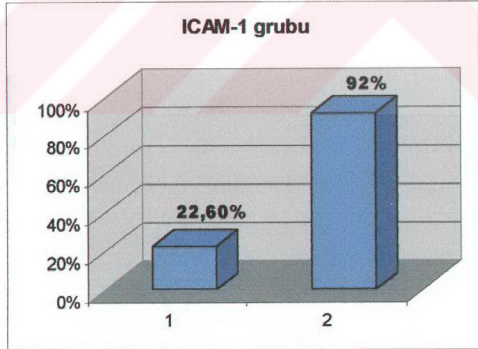
Kontrol grubunda olduğu gibi deney grubunda da hücrelerin bazılarının az, bazılarının ise oldukça fazla olmak üzere değişik derecelerde boyandıkları görüldü (Şekil 4.12 ve 4.14). İmmün pozitif boyanan hücrelere bakıldığında kahverengi olarak oluşan rengin hematoksilin ile maviye boyanan çekirdeklerin üstünde de olduğu görüldü (Şekil 4.13 ve 4.14). Geriye kalan az sayıdaki hücrede ise immün

renk almadıkları belirlendi (Şekil 4.11). Bu immün negatif hücrelerin oranının %8 olduğu saptandı (Çizelge 4.1).

ICAM-1 grubunda; deney ve kontrol gruplarında toplam immün pozitif hücrelerin tüm hücrelere oranları ki-kare testi ile karşılaştırıldığında, $P < 0,001$ olarak bulundu ve anlamlı fark olduğu görüldü.

ICAM-1	İmmün pozitif hücrelerin yüzdesi	İmmün negatif hücrelerin yüzdesi
Kontrol grubu	%22,6	%77,4
Deney grubu	%92	%8

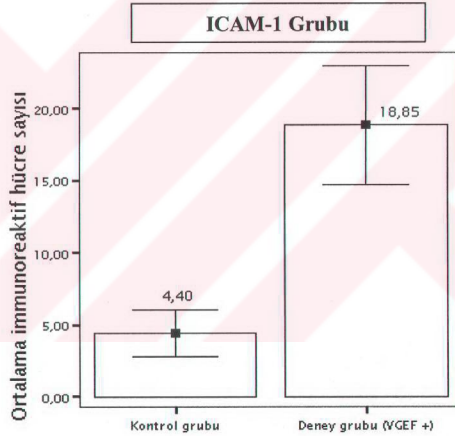
Çizelge 4.1. ICAM-1 kontrol ve deney gruplarında 20'şer alanda sayılan immün pozitif ve immün negatif hücrelerin, toplam hücrelere göre yüzdesini gösteren çizelge.



Şekil 4.1. ICAM-1 kontrol(1) ve deney(2) gruplarında 20'şer alanda sayılan immün pozitif hücrelerin, toplam hücreler içindeki oranını gösteren grafik.

Gruplar	Kontrol	Deney (VEGF+)	P Değeri
ICAM-1	4,4±1,6	18,9±4,1	P<0,001
VCAM-1	1,5±0,7	22,8±2,6	P<0,001

Çizelge 4.2. ICAM-1 ve VCAM-1 kontrol ve deney gruplarının her birinde toplam 20'şer alanda sayılan immün pozitif hücrelerin alan başına ortalama değerlerini, standart sapmalarını ve bunların istatistiksel olarak anlamlılığını gösteren çizelge.



Şekil 4.2. ICAM-1 kontrol ve deney gruplarında alan başına düşen ortalama immün pozitif (immünoreaktif) hücreleri ve standart sapmalarını gösteren grafik.

ICAM-1 grubunda boyamanın negatif kontrolünü oluşturan primer antikor kullanılmayan grupta ise; hücrelerde herhangi bir boyanmanın olmadığı, sadece hematoksilen ile maviye boyandıkları görüldü (Şekil 4.16 ve 4.17).

4.2. Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1 (VCAM-1) İle İlgili Bulgular

VCAM-1 grubunda %2 serumlu medyum ile 8 saat daha geçiren kontrol grubundaki hücelere morfolojik özellikleri yönünden bakıldığında; bu hücelerin bir kısmının daha ölerек yüzeye çıktıkları ve canlı hücelerde sitoplazmik vakuollerin olduğu görüldü (Şekil 4.23). Hücelerin morfolojik yapıları incelendiğinde; ICAM-1 grubundaki gibi poligonal şekilli, hücre sınırları çok belirgin olmayan (Şekil 4.21 ve 4.23), merkeze yerleşmiş bir çekirdeğe ve içerisinde seçilebilen bir ya da iki adet çekirdekçiğe sahip olduğu saptandı. Mitoz çekirdeklerine yine nadir olarak rastlandı (Şekil 4.20).

Kontrol grubunda anti-VCAM-1 ile yapılan immünositokimyasal boyamada, bazı hücelerin kahverengi boyanarak immün pozitif reaksiyon verdikleri görüldü. İmmün pozitif hücelerin toplam hücelere oranının %8,3 olduğu saptandı (Çizelge 4.3; Şekil 4.3). VCAM-1 grubunda immün pozitif hücelerin sayılan alan başına düşen ortalama sayıları ve standart sapmaları hesaplandığında; kontrol grubunda $1,5\pm 0,7$ olduğu görüldü (Çizelge 4.2; Şekil 4.4). İmmün pozitif boyanmanın bazı hücelerde belirgin olmasına rağmen, bazılarında daha az görüldüğü tesbit edildi (Şekil 4.24). Geri kalan hücelerin ise sadece çekirdeklerinin hematoksilin ile maviye boyandıkları ve immün reaksiyon olmadığı görüldü (Şekil 4.22). İmmün negatif bu hücelerin toplam hücelere oranı hesaplandığında ise %91,7 olduğu görüldü (Çizelge 4.3).

İçinde 10ng/mL VEGF olan %2 serumlu medyum verilen deney grubunda ise geçen 8 saat boyunca, kuyucuk yüzeyinde toplanan ölü hücelerin kontrol grubuna kıyasla azalmış olduğu ve çoğalmayı işaret eden mitoz çekirdeklerinin de arttığı görüldü (Şekil 4.26). Yine kontrol grubunda görülen vakuollerin devam ettiği görüldü (Şekil 4.28).

Deney grubunda anti-VCAM-1 ile yapılan immünositokimyasal boyamada bir çok hücelenin immün reaksiyon vererek kahverengiye boyandığı görüldü (Şekil 4.27 ve 4.28). Hüceler sayıldığında immün pozitif hücelerin oranının ICAM-1 deney grubundakine benzer şekilde ciddi oranlarda arttığı ve %90,1'e yükseldiği görüldü (Çizelge 4.3; Şekil 4.3). Deney grubunda alan başına düşen ortalama immün pozitif hücre sayısının $22,8\pm 2,6$ olduğu saptandı (Çizelge 4.2; Şekil 4.4). Deney ve

kontrol gruplarında ortalama immün pozitif hücre sayıları karşılaştırıldığında, $P < 0,001$ bulundu ve anlamlı fark olduğu görüldü.

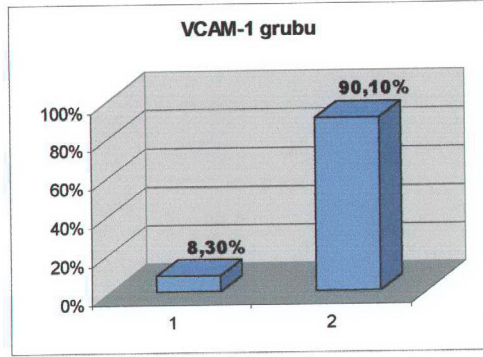
Kontrol grubunda olduğu gibi deney grubunda da hücrelerin bazılarının açık, bazılarının ise koyu olmak üzere değişik derecelerde boyandıkları görüldü (Şekil 4.27 ve 4.29). İmmün pozitif boyanan hücrelere bakıldığında, ICAM-1 grubundaki gibi kahverengi olarak oluşan rengin hematoksilen ile maviye boyanan çekirdeklerin üstünde de olduğu görüldü (Şekil 4.29). Geriye kalan az sayıdaki hücrede ise immün boyanma olmadığı; çekirdeklerinin hematoksilen ile maviye boyanmak dışında bir renk almadıkları belirlendi (Şekil 4.26). Bu immün negatif hücrelerin oranının ise %9,9'a düştüğü tesbit edildi (Çizelge 4.3).

VCAM-1 grubunda; deney ve kontrol gruplarında toplam immün pozitif hücrelerin tüm hücrelere oranları ki-kare testi ile karşılaştırıldığında, $P < 0,001$ olarak bulundu ve anlamlı fark olduğu görüldü.

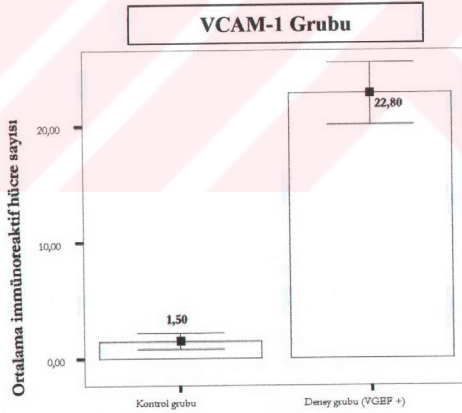
VCAM-1	İmmün pozitif hücrelerin yüzdesi	İmmün negatif hücrelerin yüzdesi
Kontrol grubu	%8,3	%91,7
Deney grubu	%90,1	%9,9

Çizelge 4.3. VCAM-1 kontrol ve deney gruplarında 20'şer alanda sayılan immün pozitif ve immün negatif hücrelerin, toplam hücrelere göre yüzdesini gösteren çizelge.

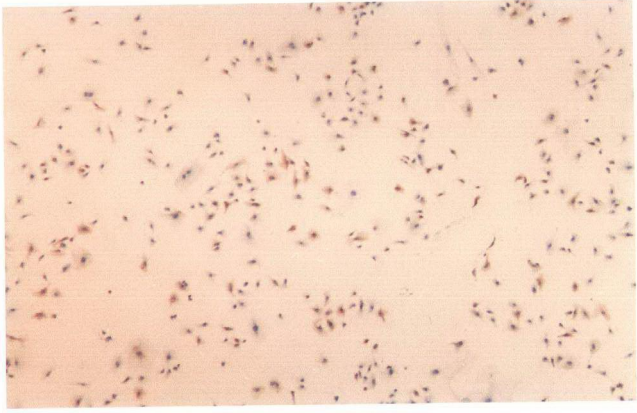
VCAM-1 grubunda boyamanın negatif kontrolünü oluşturan primer antikor kullanılmayan grupta ise; hücrelerde herhangi bir boyanmanın olmadığı, sadece hematoksilen ile çekirdeğin maviye boyandıkları görüldü (Şekil 4.31 ve 4.32).



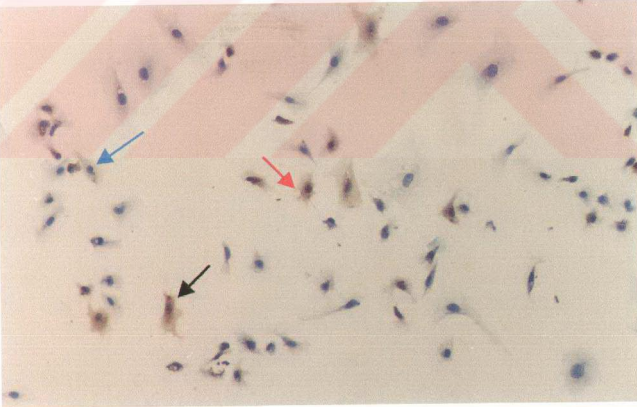
Şekil 4.3. VCAM-1 kontrol(1) ve deney(2) gruplarında 20'şer alanda sayılan immün pozitif hücrelerin, toplam hücreler içindeki oranını gösteren grafik.



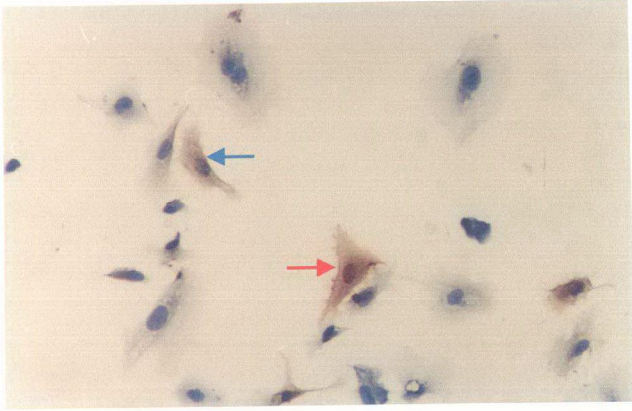
Şekil 4.4. ICAM-1 kontrol ve deney gruplarında alan başına düşen ortalama immün pozitif (immünoreaktif) hücreleri ve standart sapmalarını gösteren grafik.



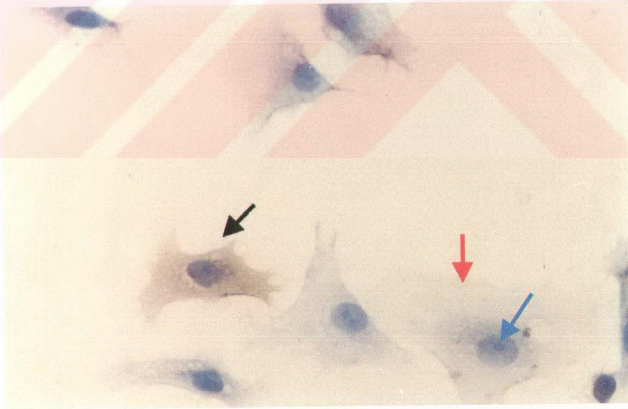
Şekil 4.5. ICAM-1 grubunda, VEGF verilmeyen kontrol grubundaki endotel hücreleri görülmektedir x4.



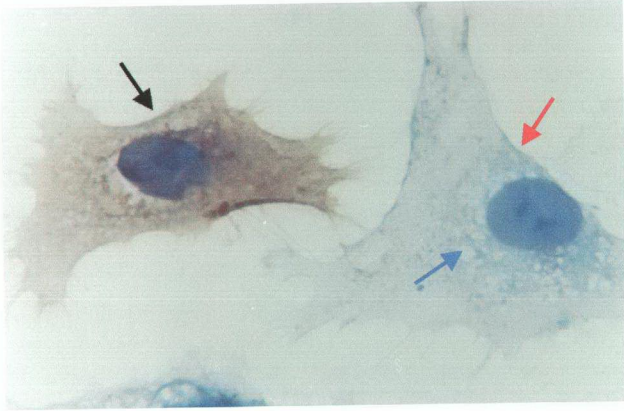
Şekil 4.6. ICAM-1 grubunda, kontrol grubunda kahverengi boyanan immün pozitif endotel hücrelerinin (siyah ok), bir kısmı koyu boyanırken (kırmızı ok), bir kısmı oldukça açık boyanmış (mavi ok), ama her ikisi de immün pozitif kabul edilmiştir x10.



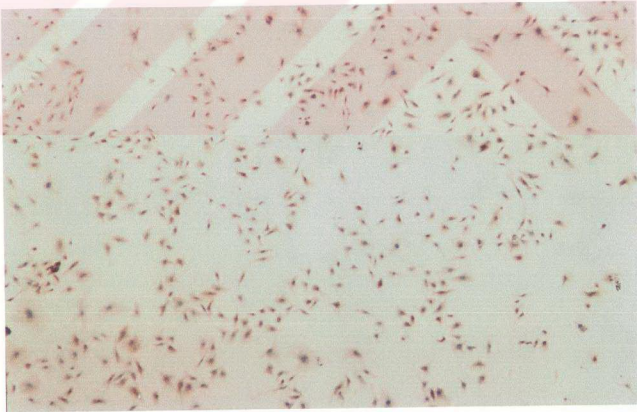
Şekil 4.7. ICAM-1 grubunda, kontrol grubunda kahverengi boyanan immün pozitif endotel hücrelerinin bir kısmı koyu boyanırken (kırmızı ok), bir kısmı oldukça açık boyanmış (mavi ok), ama her ikisi de immün pozitif kabul edilmiştir. Ayrıca mitoz çekirdekleri görülmektedir. x20.



Şekil 4.8. ICAM-1 grubunda, kontrol grubunda endotel hücrelerinin morfolojik özelliklerinden poligonal şekilleri (siyah ok), hücrelerin sınırlarının tam olarak belirgin olmaması (kırmızı ok)'nın aksine çekirdeğin içindeki çekirdekçiklerinin belirgin olduğu görülmektedir (mavi ok) x40.



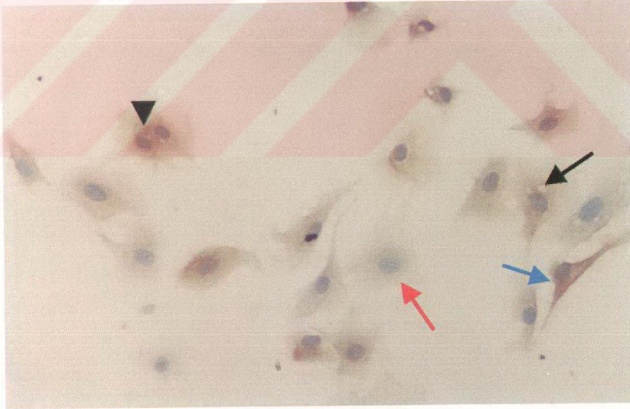
Şekil 4.9. ICAM-1 grubunda, kontrol grubunda endotel hücrelerinin bazıları immün pozitifken (siyah ok), diğerleri immün negatiftir (kırmızı ok). Çekirdeğin çevresinde yoğunlaşmış vakuoller görülmektedir (mavi ok) x100.



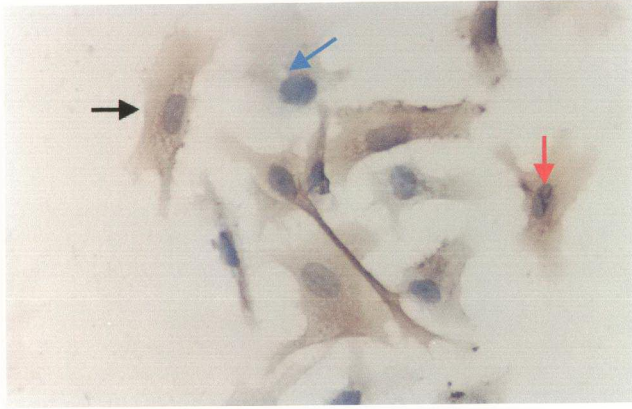
Şekil 4.10. ICAM-1 grubu, 10 ng/mL VEGF verilen deney grubundaki endotel hücreleri görülmektedir x4.



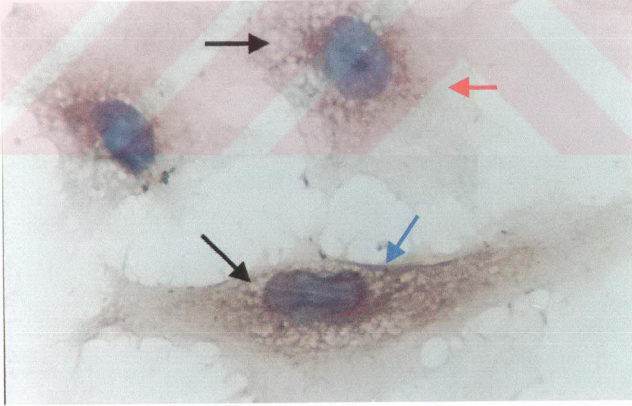
Şekil 4.11. ICAM-1 grubu, deney grubunda nadir olarak rastlanan immün negatif hücreler (siyah ok) ve çoğalmayı gösteren mitoz çekirdekleri (kırmızı ok) görülmektedir x10.



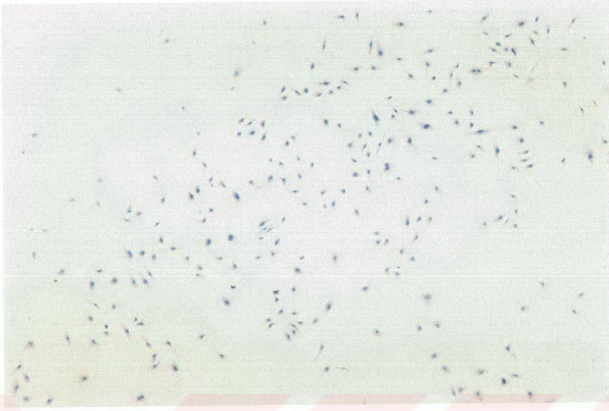
Şekil 4.12. ICAM-1 grubu, deney grubunda görülen mitoz çekirdekleri (ok başı), endotel hücrelerinin sitoplazmasındaki vakuoller (siyah ok) ve bazı hücrelerin açık (kırmızı ok), bazı hücrelerin ise daha koyu boyandığı (mavi ok) görülmektedir x20.



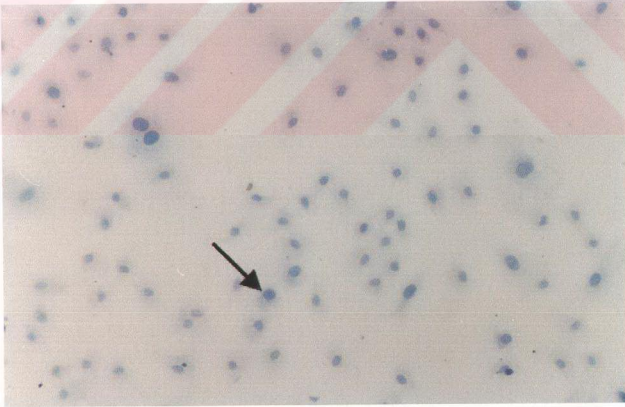
Şekil 4.13. ICAM-1 grubu, deney grubunda endotel hücrelerinin immün pozitif boyandığı (siyah ok) görülmektedir. İmmün pozitif boyanmanın çekirdeği gölgelemesi (kırmızı ok) görülüyor. Endotel hücrelerinin sitoplazmalarındaki vakuoller seçilmektedir (mavi ok) x40.



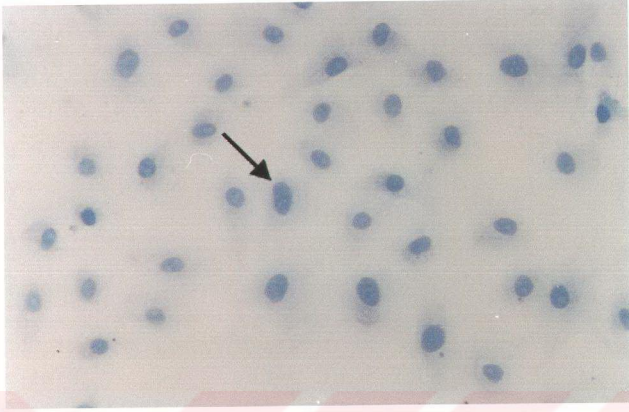
Şekil 4.14. ICAM-1 grubu, deney grubunda endotel hücreleri sitoplazmasındaki vakuoller görülmektedir (siyah ok). İmmün pozitif boyanmış hücrelerin bir kısmı açık (kırmızı ok), bir kısmı koyu boyanmıştır (mavi ok). Ayrıca çekirdeğin immün boyanma ile gölgelendiği görülmektedir (ok başı) x100.



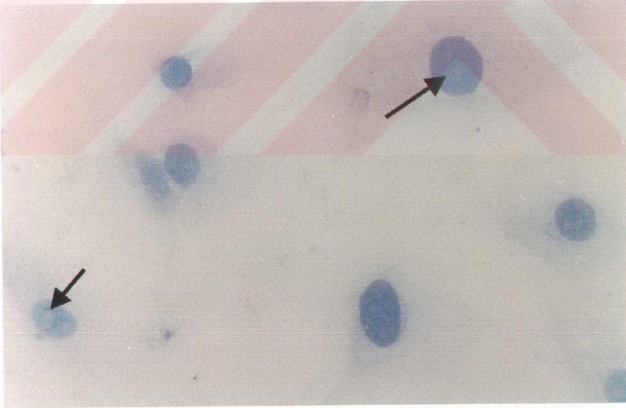
Şekil 4.15. ICAM-1 grubunda, negatif kontrol (primersiz) grubundaki endotel hücrelerinin sadece çekirdeği hematoksilen ile mavi boyanmaktadır x4.



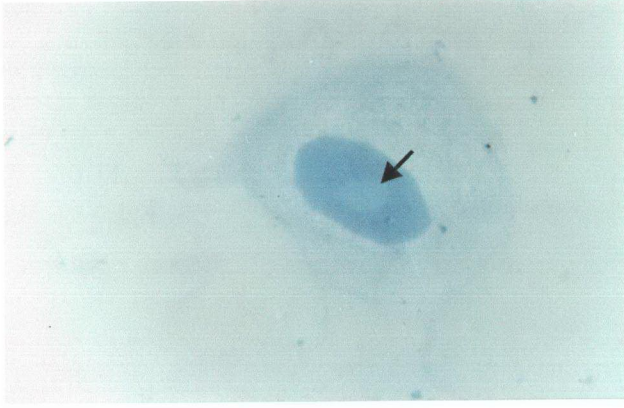
Şekil 4.16. ICAM-1 grubunda, negatif kontrol (primersiz) grubundaki boyanmamış immün negatif endotel hücreleri (siyah ok) görülmektedir x10.



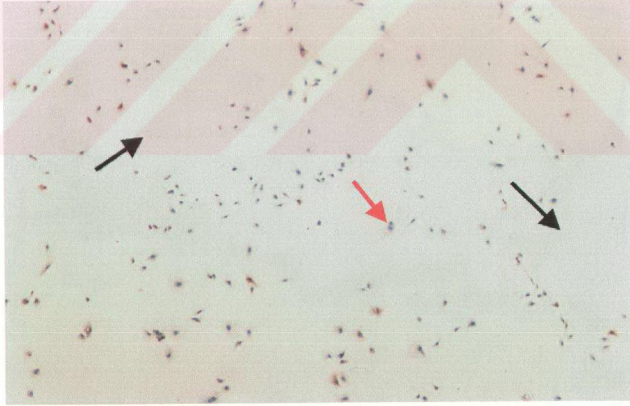
Şekil 4.17. ICAM-1 grubunda, negatif kontrol (primersiz) grubundaki boya almayan immün negatif endotel hücreleri (siyah ok) görülmektedir x20.



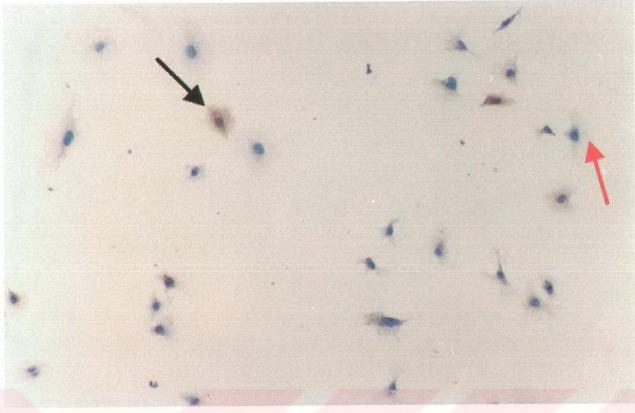
Şekil 4.18. ICAM-1 grubunda, negatif kontrol (primersiz) grubunda immün negatif endotel hücrelerinin çekirdeklerinin sağlam olduğu ve çekirdekçikleri (siyah ok) görülmektedir x40.



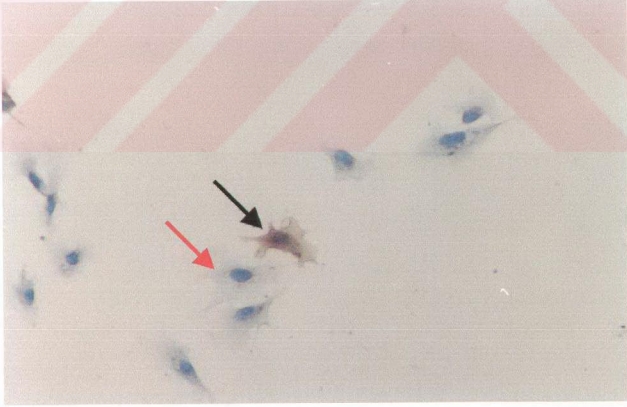
Şekil 4.19. ICAM-1 grubunda, negatif kontrol (primersiz) grubundaki boya almayan immün negatif endotel hücrelerinin çekirdeklerinin sağlam olduğu ve çekirdekçikleri (siyah ok) görülmektedir x100.



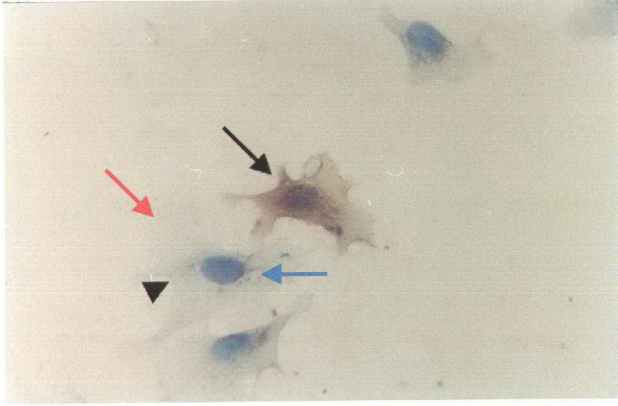
Şekil 4.20. VCAM-1 grubunda, VEGF verilmeyen kontrol grubundaki endotel hücreleri görülmektedir. Bu grupta yapıştığı yerden ayrılıp ölen hücrelerin yarattığı boşluklar (siyah ok) ve mitoz çekirdeklerinin nadir olduğu görülmektedir (kırmızı ok) x4.



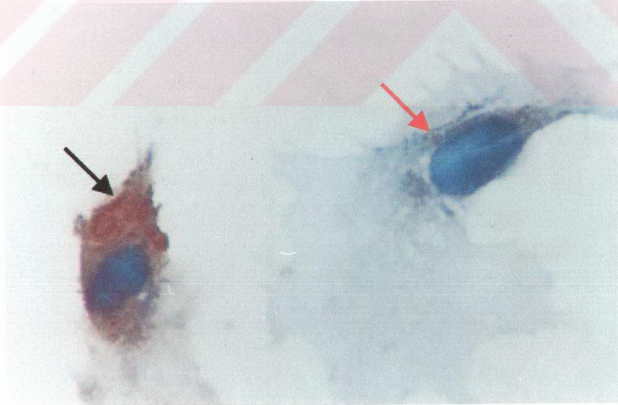
Şekil 4.21. VCAM-1 grubunda, kontrol grubunda endotel hücrelerinin morfolojik özelliklerinden poligonal şekilleri (siyah ok) ve hücrelerin sınırlarının tam olarak belirgin olmadığı (kırmızı ok) görülmektedir x10.



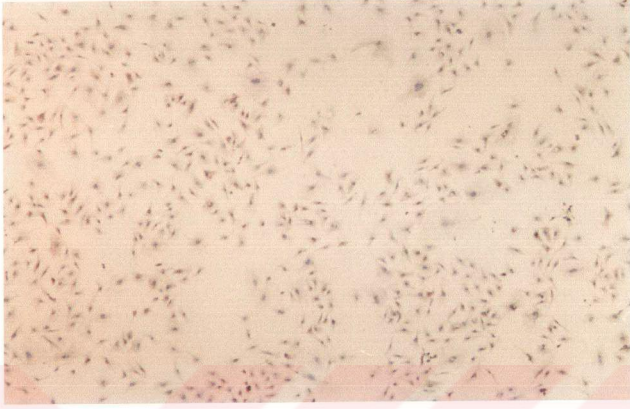
Şekil 4.22. VCAM-1 grubunda, kontrol grubunda az sayıda endotel hücresi immün pozitifken (siyah ok), büyük bölümü immün negatiftir (kırmızı ok) x20.



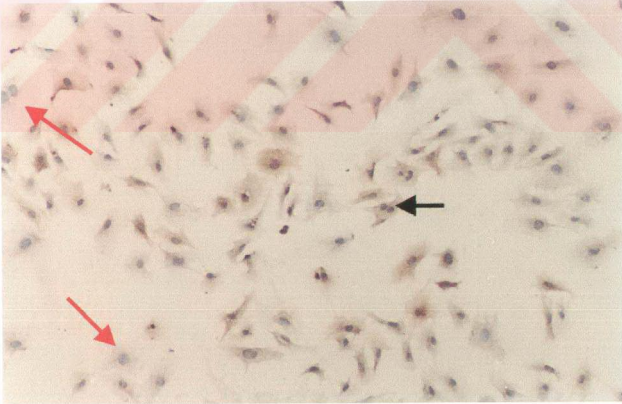
Şekil 4.23. VCAM-1 grubunda, kontrol grubundaki endotel hücrelerinin bir çoğu immün negatiftir (ok başı). morfolojik özelliklerinden poligonol şekilleri (siyah ok), hücrelerin sınırlarının tam olarak belirgin olmadığı (kırmızı ok) ve hücrelerin sitoplazmalarında vakuoller olduğu görülmektedir (mavi ok) x40.



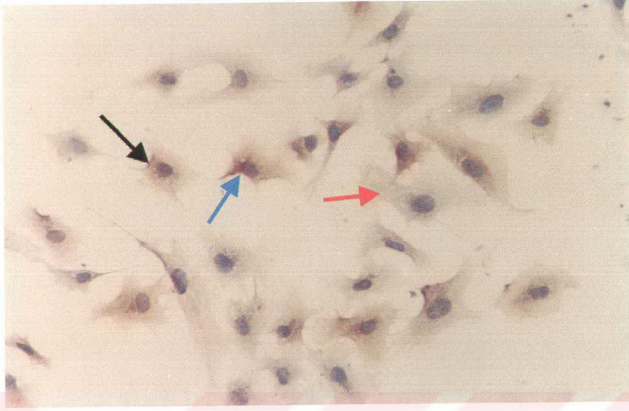
Şekil 4.24. VCAM-1 grubunda, kontrol grubundaki kahverengi boyanan immün pozitif endotel hücrelerinin bir kısmı koyu boyanırken (siyah ok), bir kısmı oldukça açık boyanmaktadır (kırmızı ok) x100.



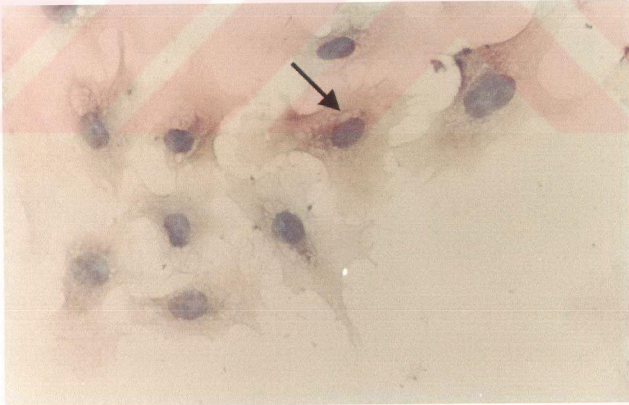
Şekil 4.25. VCAM-1 grubu, 10 ng/mL VEGF verilen deney grubundaki endotel hücreleri görülmektedir x4.



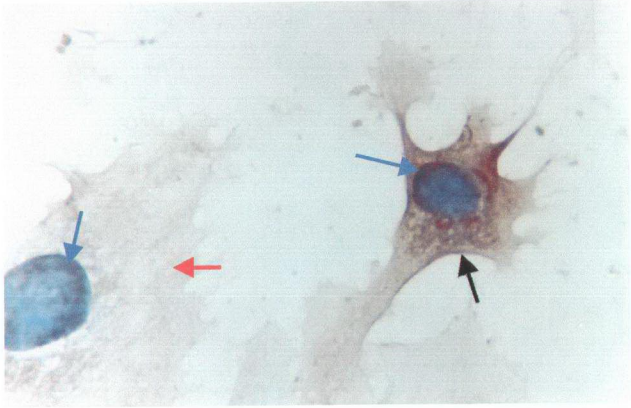
Şekil 4.26. VCAM-1 grubu, deney grubundaki endotel hücrelerinin bir çoğu immün pozitif boyanmıştır. Endotel hücrelerinin çoğalmasını gösteren mitoz çekirdekleri (siyah ok) ve oldukça az sayıdaki immün negatif hücreler (kırmızı ok) görülmektedir x10.



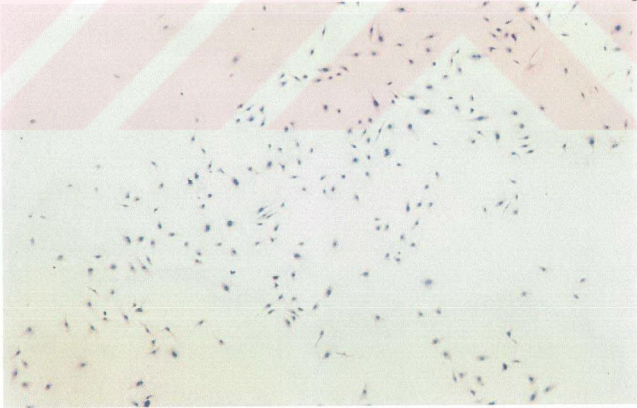
Şekil 4.27. VCAM-1 grubu, deney grubunda endotel hücrelerinin bir çoğunun immün pozitif boyandığı (siyah ok) ve bu hücrelerden bazılarının açık (kırmızı ok), bazılarının ise daha koyu (mavi ok) olmak üzere değişik oranlarda boyandığı görülmektedir x20.



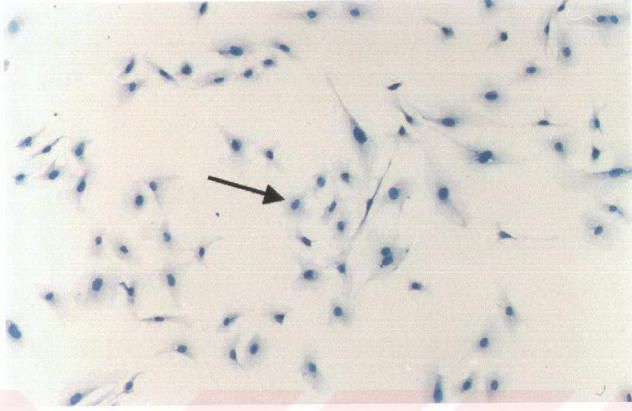
Şekil 4.28. VCAM-1 grubu, deney grubunda endotel hücrelerinin sitoplazmasındaki vakuoller (siyah ok) ve immün pozitif hücreler görülmektedir x40.



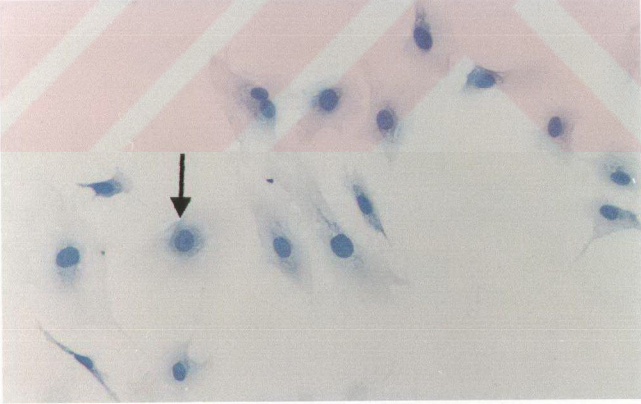
Şekil 4.29. VCAM-1 grubu, deney grubunda endotel hücrelerinin bir kısmı oldukça koyu boyanırken (siyah ok), bir kısmı daha açık bir boyanma göstermektedir (kırmızı ok). Yine bu boyanmanın çekirdeğin mavi rengini gölgelediği görülmektedir (mavi ok) x100.



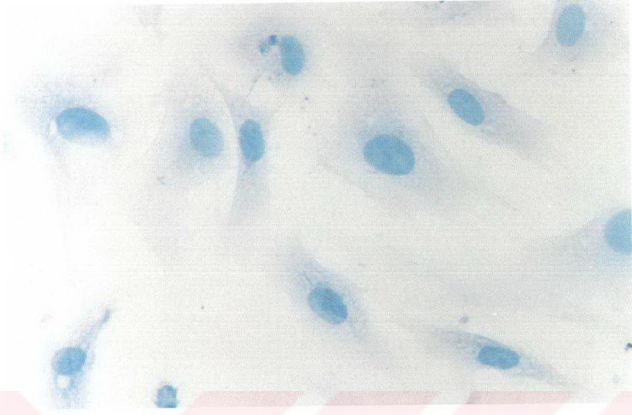
Şekil 4.30. VCAM-1 grubunda, negatif kontrol (primersiz) grubundaki endotel hücrelerinde sadece çekirdeğin hematoxilen ile mavi boyandığı görülmektedir x4.



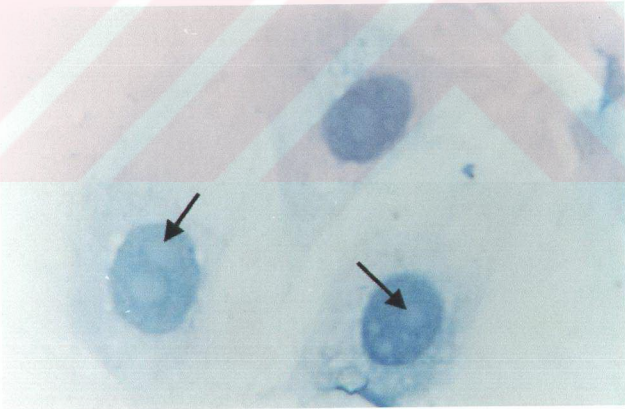
Şekil 4.31. VCAM-1 grubunda, negatif kontrol (primersiz) grubundaki boya almayan immün negatif endotel hücreleri (siyah ok) görülmektedir x10.



Şekil 4.32. VCAM-1 grubunda, negatif kontrol (primersiz) grubundaki boya almayan immün negatif endotel hücreleri (siyah ok) görülmektedir x20.



Şekil 4.33. VCAM-1 grubunda, negatif kontrol (primersiz) grubunda boya almayan immün negatif endotel hücreleri görülmektedir x40.



Şekil 4.34. VCAM-1 grubunda, negatif kontrol (primersiz) grubunda immün negatif endotel hücrelerinin çekirdeklerinin sağlam olduğu ve çekirdekçikleri (siyah ok) görülmektedir x100.

5. TARTIŞMA

Çeşitli fonksiyonlarıyla gün geçtikçe daha önemli bir hücre tipi olan endotel hücrelerinin, 1970'li yıllara kadar *in vitro* olarak incelenmesi mümkün değildi. 1973'de Jaffe'nin, Maruyama ve Fryer'in çalışmalarını geliştirip modifiye etmesiyle ilk defa bu hücreler uygun bir şekilde incelenebilir hale gelmiştir (Jaffe et al., 1973).

Bu çalışmayı laboratuvarımızda kolay ve güvenilir bir endotel hücre kültür ortamı oluşturmak ve ileride tüm çalışmacılara endotel, VEGF ve adezyon molekülleri ilişkileri ile ilgili yapılacak *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara temel teşkil etmesi için yaptık. Ayrıca laboratuvar şartlarımızda kolay, tekrarlanabilir ve uygun bir *in vitro* damar endotel hücresi modeli olmasını amaçladık. Kullandığımız kültür metodları Jaffe ve Morgan'ın metodlarının şartlarımıza uygun hale getirilmesi ile ortaya çıkmıştır (Jaffe et al., 1973; Morgan, 1996).

İn vivo endotel tabakasına model olacak endotel hücre kaynağı olarak insan göbük kordonu veninin seçilmesinin nedeni; normalde doğumdan hemen sonra atılan bir doku olarak, elde edilmesinin ve üzerinde çalışılmasının kolay olmasıdır. Ayrıca göbük kordonu veni büyük, dallanma yapmayan ve geniş bir yüzeye sahip olan bir damardır.

Hücrelerin beslenmesi ve fonksiyonlarına devam etmesini sağlamak için kullanılan kültür medyumlarını incelediğimizde endotel hücresinde; DMEM (Marconcini et al., 1999), RPMI-1640 (Grooby et al., 1997; Kotowicz et al., 2000; Gho et al., 2001) gibi medyumların kullanılabilirliği; ancak sıklıkla M-199 (Boehme et al., 2000; Grabner et al., 2000; Miro et al., 2000; Zapolska-Downar et al., 2000; Faehling et al., 2001; Yue and Tomanek, 2001; Zhang et al., 2002;) tercih edildiği görüldü. Birçok araştırmacı tarafından M-199 medyumunun kullanılması ve olumlu sonuçlar alınması bizim de hücre kültüründe bu medyumunun kullanılmamasına sebep oldu. Endotel hücrelerinin kültür kabını dolduracak kadar çoğalması için geçen sürenin ve canlılık oranlarımızın M-199 medyumunun kullanılan araştırmalardakilerle benzer olduğunu gördük.

Yine bir çok araştırmacı gibi biz de, endotel hücre kültüründe serum olarak fetal sığır serumu (Fetal bovine serum; FBS) kullanmayı tercih ettik (Qi et al., 1997; Vural et al., 2000; Murakami et al., 2001; Sen and Bagchi, 2001; Tille et al., 2001; Pu et

al., 2002; Zhang et al., 2002). Bazı araştırcılar ise yenidoğan sığır serumunu (Lorenzon et al., 1998) tercih etmişlerdi. FBS ve yenidoğan sığır serumunu %50 oranlarında karıştırarak kullananlar da vardı (Morgan et al., 1996). Ancak tüm bu çalışmacıların endotel hücre kültüründe konfluens ve hücre proliferasyon sonuçları benzerdi.

Yine endotel hücre kültürü yapan birçok araştırıcı gibi bizde; antibiotik olarak penisilin/streptomisin (Santos et al., 1996; Marconcini et al., 1999; Mustjoki et al., 2001), tampon çözelti olarak sodyum bikarbonat (Morgan et al., 1996; Grabner et al., 2000), endotel hücrelerinin çoğalmasını arttıran ve metabolizmasını sağlayan endotel hücre büyüme faktörü (endothelial cell growth factor; ECGF) veya bu faktörü içeren endotel hücre büyüme ilavesi (endothelial cell growth supplement; ECGS) (Zapolska-Downar et al., 2000; Faehling et al., 2001; Ivanov et al., 2004) kullandık.

Endotel hücrelerinin ekileceği kültür kaplarının veya lamellerin yüzeylerinin kaplanmasında bazı araştırmacılar kollajen (Faehling et al., 2001), bazıları endotel hücre yapışma faktörü (endothelial cell attachment factor; ECAF) (Kotowicz et al., 2000), bazıları jelatin (Miro et al., 2000; Birchall et al., 2001) kullanmasına rağmen; biz bazı diğer araştırmacıların da kullandığı (Qi et al., 1997; Boehme et al., 2000; Zapolska-Downar et al., 2000; Murakami et al., 2001), endotel hücrelerinin *in vivo* olarak yapıştığı maddelerden olan fibronektini tercih ettik.

M-199 medyumunu, %20 FBS, penisilin-streptomisin antibiyotikleri, sodyum bikarbonat tamponu ve endotel hücre büyüme ilavesi ECGS, hücrelerin yüzeye yapışarak daha iyi çoğalması için fibronektin ekilen kültür kapları kullanarak yapılan endotel hücre kültüründe, endotel hücrelerinin poligonal şekli, çoğalması ve konfluent olmaları için geçen süre Jaffe'nin ilk yaptığı kültürlerle göre (10-12 gün) oldukça iyi (6-8 gün), son zamanlarda benzer materyal ve metodlardaki ile yapılan çalışmalardaki bulgulara benzerdi (Lorenzon et al., 1998; Pu et al., 2002-a ve b; Zhang et al., 2002). Aynı zamanda hücrelerin morfolojileri de literatürdeki çalışmalarla paralellik göstermekteydi (Jaffe et al., 1973; Jaffe, 1984; Morgan et al., 1998).

Kültür sırasında endotel hücrelerinin bir kısmının ölmesi ve kalanların da konfluent olma zamanlarının 10-12 güne uzaması sonucu; geriye dönük yaptığımız incelemelerde, bu olayın özellikle endotel hücrelerini pasajlanmak için yapıştığı

yerden kaldırma sırasında kullanılan tripsin-EDTA solüsyonu fazla kalan kültür kaplarında olduğunu tesbit ettik ve bu sürenin uzunluğuyla bağlantılı olabileceğini düşündük. Bu durumu düzeltmek amacıyla, hücrelerin yapıştığı yüzeyden kaldırmak için kimyasal yöntem yanında mekanik yöntem uyguladık. Bu iki yöntem birlikte kullanıldığında sorunun çözülerek hücrelerin canlılık oranları tekrar %95'lere yükseldi ve konfluent olma zamanı 6-8 güne indi.

Dondurulan hücreleri çözerken de benzer bir durumla karşılaştık ve burada da sorunun dondurma solüsyonunda bulunan ve hücrelere toksik olan dimetil sülfoksit (DMSO)'den kaynaklanmış olabileceğini düşündük. Bunun içinde dondurulurken ve çözerken daha hızlı davranarak DMSO'ya maruz kalış süresini azalttık. Ayrıca hücreler çözüldüklerinde daha zengin bir medyumla karşılaşmaları için dondurma solüsyonuna koyduğumuz FBS miktarını %20'den %50'ye çıkarttığımızda bu sorunun da çözüldüğünü gördük.

Hücre kültürü uygulamaları esnasında, hücreler pasajlandıktan sonra ve deneye alınmadan önce, canlılık oranlarını tesbit etmek amacıyla tripan mavisi ile hücreleri boyadığımızda canlılık oranlarının %94 ile %96 arasında olduğunu bulduk. Literatürde hücre kültürü ile yapılan çalışmalarda görülen oranlar da %92-%98 arasındaydı (Zapolska-Downar et al., 2000; Kim et al., 2001-a; Pu et al., 2002-a ve b; Zhang et al., 2002). Böylece uyguladığımız hücre kültürü çalışmasının canlılık oranlarının literatürdeki diğer çalışmalarla benzer olduğunu ve dolayısıyla bu oranlarla uygulanan metotların ve seçilen materyallerin doğru olduğunu gördük.

Yine hücreleri deneye hazırlamak için 24 saat süreyle medyumdaki serum miktarını %20'den %2'e indirerek, serum içerisinde deneyde kullanacağımız faktörlerin miktarını en aza indirdik. Bu sayede sadece canlılıklarını sürdürebilecekleri; çoğalmalarını, sentezlerini, çevreyle ve birbirleriyle iletişimlerini minimuma indireceklerdi. Literatürü incelediğimizde, diğer çalışmacılarında benzer amaçlar için medyum içindeki serum miktarını %1 ile %5 arasına indirdiklerini gördük (Marconcini, 1999; Miro et al., 2000; Pu et al., 2002-a ve b).

Ayrıca deneyi tamamlanan endotel hücrelerinin fiksasyonunda; bir çok araştırmacının farklı fiksatifler kullandığını gördük. Örneğin; bazı araştırmacılar soğuk aseton (Constantinescu et al., 2000), bazıları metanol (Pu et al., 2002-a ve b), bir kısmı formalin (Grabner et al., 2000; Birchall et al., 2001) kullanmışlardı. Biz ise

hem daha önce immünohistokimya uygulamalarımızda kullandığımız, hem de adezyon molekülleriyle özellikle ICAM-1 ve VCAM-1 ile çalışan araştırmacıların kullanmayı tercih ettikleri (Yue et al., 2001; Zhang et al., 2002; Ivanov et al., 2004) %4 paraformaldehit fiksatifini kullandık. Elde ettiğimiz sonuçlar bu fiksatif kullanan araştırmacıların sonuçlarına benzerdi.

Bu çalışmada kullanılan VEGF, multifonksiyonel bir büyüme faktörü olup, bir çok etkisinin yanında özellikle vasküler endotel hücreleri için özgül etkilere sahiptir. VEGF; embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör büyümesi, miyokardial iskemi, oküler neovasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıkları kapsayan bir dizi fizyolojik ve fizyopatolojik olaylardaki kan damarı oluşumunda (anjiojenesis ve vaskülojenesis) ve inflamasyonda bazı kan hücrelerinin damar dışına çıkmasındaki rolü ile ilgi odağıdır (Zachary, 1998). Son 10 yıl içinde VEGF ailesinin üzerine yapılan çalışmalar ile bu ailenin VEGF-A (Human-VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve Placenta büyüme faktörü (Placenta growth factor; PlGF) adı verilen üyelerden meydana geldiği gösterilmiştir (Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Ortega et al., 1998). VEGF-A'nın VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆ olarak isimlendirilen 6 çeşidi vardır (Zachary, 1998; Ferrara and Davis-Smyth, 1997). Biz çalışmamızda VEGF₁₆₅'i kullandık. VEGF; ovaryum follikülleri, embriyo trofoblastları, akciğer alveolar hücreleri, böbrek glomerülleri, proksimal tübül hücreleri, karaciğer hepatositleri, adrenal korteksin tüm hücreleri, testisin testosteron üreten Leydig hücreleri, aktive makrofajlar, arterioller çevreleyen fibroblastlar, bronşiyal ve koroid pleksus epitel hücresi gibi bir çok hücre tarafından sentezlendiği gösterilmiştir (Monacci et al., 1993; Thomas, 1996). Hücrede VEGF sentezi başta hipoksi olmak üzere, trombosit kaynaklı büyüme faktörü-BB (PDGF-BB), keratinosit büyüme faktörü (FGF-7), epidermal büyüme faktörü (EGF), tümör nekrosis faktör- α (TNF- α), transforming büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1) ve interlökin- β 1 gibi çeşitli faktörler tarafından başlatılır ve bunlar endotel hücre kültürü çalışmaları ile gösterilmişlerdir. Tüm bu maddelerin hiçbirinin endotel hücreleri için mitojenik olmadığı, ancak VEGF salgılanmasına yol açarak mitojeniteyi arttırdıkları gösterilmiştir (Thomas, 1996). VEGF vasküler sistem boyunca dizilmiş endotel hücreleri için bilinen en özgül mitojendir (Ferrara and Davis-Smyth, 1997). Eksojen VEGF, yeni damar

oluşumunu indükler ve iskemik tavşan ekstremitelerinde perfüzyonu artırır ve domuz koroner arterlerinde azalmış kan akımına cevap olarak yine kan perfüzyonunu artırır (Thomas, 1996). Bunun yanında yükselmiş VEGF ekspresyonu bazı hastalıkların ilerlemesine sebep olabilir. Örneğin devamlı büyüyen solid tümörlerin anjiogenezise bağımlı oldukları, bu yüzden bu tümör hücrelerinde VEGF'e ait mRNA'ların arttığı ve tümöre komşu endotel hücrelerinde de VEGF reseptörlerine ait mRNA'larının arttığı gösterilmiştir. Yine yükselmiş VEGF salgılanması, romatoid artrit, psöriazis ve kontakt dermatitte olduğu gibi tipik olarak artmış anjiogenesisle karakterli bazı inflamatuvar durumlarda görülür (Thomas, 1996). VEGF vasküler permeabiliteyi arttırmada histamin, bradikinin, lökatrien-B₄, C₄ ve E₄'den daha etkili olduğu gösterilmiştir (Ferrara and Davis-Smyth, 1997).

Yapılan bazı çalışmalarda VEGF'in inflame dermise lökositlerin toplanmasına yardım ettiği görüldü. Bu etkisini ICAM-1 ve VCAM-1 gibi özgül adezyon moleküllerinin salgılanması ile yaptığı bulundu (Melder et al., 1996). Bu salgılanma doğal-öldürücü (natural-killer; NK) hücrelerin endotel hücrelerine adezyonunu aktive ettiği bildirilmiştir (Melder et al., 1996; Ferrara and Davis-Smyth, 1997).

ICAM-1 ve VCAM-1 adezyon molekülleri, immünglobülin süper ailesinin üyeleridir. Endotel hücrelerinde sentezlenir. İnflame olan dokuların postkapiller venüllerinin içinde lökositlerin yuvarlanmasına ve sıkı yapışmasına aracılık ederler. Ama yuvarlanmadan daha çok sıkı bağlanarak migrasyona ve mikrovasküler permeabilite artışına sebep olurlar (Eppihimer et al., 1998). Endotel yüzeyindeki ICAM-1 lökosit yüzeyindeki Lökosit Fonksiyon Antijen-1 (LFA-1) ve Mac1-integrinlerle heterofilik bağlantı yaparlar (Desmet, 1996). Bunun yanında T hücre aracılı host savunma sisteminde önemli rolü vardır (Stolpe and Saag, 1996).

ICAM-1'in sentezine etki eden faktörlerin başında TNF- α , İnterlökin-1 β gibi sitokinler, lipopolisakaritler ve endotoksinler gelir. Ayrıca IL-1- α , IFN- γ ve TGF- β da artırırken, IL-4 ve IL-10 değiştirmemektedir. Yapılan hücre kültürü çalışmalarında görülmüştür ki; özellikle endotoksinlerin, TNF- α , IL-1 β 'nin ortama verilmesini takiben 8 saat içinde ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonları artarak maksimuma gelir ve 48-72 saat yüksek seviyede kalır (Eppihimer et al., 1998). *In vivo* çalışmalarda ise bu maddelerle yapılan endotel aktivasyonundan 2 saat sonra

ICAM-1 seviyeleri yükselmeye başlamış, 5 saatte maksimal yüksekliğe erişmiş ve 24 saat bu yüksekliğini korumuştur (Eppihimer et al., 1998). ICAM-1 sentezi aynı zamanda hipoksi ile de arttırılmaktadır. Miyokard endotelinde sürekli olarak yapılan ICAM-1 iskemi ve reperfüzyonu takiben artmaktadır (Eppihimer et al., 1998).

Biz deneyimizde VEGF tek başına verildiğinde kültürdeki insan umbilikal ven endotel hücrelerinden (HUVEC) sentezlenen ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonuna baktık. Kontrol grubunda yaklaşık %22,6 oranında ICAM-1 sentezlenirken, 10 ng/mL VEGF verildikten 8 saat sonra bu oran %92'ye çıktı. Benzer bir durum da VCAM-1 için gerçekleşti. Yine kontrol grubunda %8,3 olan VCAM-1 sentezi, VEGF verildiğinde %90,1'e yükseldi. Yapılan benzer deneylerde fibrin verilen endotel hücrelerinin ICAM-1 sentezini arttırdığı Elisa ve Flow sitometrik analizlerle tesbit edilmiş (Boehme et al., 2000). Ancak buradaki ICAM-1 yüksekliğinin, kültürdeki endotel hücrelerinin ne kadarının bu senteze katıldığının bilinmesi bakımından bilgi vermediği ve hücrelerin sentezlediği toplam miktar hakkında bilgi verdiği görülmektedir. Oysaki bizim çalışmamızda endotel hücreleri immünohistokimyasal olarak boyandığı için hücrelerin ne kadarının bu senteze katıldığını gördük.

Yapılan bir çalışmada; merkezi sinir sistemi damarlarından elde edilen endotel hücreleri ile insan aortasından elde edilen endotel hücrelerinin TNF- α ile uyanılarak sentezlediği VCAM-1 ve ICAM-1 miktarına Elisa yöntemiyle karşılaştırılmalı olarak bakılmış. Sonuç olarak ICAM-1'in beyin damarlarından elde edilen endotel hücrelerinin aortadan elde edilenlere kıyasla daha az sentezlendiği, VCAM-1'in ise beyin endotel hücreleri tarafından çok az sentezlendiği görülmüş (Santos et al., 1996). Araştırmacılar aortadan ve beyinden elde edilen farklı endotel hücreleri üzerindeki anyonik alanların inflamatuvar sitokinler tarafından farklı olarak etkilendiğini düşünmüşler. Aynı çalışmada, aorttan elde edilen endotel hücreleri bir TNF- α uyarısıyla bizim çalışmamızdaki HUVEC'lere verilen VEGF ile benzer şekilde VCAM-1 ve ICAM-1 sentezini arttırırken, bu artış beyin damarlarından elde edilen endotel hücrelerinde özellikle VCAM-1 sentezinde görülmediği yönüyle de bizim çalışmamızdan farklıdır.

Bir başka çalışmada ise, HUVEC kültüründe, üzüm çekirdeğinden elde edilen proanthocyanidin ekstresinin TNF- α 'nın uyardığı ICAM-1 ve VCAM-1 sentezine

etkisine bakılmış. Proanthocyanidin ekstresinin düşük seviyelerinin TNF- α uyarısına rağmen VCAM-1 sentezini azalttığı, ama ICAM-1 sentezini değiştirmediği görülmüş (Chandan and Debasis, 2001). Proanthocyanidin ekstresinin, TNF- α ile arttırılmış çözünebilir-VCAM-1 seviyesini düşürerek endotel hücrelerin adezyonunu engellediklerini düşündüler. Bu da proanthocyanidin ekstresinin VEGF'in gösterdiği etkiden özellikle VCAM-1 sentezini inhibe etmesiyle farklı gruplarda yer aldığını göstermektedir.

Boehme ve arkadaşlarının (2000) yaptıkları çalışmada; TNF- α 'nın uyardığı endotel hücrelerinin 24 saat sonra sentezlediği çözünebilir-ICAM-1, çözünebilir-VCAM-1 ve trombomodülin miktarına Eliza yöntemiyle bakılmış ve çözünebilir-ICAM-1, çözünebilir-VCAM-1 artarken trombomodlinin değişmediği gözlenmiş. Devamında endotel hücrelerini uyarmak amacıyla 24 saatliğine TNF- α ve polimorfonükleer lökositlerle inkübe edilerek bakıldığında, bu seviyelerin tüm gruplarda oldukça fazla arttığı gözlenmiş. TNF- α , IL-1, gibi proinflamatuvar sitokinlerin; lökositleri olduğu kadar endotel hücrelerinin de aktivasyonuna yol açmasından yola çıkarak polimorfonükleer lökositlerle bir aradaki etkilerine baktıklarında adezyon moleküllerinin artışının oldukça çoğaldığını görerek; sitokinin neden olduğu polimorfonükleer lökositlerin ve endotel hücrelerin etkileşimlerinden sonra ortaya çıkan çözünebilir-adezyon moleküllerinin endotelial bir yaranmanın belirteci olarak, trombomodülin ile kıyaslanmanın üstünlüğünün önemini gösterdiğini düşündüler. Bu bulgular bizim çalışmamızdan membrana bağlı değil çözünebilir-VCAM-1 ve çözünebilir-ICAM-1 seviyelerinin TNF- α gibi bir uyarı ile yükseldiğini göstermesi açısından farklılık göstermektedir.

Kim ve arkadaşlarının (2001-b) yaptığı çalışmada bizim gibi VEGF ile uyarılmış endotel hücrelerinin VCAM-1, ICAM-1 ve E-selectin seviyelerinin yükseldiği, ancak anjiopoietin-1 verildiğinde azaldığı tesbit edilmiş. VEGF, VCAM-1 ve ICAM-1 ekspresyonunu fosfolipaz-C ve nükleer faktör- κ B aktivasyonu ile yapmakta iken; anjiopoietin, tie-2 reseptörünü kullanarak VEGF'n uyardığı ekspresyonu inhibe ettiğini düşünmüşler. Böylece, Kim ve arkadaşları Angiopoietin-1'in damar oluşumuna yaptığı katkılarının yanında, VEGF'n uyardığı inflamasyonu önlediği ve inflamasyondan kaçınmada kullanılabileceğini düşünmüşler. VEGF verildiğinde alınan sonuçlar bizim sonuçlarımızla paralel olmasına rağmen, bu

yükselmeyi göstermek için kullanılan yöntemler açısından farklılıklar göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan yöntemlerde (Western blot, flow sitometri) yine bu seviyeler total olarak ölçülerek bulunmuş ve hücrelerden ne kadarının bu yükselmeye katkıda bulunduğu bilinmemektedir.

Murakami ve arkadaşları (2001) yaptıkları bir çalışmada; HUVEC, glomerüler endotel hücreleri ve dermal mikrovasküler endotel hücrelerinin TNF- α ve IFN- γ uyarısı altında sentezledikleri VCAM-1 ve PECAM-1 miktarlarına Elisa yöntemiyle bakmışlar. HUVEC ve glomerüler endotel hücrelerinde, TNF- α 'nın indüklediği VCAM-1 ekspresyonu, bizim çalışmamızda VEGF'ün etkisi gibi benzer şekilde artarken, dermal mikrovasküler endotel hücrelerinde artmamıştır. IFN- γ indüksiyonu altında ise, VCAM-1 sentezinin sadece HUVEC'de arttığını gözlemişler. Sonuç olarak farklı kaynaklardan elde edilen endotel hücrelerinin farklı fenotipik karakterleri ve farklı fonksiyonları olduğunu; uyarılara da farklı yanıtlar vereceklerini; ayrıca farklı pasajlardaki endotel hücrelerinin de farklı davranışlar sergileyebileceklerini söylemişlerdir.

Yine benzer bir çalışmada Constantinescu ve arkadaşları (2000), hamster aort endotel hücresinden kaynaklanan köpük hücrelerinin VCAM-1 ve ICAM-1 artışına bakıldığında, bu artışın olmadığı, ama normal hamster aortik endotel hücrelerinin bu adezyon moleküllerini sentezlediğini immünflöresan olarak görüntülenerek sonuçların bizim çalışmamızla benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bu deneylerden sonra Constantinescu ve arkadaşları, endotel kaynaklı köpük hücrelerinin endotel hücrelerinin aksine ICAM-1 ve VCAM-1 eksprese etmediği dolayısıyla, monositlere adezyonlarının çok az veya hiç olmadığını ve oluşturdukları modelin ileri ateroskleroz aşamalarında kullanılabilir bir deneysel model olduğunu düşündüler.

Kim ve arkadaşlarının (2001) yaptığı benzer bir çalışmada; 20 mg/mL VEGF verilmesinin HUVEC'de zaman-bağımlı bir şekilde VCAM-1, ICAM-1 ve E-selektin sentezini bizim bulgularımızda da olduğu gibi arttırdığını gösterdi. Kim ve arkadaşları VEGF'ün bu etkisinin, endotel hücresindeki VEGFR-2 yoluyla olduğunu düşünmüşler.

Benzer bir başka çalışmada Kikuchi (2000), insan umbilikal ven endotel hücrelerine 24 saat VEGF, TNF- α ve bFGF vererek Elisa yöntemiyle VCAM-1,

ICAM-1 ve E-selektin değerlerini ve bunların çözünmüş halde sıvıdaki değerlerini ölçmüş. Değerleri ölçülebilir hale getirmek için de TNF- α kullanarak endotel hücrelerini uyarmış. bFGF verilen hücreler incelendiğinde, VEGF verilen gruptakinin aksine VCAM-1'in endotel hücreleri tarafından sentezlenmediğini, ama ICAM-1 ve E-selektin sentezinin arttığını görmüş. Halbuki VEGF verilen grupta tüm bu adezyon moleküllerinin sentezinin arttığı görülmüş. Çözünebilir formlarına baktığında yine bFGF verilen kuyucukta çözünebilir-VCAM-1'in azaldığını, ancak VEGF verilen hücrelerde arttığını belirlemiştir. Bu bulguları bizim bulgularımızla oldukça benzerlik göstermektedir. Kikuchi ve arkadaşları bu sonuçların inflamasyon altındaki endotel hücreleri üzerinde b-FGF ve VEGF'ün adezyon molekülleri sentezi yönünden farklı etkilerinin olduğunu düşünmüşler.

Çalışmamızda VEGF verilen endotel hücrelerini anti-VCAM-1 ve anti-ICAM-1 antikolarıyla boyadığımızda, bazı hücrelerin oldukça koyu boyandığını bazılarının ise açık olarak boyandığını gördük. Bu boyanmanın hücrelerin adezyon molekülleri sentez ettikleri miktarla orantılı olduğunu düşündük. Ayrıca bu boyanmanın bazı hücrelerde, hücrenin özellikle çekirdeğinin çevresindeki vakuollerden zengin bölgede yoğunlaştığını diğer bölgelerde daha az olduğunu gördük. Özellikle deney grubundaki bazı hücrelerde çekirdek çevresinde görülen bu alanlarda yoğun boyanmanın da, adezyon molekülleri sentezinin hücrede endoplazma retikulumunda sentezlenmesi, golgi kompleksinde olgunlaşması ve sonra membrana gitmesi sırasında bu alanlarda antikolarla karşılaşmasından ve boyanmasından kaynaklandığı sonucuna vardık. İmmün boyanmanın negatif kontrol gruplarında çekirdeğin çevresindeki sitoplazmanın da hematoksilen ile boyanması, burada yoğun olarak bulunan granüllü endoplazma retikulumu üzerindeki bazik yapıdaki ribozomların boyanmasından kaynaklanmakta olduğu sonucuna varılmıştır.

Endotel hücrelerinin morfolojilerini incelediğimizde uzun uzantıları olmaktan çok, poligonal şekilli, merkezde tek bir çekirdeğin yer aldığı ve bu çekirdeğin içerisinde bir veya birden fazla çekirdekçiğın olduğunu gördük. Hücrelerin çekirdek ve çekirdekçikleri yuvarlak veya oval, ama düzgün sınırlıydı. Ayrıca hücre sınırları tam olarak belirgin değildi. Hücrelerimiz bu özellikleriyle Jaffe ve Morgan'ın çalışmalarındaki hücrelerin özelliklerine benzer özellikteydi (Jaffe, 1984; Morgan, 1996). Yine bazı hücrelerde çekirdek çevresinde görülen vakuolizasyonun, o bölgede

yoğunlaşan golgi kompleksi ve endoplazma retikulumu sarnıçlarının önce %2 serum içeren medyuma cevaben, sonra ise normal fonksiyon görebilecekleri bir medyuma (10 ng/mL VEGF içeren M-199) kavuşmaları ile sentezledikleri proteinlerden (özellikle VCAM-1 ve ICAM-1) kaynaklanmış olabileceği, ama kesin belirlemek için elektron mikroskopik çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna vardık.

Tüm bulgular incelendiğinde; yaptığımız hücre kültürü ve kullanılan materyal ve metod insan umbilikal veni endotel hücrelerinin kültürü için son derece güncel ve iyi bir örnek olduğunu gördük.

Bizim çalışmamızın sonuçları; VEGF'in HUVEC'te VCAM-1 ve ICAM-1 sentezini arttırdığını ve bu senteze hemen, hemen tüm endotel hücrelerinin değişik oranlarda katıldığını gösterdi. *In vitro* verilen VEGF'ün anjiogenik etkilerinin yanında, inflamasyonda polimorfonükleer lökosit, monosit ve lenfosit gibi bazı kan hücrelerinin migrasyonunda önemli bir mediatör olduğu ve bu etkisini de hücre adezyon moleküllerinden VCAM-1 ve ICAM-1'i arttırarak yaptığını düşünmekteyiz.

Akut ve kronik inflamasyon esnasında VEGF'e yapılacak müdahalelerle inflamasyonun arttırılması veya azaltılması mümkün olacaktır. Ayrıca başka moleküllerle VCAM-1 ve ICAM-1'in sentezinin azaltılıp, arttırılması da kan hücrelerinin damar dışına çıkış trafiğine etki edecektir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonuçlarını şu şekilde sıralayabiliriz:

1. İnsan göbek kordonu, endotel hücre kültürü hazırlamak ve üzerinde çalışmalar yapmak için uygun bir kaynaktır ve kolay elde edilir.
2. Endotel hücresi eldesi sırasında kollejenaz enziminin uygulanış süresi çok olmamalı ve böylece fibroblast ve düz kas hücresi kültüre karışmamalıdır.
3. Endotel hücre kültüründe M-199 medyumunu, fetal sığır serumu, penisilin-streptomisin antibiyotikleri, sodyum bikarbonat tamponu, endotel hücre büyüme faktörü kullanmak ve büyüyecekleri kültür kaplarının yüzeyini de fibronektin ile kaplamak uygundur.
4. Endotel hücreleri kültürde konfluent olduklarında morfolojik olarak; poligonal şekilli, hücre sınırları belirsiz, çekirdeğin içerisinde bir veya birkaç belirgin çekirdekçiğin görüldüğü ve özellikle çekirdek çevresinde vakuolleri olan hücreler olarak görülür.
5. Endotel hücrelerini tripsinize ederken tripsinin uygulanma süresini 5 dakikanın altında tutmak ve dondurma solüsyonunda kullanılan dimetil sülfoksit ile endotel hücrelerinin çözünmüş halde bulunma süresini de minimuma indirmek, onların canlılık oranlarını arttırmak ve çalışmaların güvenilirliği için gereklidir.
6. Endotel hücrelerinin az bir kısmı %2 gibi oldukça düşük serum içeren medyumlarda yaşamını sürdüremeyerek ölürlür. Canlılığını sürdürenlerin de sitoplazmalarındaki vakuollerinde bir miktar artış olur.
7. Kültür ortamında başka hiçbir hücresel ve humoral uyaran olmadan VEGF verilen endotel hücrelerinin 8 saat içerisinde ICAM-1 ekspresyonu ciddi oranlarda arttı. Bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır.
8. Yine VEGF verilen endotel hücrelerinin 8 saatin sonunda, kontrol gruplarına göre yüksek oranlarda VCAM-1 sentezledi. Bu değerler de istatistiksel olarak anlamlıdır.
9. VEGF'nün tek başına insan umbilikal ven endotel hücre kültüründeki endotel hücrelerinde, ICAM-1 ve VCAM-1 sentezini hücre bazında ciddi

oranlarda arttırması, VEGF'ün anjiogenesis gibi diğer etkilerinin yanında, inflamasyonda da polimorfonükleer lökosit, lenfosit ve monosit gibi bazı kan hücrelerinin damar dışına çıkmasında gerekli olduğunu gösterdi.

Sonuç olarak bu temel çalışma, endotel hücre kültürü çalışmaları için uygun ve güncel bir deney ortamı oluşturulması açısından oldukça önemlidir. Ayrıca, endotel hücrelerinin görünüm ve özellikleri bakımından da tanımlanması, bu konuda çalışacak olan araştırmacılara ışık tutacaktır. Yine, VEGF'ün tek başına polimorfonükleer lökosit, lenfosit ve monosit gibi bazı kan hücrelerinin damar dışına çıkmasında gerekli olan adezyon moleküllerinden ICAM-1 ve VCAM-1 yapımını arttırdığını gösterdi ve bu artışın belirlenmesi yanında, hemen her hücrenin buna katıldığına görülmesi bakımından da oldukça önemliydi. Literatür taramalarımızda yaptığımız çalışmanın bir ilk olduğunu gördük. Bu çalışma daha sonraki çalışmalarımıza da ışık tutacak ve temel teşkil edecektir.

7. KAYNAKLAR

- ABBAS K.A., LICHTMAN A.H. (2003). *Cellular and Molecular Immunology*. 5th Ed. California. Chapter: 6. p.:105-127, Chapter: 11. p.:243-275, Chapter: 12. p.:275-298.
- ACHEN M.G., STACKER S.A. (1998). The VEGF family; proteins which guide the development of the vasculature. *Int. Exp. Path.* 79:255-265.
- ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P. (2002). *Molecular Biology of The Cell*. 4th Ed. New York. Chapter: 19. p.: 1065-1126.
- ANDERSON H. (1990). Adhesion molecules and animal development. *Experientia*. 46:2-13.
- APLİN A.E., HOWE A., ALAHARI S.K., JULIANO R.L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* 50:197-263.
- AROMORAI I., NAKANISHI S., (1992). Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 267:12468-12474.
- ASAHARA T., CHEN D., TSURUMI Y., KEARNEY M., ROSSOW S., PASSERI J., SYMES J.F., ISNER J.M. (1996). Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelial-dependent function after phVEGF₁₆₅ gene transfer. *Circulation*. 94:3291-3302.
- ASIMAKOPOULOS G., TAYLOR K.M. (1998). Effects of cardiopulmonary bypass on leukocyte and endothelial adhesion molecules. *Ann. Thorac. Surgeons*. 66:2135-44.
- ATSUMI T., TAKEICHI M. (1980). Cell association pattern in aggregates controlled by multiple cell-cell adhesion mechanisms. *Dev. Growth and Differ.* 22:133-142.
- AUGUSTIN H.G., KOZIAN D.H., JOHNSON R.C. (1994). Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays*. 16:901.
- BEHRENS J. (1994). Cadherins as determinants of tissue morphology and suppressors of invasion. *Acta Anat.* 149:165-169.
- BIRCHALL I.E., FIELD P.L., KETHARANATHAN V. (2001). Adherence of human saphenous vein endothelial cell monolayers to tissue-engineered biomatrix vascular conduits. *J. Biomed. Mater. Res.* 56:437-443.

- BOEHME M.W.J., RAETH U., SCHERBAUM W.A., GALLE P.R., STREMMEL W. (2000). Interaction of endothelial cells and neutrophils in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* 119:250-254.
- BROOME U., HAUZENBERGER D., KLOMINEK J. (1996). Adhesion molecules in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Hepatogastroenterology.* 43:1109-12.
- BUJIA J., HOLLY A., KIM C., SCANADY N., KASTENBAUER E. (1994). Expression of human cams in middle ear cholesteatoma. *American Journal of Otolaryngology.* 15:271-275.
- CHANDAN K., DEBASIS B. (2001). Regulation of inducible adhesion molecule expression in human endothelial cells by grape seed proanthocyanidin extract. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 216:1-7.
- CINES D.B., POLLAK E.S., BUCK C.A., LOSCALZO J., ZIMMERMAN G.A., McEVER R.P., POBER J.S., WICK T.M., KONKLE B.A., SCHWARTZ B.S., BARNATHAN E.S., McCRAE K.R., HUG B.A., SCHMIDT A., STERN D.M. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 91:3527-3561.
- CLAUSS M. (2000). Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family. *Semin. Thromb. Hemost.* 26:561-9.
- CONSTANTINESCU E., ALEXANDRU D., ALEXANDRU V., RAICU M., SIMIONESCU M. (2000). Endothelial cell-derived foam cells fail to express adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1) for monocytes. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 32:195-201.
- DALCIK C., FİLİZ S., FİLİZ M., DALCIK H. (2003). Immunohistochemical analysis of N-CAM of Pan-cadherin in the small intestine of intrauterine growth-retarded newborn rats caused by maternal protein malnutrition. *Acta Histochem.* 105:183-190.
- DEJANA E. (1996). Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 98:1949.
- DELLIAN M., WITWER B.P., SALEHI H.A., YUAN F., JAIN R.K. (1996). Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice. Effects of b-FGF, VEGF, VPF, and host microenvironment. *Am. J. Pathol.* 149:59-71.
- DESMET V.J. (1996). Adhesion molecules. *Hepato-Gastroenterology.* 43:1099-1102.

- DETMAR M. (2000-a). Tumor angiogenesis. *J. Investig. Dermatol Symp. Proc.* 5:20-3.
- DETMAR M. (2000-b). The role of VEGF and thrombospondins in skin angiogenesis. *Journal of Dermatological Science.* 24:S78-S84.
- EDELMAN G.M. (1984). Cell adhesion and morphogenesis: the regulator hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:1460-1464.
- EDELMAN G.M., CROSSIN K. (1991). Cell adhesion molecules: implication for a molecular histology. *Annu. Rev. Biochem.* 60:155-190.
- EPPIHIMER M.J., RUSSEL J., LANGLEY R., VALLIEN G., ANDERSON D.C., GRANGER D.N. (1998). Differential expression of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) in murine tissues. *Microcirculation.* 5:179-88.
- EPSTEIN H.F., LEVIN E.R., (1995). Endothelins. *The New Engl. Jour. Of Med.* 333.6, 356-363.
- ETZIONI A. (1996). Adhesion molecules: their role in health and disease. *Pediatric Research.* 39:191-198.
- FAEHLING M., KOCH E.D., RAITHEL J., TRISCHLER G., WALTENBERGER J. (2001). Vascular endothelial growth factor-A activates Ca²⁺-activated K⁺ channels in human endothelial cells in culture. *The International journal of Biochemistry and Cell Biology.* 33: 337-346.
- FERRARA N., DAVIS-SMYTH T. (1997). The biology of VEGF. *Endocrine Reviews.* 18:4-25.
- FERRARA N. (2001). Role of VEGF in regulation of physiological angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 280:C1358-C1366.
- FİGARELLA-BRANGER D., CIVATTE M., BARTOLI C., PELLİSSIER J.F. (2003). Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. *Muscle Nerve.* 28:659-82.
- FİLİZ S. (2000). Hücre adezyon moleküllerinden N-CAM ve PAN-Kaderin immünreaktivitesinin erişkin sıçan dokularında dağılımının immünohistokimyasal yöntemle incelenmesi. *KOU Tıp Fakültesi. Uzmanlık Tezi.* Kocaeli.
- FİLİZ S., DALCIK H., YARDIMOĞLU M., GONCA S., CEYLAN S. (2002-a). Localization of pan-cadherin immunoreactivity in adult rat tissues. *Cell Biology International.* 26:985-991.

- FİLİZ S., DALCIK H., YARDIMOĞLU M., GONCA S., CEYLAN S. (2002-b). Localization of N-CAM immunoreactivity in adult rat tissues. *Biotechnic.and Histochemistry* 77:127-135.
- FİŞHER N., AFFORD S., ADAMS D.H. (1996). Adhesion molecules and alcoholic liver disease. *Hepatogastroenterology*. 43:1113-6.
- FOLKMAN J., D'AMORE P.A. (1996). Blood vessel formation: what is the molecular basis? *Cell*. 87:1153.
- FORSTERMANN U., MUGGE A., ALHEID U., HAVERICH U., FROLICH J.C. (1988). Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ. Res.* 62:185-90.
- FRANK S., HUBNER G., BREIER G., LONGAKER M.T., GREENHALG D.G., WERNER S. (1995). Regulation of VEGF expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J. Biol. Chem.* 270:12607-12613.
- FRENETTE P.S., WAGNER D.D. (1996-a). Adhesion molecules-Part I. *N. Eng. J. Med.* 334:1526-1529.
- FRENETTE P.S., WAGNER D.D. (1996-b). Adhesion molecules-Part II *N. Eng. J. Med.* 335:43-45.
- FRYER D.G., BIRNBAUM G., LUTTRELL C.N. (1966). Human endothelium in cell culture. *J. Athero. Res.* 6:151-163.
- FURUKAWA F., FUJII K., HORIGUCHI Y., MATSUYOSHI N., FUJITA M., TODA K., IMAMURA S., WAKITA H., SHIRAHAMA S., TAKIGAWA M. (1997). Roles of E- and P-cadherin in the human skin. *Microsc. Res. Tech.* 38:343-352.
- GANONG W.F. (1999). *Tıbbi Fizyoloji*. 19. Baskı. İstanbul. Bölüm: 30-31. s.:612, 627-642.
- GARTNER L.P., HIATT J.L. (2001). *Color Textbook of Histology*. 2nd Ed. USA. Chapter: 11. p.:251-271.
- GHO Y.S., KIM P.N., LI H., ELKIN M., KLEINMAN H.K. (2001). Stimulation of tumor growth by human soluble ICAM-1. *Cancer Research*. 61:4253-4257.
- GRABNER R., TILL U., HELLER R. (2000). Flow cytometric determination of E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 in formaldehyde-fixed endothelial cell monolayers. *Cytometry*. 40:238-244.

- GROOBY W., KRISHNAN R., RUSS G.R. (1997). Characterization of ovine umbilical vein endothelial cells and their expression of cell adhesion molecules: Comparative study with human endothelial cells. *Immunology and Cell Biology*. 75:21-28.
- GULUBOVA M.V. (1998). ICAM-1 expression in the liver of patients with extrahepatic cholestasis. *Acta Histochem*. 100:59-74.
- HARADA S., NAGY J.A., SULLIVAN K.A., THOMAS K.A., ENDO N., RODAN G.A., RODAN S.B. (1994). Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J Clin Invest*. 93:2490-2496.
- HASHIMOTO M., NIWA O., NITTA Y., TAKEICHI M., YOKORO K. (1989). Unstable expression of E-cadherin adhesion molecules in metastatic ovarian tumor cells. *Jpn. J. Cancer Res*. 80:459-463.
- HOPE S.A., MEREDITH I.T. (2003). Cellular adhesion molecules and cardiovascular disease. Part 1. Their expression and role in atherogenesis. *Intern. Med. J*. 33:380-6.
- HYAFIL F., MORELLO D., BABINET C., JACOB F. (1980). A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonic carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell*. 21:927-934.
- HYAFIL F., BABINET C., JACOB F. (1981). Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell*. 26:447-454.
- HYNES R.O. (1996). Targeted mutations in cell adhesion genes: what have we learned from them? *Dev. Biol*. 180:402.
- IVANOV D., PHILIPOVA M., TKACHUK V., ERNE P., RESINK T. (2004). Cell adhesion molecule t-cadherin regulates vascular cell adhesion, phenotype and motility. *Experimental Cell Research*. 293.207-218.
- JAFFE E.A., NACHMAN R.L., BECKER C.G. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical cord veins: identification by morphologic criteria. *J. Clin. Invest*. 52:2745.
- JAFFE E.A. (1984). Culture and identification of large vessel endothelial cells. *Biology of Endothelial Cells* (Jaffe E.A., ed.). Martinus Nijhoff. Boston. p.:1-13.
- JELTSCH M., KAIPAINEN A., JOUKOV V., MENG X., LAKSO M., RAUVALA H., SWARTZ M., FUKUMURA D., JAIN R.K., ALITALO K. (1997). Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*. 276:1423-1425.

- JHONSON J.P. (1991). Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression of metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev.* 10:11-22.
- JUNQUEIRA L.C., CARNEIRO J., KELLEY R.O. (1998). *Temel Histoloji.* 8. Baskı. İstanbul. Bölüm: 11. s.:202-217.
- KANSAS G.S. (1996). Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood.* 88:3259-3287.
- KELLY K. A., NATARAJAN S., RUTHER P., WISSE A., CHANG M.H., AULT K.A. (2001). Chlamydia trachomatis infection induces mucosal addressin cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1, providing an immunologic link between the fallopian tube and other mucosal tissues. *J. Infect. Dis.* 184:885-91.
- KIKUCHI H. (2000). Differential influences of bFGF and VEGF on the expression of vascular cell adhesion molecules-1 on HUVECs. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* 23:12-21.
- KIM I., MOON S., KIM H.S., KIM H.J., KOH Y.S., KOH G.Y. (2001-a). VEGF Expression of ICAM-1, VCAM-1, and P-selectin through nuclear factor-KB activation in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276:7614-7620.
- KIM I., MOON S., PARK K. P., CHAE S.W., KOH Y. (2001-b). Angiopoietin-1 Reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1 and P-selectin expression. *Circ. Res.* 89:477-479.
- KOTOWICZ K., DIXON G.L.J., KLEIN M.J., PETERS M.J., CALLARD R.E. (2000). Biological function of CD40 on human endothelial cells: costimulation with CD40 ligand and interleukin-4 selectively induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and P-selectin resulting in preferential adhesion of lymphocytes. *Immunology.* 100:441-448.
- KUMAR S., WEST D.C., AGER A. (1987). Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels. *Differentiation.* 36:57.
- KUZMENKO Y.S., KERN F., BOCHKOV V.N., TKACHUK V.A., RESING T.S. (1998). Density and proliferation status-dependent expression of T-cadherin, a novel lipoprotein-binding glycoprotein: a function in negative regulations of smooth muscle cell growth. *FEBS Lett.* 434:183-187.
- LEFER A.M. (1999). Role of the β -Integrins and immunoglobulin superfamily members in myocardial ischemia-reperfusion. *Ann. Thorac. Surg.* 68:1920-3.

- LEVİN E.G., OSBORN K.G. (1997). The expression of endothelial cell tissue plasminogen activator in vivo: a function defined by vessel size and anatomic location. *J. Cell Sci.* 11:139.
- LORENZON P., VECILE E., NARDON E., FERRERO E., HARLAN J.M., TEDESCO F., DOBRINA A. (1998). Endothelial cell E- and P-Selectin and Vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors *The Journal of Cell Biology.* 142:1381-1391.
- LÖSTER K., KANNICHT C. (2000). Enzymatic quantification of cell-matrix and cell-cell adhesion. *Micron.* 31:41-53.
- LUSCINCAS F.W., LAWLER J. (1994). Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB J.* 8:929-938.
- MALİK A.B., LO S.K. (1996). Vascular endothelial adhesion molecules and tissue inflammation. *Pharmacol. Rev.* 48:213-229.
- MARCONCINI L., MARCHIO S., MORBIDELLI L., CARTOCCI E., ALBINI A., ZICHE M., BUSSOLINO F., OLIVIERO S. (1999). c-fos-induced growth factor/VEGF-D induces angiogenesis in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(17):9671-9676.
- MELDER R.J., KOENİG G.C., MUNN L.L., JAIN R.K. (1996). Adhesion of activated natural killer cells to tumor necrosis factor-alpha-treated endothelium under physiological flow conditions. *Nat. Immun.* 15:154-63.
- MEREDITH I.T., YEUNG A.C., WEIDINGER F.F., ANDERSON T.J., UEHATA A., RYAN T.J., SELWYN A.P., GANZ P. (1993). Role of impaired endothelium-dependent vasodilation in ischemic manifestations of coronary artery disease. *Circulation.* 87 (suppl.V):V56-V66.
- MILICI A.J., FURIE M.B., CARLEY W.W. (1985). The formation of fenestrations and channels by capillary endothelium in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:6181.
- MİLLAUER B., SHAWVER L.K., PLATE K.H., RİSAU W., ULLRİCH A. (1994). Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature.* 367:576-579.
- MİRO X., CASACUBERTA J.M., GUTIERREZ-LOPEZ M.D., de LANDAZURI M.O., PUIGDOMENECH P. (2000). Phosphodiesterases 4D and 7A splice variants in the response of huvec cells to TNF- α . *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 274:415-421.
- MOINI H., (1997). 17 B-Estradiolün endotel hücrelerinin serbest kalsiyum düzeyleri ve asetil koline cevapları üzerine etkileri *M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü,* Doktora Tezi. İstanbul.

- MONACCI W.T., MERRILL M.J., OLDFIELD E.F. (1993). Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am J Physiol.* 264:C995-C1002.
- MORGAN D. M. L. (1996). *Human Cell Culture Protocols* (Jones G.E, ed.) "Isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells" Chapter: 9. p:101-110.
- MORGAN D.M.L., CLOVER J., PEARSON J.D. (1998). Effects of syntethic polycations on leucine incorporation, lactate dehydrogenase release, and morphology of HUVEC. *J. Cell. Sci.* 91:231-238.
- MORIN O., PATRY P., LAFLEUR L. (1984). Heterogeneity of endothelial cells of adult rat liver as resolved by sedimentation velocity and flow cytometry. *J. Cell. Physiol.* 119:327.
- MURAKAMI S., MORIOKA T., NAKAGAWA Y., SUZUKI Y., ARAKAWA M., OITE T. (2001). Expressions of adhesion molecules by cultured human glomerular endothelial cells in response to cytokines: comparison to HUVEC and human dermal microvascular endothelial cells. *Microvascular Research.* 62:383-391.
- MUSTJOKI S., ALITALO R., ELONEN E., CARPEN O., GAHMBERG C.G., VAHERI A. (2001). ICAM-1 in extravasation of normal mononuclear and leukaemia cells. *British Journal of Haematology.* 113:989-1000.
- NAKAMURA S., NARUSE M., NARUSE K., DEMURA H. (1990). Immunocytochemical localization of endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Histochemistry.* 94:475-477.
- NISHIBORI M., TAKAHASHI H.K., MORI S. (2003). The regulation of ICAM-1 and LFA-1 interaction by autacoids and statins: a novel strategy for controlling inflammation and immune responses. *J. Pharmacol. Sci.* 92:7-12.
- ORTEGA N., L'FAQIHI F-E., PLOUET J. (1998). Control of VEGF angiogenic activity by the extracellular matrix. *Biology of the Cell.* 90:381-390.
- PALIS J., McGRATH K.E., KINGSLEY P.D. (1995). Initiation of hematopoiesis and angiogenesis in murine yolk sac explants. *Blood.* 86:156.
- PAWANKAR R., TOMIYAMA S., JINNOUCHIK., IKEZONO T., NONAKA M., YAGI T. (1998). ICAM-1 Expression in the inner ear of rats following secondary immune reaction in the endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol.* 539:5-14.

- PU F.R., WILLIAMS R.L., MARKKULA T.K., HUNT J.A. (2002-a). Expression of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules on monocyte adhesion to human endothelial cells on plasma treated PET and PTFE in vitro. *Biomaterials*. 23:4705-4718.
- PU F.R., WILLIAMS R.L., MARKKULA T.K., HUNT J.A. (2002-b). Effects of plazma treated PET and PTFE on expression of adhesion molecules by human endothelial cells in vitro. *Biomaterials*. 23:2411-2428.
- QI J, KREUTZER D.L., PIELA-SMITH T.H. (1997). fibrin induction of ICAM-1 expression in human vascular endothelial cells. *The Journal of Imminology*. 158:1880-1886.
- RANSCHT B., BBRONNER-FRASER M. (1991). T-cadherin expression alternates with migrating neural crest cells in the trunk of the avian embryo. *Development*. 111:15-22.
- RİSAU W., FLAMME I. (1995). Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11:73.
- RİSAU W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 386:671-674.
- ROSS M.H., KAYE G.I., PAWLINA W. (2003). *Histology*. 4th Ed. Chapter: 4 and 12. p.:96-111, 326-355.
- SADLER T.W. (1996). *Medikal Embriyoloji*. 7. Baskı. Ankara. Bölüm: 12. s.:65-87, 175-220.
- SANKAR S., MAHOOTI-BROOKS N., BENSEN L., McCARTHY T.L., CENTRELLA M., MADRI J.A. (1996). Modulation of TGF- β receptor levels on microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis. *J. Clin. Invest.*97:1436.
- SANTOS W.L.C., RAHMAN J., KLEIN N., MALE D.K. (1996). Control of lymphocyte adhesion to brain and aortic endothelium: ICAM-1, VCAM-1 and negative charge. *Journal of Neuroimmunology*. 66:125134.
- SATO T.N., TOZAWA Y., DEUTSCH U., WOLBURG-BUCHHOLZ K., FUJIWARA Y., GENDRON-MAGUIRE M., GRIDLEY T., WOLBURG H., RISAU W., QIN Y. (1995). Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*. 376:70.
- SEN C.K., BAGCHI D. (2001). Regulation of inducible adhesion molecule expression in human endothelial cells by grape seed proanthocyanidin extract. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 216:1-7.
- SHALABY R., ROSSANT J., YAMAGUCHI T.P., GERTSENSTEIN M., WU X., BREITMAN M.L., SCHUH A.C., (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature*. 376:62.

- SHIBUYA M., YAMAGUCHI S., YAMANE A., IKADA T., TOJO T., MATSUSHIME H., SATO M. (1990). Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*.8:519-524.
- SHWEIKI D., ITIN A., SOFFER D., KESHET E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 359:843-845.
- SJODIN A., DAHL U., SEMB H. (1995). Mouse R-cadherin: expression during the organogenesis of pancreas and gastrointestinal tract. *Exp. Cell. Res.* 221:413-425.
- SPRINGER T.A. (1995). Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* 57:827.
- STEINHOFF G., BRANDT M. (1996). Adhesion molecules in liver transplantation. *Hepatogastroenterology*. 43:1117-23.
- STERNBERG S.S. (1997). *Histology for Pathologists*. 2nd Ed. USA. Chapter: 41. p.:961-967.
- STOLPE A., SAAG P.T. (1996). Intercellular adhesion molecule-1. *J. Mol. Med.* 74:13-33.
- SYRIGOS K.N., HARRINGTON K.J., PIGNATELLI M. (1999). Role of adhesion molecules in bladder cancer: an important part of the jigsaw. *Urology*. 53:428-434.
- TAKEICHI M. (1977). Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J. Cell. Biol.* 75:464-474.
- TAKEICHI M. (1988). The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*. 102:639-655.
- THOMAS K.A. (1996). VEGF, a potent and selective angiogenic agent. *The Journal of Biological Chemistry*. 271:603-606.
- TILLE J.C., WOOD J., MANDRIOTA S.J., SCHNELL C., FERRARI S., MESTAN J., ZHU Z., WITTE L., PEPPER M.S. (2001). VEGF receptor-2 antagonists inhibit VEGF and basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vivo and in vitro. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 299:1073-1085.

- TUGAY M., FİLİZ S., DALCIK H., GÜVENÇ H.B., DALCIK C., KORKMAZ M., SÖZÜBİR S. (2003). Expression of cell adhesion molecules in the adriamycin-induced esophageal rat model. *Cell Biology International*. 27:929-933.
- VLEMINCKX K., VAKAET L., MAREEL M., FIERIS W., VAN ROY F. (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*. 66:107-119.
- VLEMINCKX K., KEMLER R. (1999). Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. *BioEssays*. 21:211-220.
- VOLPES R. (1996). Adhesion molecules in viral hepatitis. *Hepato-Gastroenterology*. 43:1106-1108.
- VURAL B., SOLAKOĞLU S., DALCIK H., VURAL F., DALCIK C., ERK A., YÜCESOY İ. (2000). Antiproliferative effects and IGF-1 expression in Balb-C 3T3 fibroblasts after treatment with somatostatin and gonadotropin-releasing hormone analogs. *Acta Histochem*. 102:353-363.
- WEINSTEIN R., WENC K. (1986). Growth factor responses of human arterial endothelial cells in vitro. *In vitro Cellular and Developmental Biol*. 22:549-556.
- WILLIAMS A.F. (1987). A year in the life of the immunoglobulin superfamily. *Immunol. Today*. 8:298-303.
- WHATLEY R.E., ZIMMERMAN G.A., PRESCOT S.M., McINTYRE T.M. (1996). PAF and PAF-like mimetics. *Handbook Lipid Res*. 8:239.
- YANCOPOULOS G.D., DAVIS S., GALE N.W., RUDGE J.S., WIEGAND S.J., HOLASH J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 407:242-248.
- YUE X., TOMANEK R.J. (2001). Effects of VEGF165 and VEGF121 on vasculogenesis and angiogenesis in cultured embryonic quail hearts. *Heart and Circulatory Physiology*. 280:H2240-H2247.
- ZACHARY I. (1998). Molecules in focus VEGF. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 30:1169-1174.
- ZAPOLSKA-DOWNAR D., ZAPOLSKI-DOWNAR A., MARKIEVSKI M., CIECHANOWICZ A., KACZMARCZYK M., NARUSZEWICZ M. (2000). Selective inhibition by α -tocopherol of vascular cell adhesion molecule-1 expression in human vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 274:609-615.

ZHANG F., YU W., HARGROVE J.L., GREENSPAN P., DEAN R.G., TAYLOR E.W., HARTLE D.K. (2002). Inhibition of TNF- α induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium. *Atherosclerosis*. 161:381-386.

ZHANG X., WANG L., JIANG T., ZHANG H., DOU Y., ZHAO J., ZHAO H., QIAO Z., QIAO J. (2002). Effects of testosterone and 17- β -estradiol on TNF- α -induced E-selectin and VCAM-1 expression in endothelial cells analysis of the underlying receptor pathways. *Life Sciences*. 71: 15-29.

ZHU D., CHENG C., PAULI B.U. (1991). Mediation of lung metastasis of murine melanoma by a lung-specific endothelial cell adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88:9568.



ÖZGEÇMİŞ

29 Nisan 1966'da Ayancık'ta doğdu. İlk öğrenimini, Balıkesir 6 Eylül İlkokulu'nda tamamladı. Orta öğrenimini, Ankara Bahçelievler Ortaokulu'nda; liseyi ise Ankara Bahçelievler Deneme Lisesi'nde tamamladı. Yüksek öğrenimini Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 1991 yılında tamamladıktan sonra, pratisyen hekim olarak Ankara Elmadağ Merkez Sağlık Ocağı'nda 3 yıl çalıştı. Daha sonra Sağlık Bakanlığı Kanserele Savaş Dairesi Başkanlığı'nda Başkan Yardımcısı olarak 5 yıl görev yaptı. Askerliğini Ankara Harita Genel Komutanlığı'nda dönem birincisi olarak yaptı. 1999 güz döneminde Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora Eğitimi'ne başladı.