

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAYMA GERİLMELERİNİN (SHEAR STRESS)
ENDOTEL HÜCRE TABAKASININ
PERMEABİLİTESİNE OLAN ETKİLERİNİN
AKIM ODACIĞINDA İNCELENMESİ**

İLYAS İNCİ

**BİYOMEKANİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYELERİ
PROF. DR. HASAN TATARİ
PROF. DR. AYŞEGÜL TEMİZ-ARTMANN

İZMİR-2007

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAYMA GERİLMELERİNİN (SHEAR STRESS)
ENDOTEL HÜCRE TABAKASININ
PERMEABİLİTESİNE OLAN ETKİLERİNİN
AKIM ODACIĞINDA İNCELENMESİ**

**BİYOMEKANİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İLYAS İNCİ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYELERİ
PROF. DR. HASAN TATARI
PROF. DR. AYŞEGÜL TEMİZ-ARTMANN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

Tablo Dizini.....	i
Şekil Dizini.....	ii
Özet.....	iii
Abstract.....	iv

BÖLÜM I

GİRİŞ.....	1
1.1 Endotel Hücre Tabakası ve Kayma Gerilmeleri Arasındaki İlişki.....	1
1.2 Araştırmanın Amacı.....	3

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kayma Gerilmesi.....	4
2.2. Endotel Tabaka.....	5
2.2.1. Endotel Tabakanın Bariyer İşlevi.....	5
2.2.2. Sıkı Bağlantılar(Tight Junctions).....	5
2.2.3. Ara Bağlantılar (Gap Junctions).....	6
2.2.4. Adherens Bağlantılar (Adherens Junctions).....	6
2.2.5.Endotel Tabakada Madde Taşınmasına Sıvıların Mekanik Etkileri.....	8
2.2.6.Kayma Gerilmelerinin Sıkı Bağlantılar Üzerine Etkileri.....	10
2.2.7. Kayma Gerilmelerinin Adherens Bağlantılar Üzerine Etkileri.....	11
2.2.8.Kayma Gerilmelerinin Sızıntılı Bağlantılar Üzerine Etkileri.....	12
2.2.9.Kayma Gerilmelerinin Veziküller Üzerine Etkileri.....	13

BÖLÜM III

GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
3.1. Malzemeler.....	14
3.2. Hücre Kültürü.....	14
3.2.1. Kollajen Jel Hazırlanması.....	15
3.2.2 Agaroz Jel Hazırlanması.....	16
3.2.3 Jelâtin Jel Hazırlanması.....	16
3.3 Kayma Gerilmelerinin Uygulanması.....	17

3.4 Permeabilitenin Ölçülmesi.....	18
---	-----------

BÖLÜM IV

BULGULAR.....	20
----------------------	-----------

BÖLÜM V

TARTIŞMA.....	26
----------------------	-----------

BÖLÜM VI

SONUÇ VE ÖNERİLER	30
--------------------------------	-----------

6.1. Sonuçlar	30
----------------------------	-----------

6.2. Öneriler	30
----------------------------	-----------

KAYNAKLAR	31
------------------------	-----------

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Örneklerdeki kollajen jellerdeki FITC-dextranın ulaştığı derinlikler.....	20
Tablo 2. Kollajen jellerdeki FITC-dextranın ulaştığı derinliklerin ortalamaları	24
Tablo 3. Kollajen jellerdeki FITC-dextranın ulaştığı derinliklerin ortalamalarının Mean-Whitney U Testi için sıra değerleri	25

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Damar duvarının kesitsel şekli.....	4
Şekil 2. Sıkı bağlantıların ve Adherens bağlantıların düzenlenişi	7
Şekil 3. Hazırlanan kollajen jel çözeltisinin üzerinden akım geçirilecek lamaların bölmelerine eklenmesi.....	15
Şekil 4. Kollajen jel üzerinde çoğalan endotel hücrelerinin inverted mikroskoptaki görüntüsü.....	16
Şekil 5. Kayma gerilmesinin uygulanması için akım odası, atımlı pompa ve kılcal plastik borulardan oluşan düzenek	17
Şekil 6. Akım lamının, akım odasına yerleştirilmesi ve akım odasının kapatılması	18
Şekil 7. Floresan mikroskop ile permeabilitenin ölçülmesi	18
Şekil 8. Kollajen jellerdeki FITC-dextranın permeabilitesinin deney grubundaki (A) ve kontrol grubundaki (B) görüntülerinin LSM Image Browser programındaki görüntüleri	18
Şekil 9. Kayma gerilmesi uygulanmış endotel hücre tabakasının floresan mikroskoptaki görüntüsü	19
Şekil 10. LSM Image Browser programında, kollajen jellerdeki FITC-dextran derinliği ölçülürken kullanılan ölçütler.....	19

ÖZET:**KAYMA GERİLMELERİNİN (SHEAR STRESS) ENDOTEL HÜCRE PERMEABİLİTESİNE OLAN ETKİLERİNİN AKIM ODACIĞINDA İNCELENMESİ**

İlyas İNCİ

Dokuz Eylül Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyomekanik Anabilim Dalı

35340 İnciraltı/İZMİR

Kayma gerilmeleri (shear stress), endotel hücre tabakasının bariyer işlevlerini yerine getirmesi açısından önemli kabul edilmektedir. Bu çalışmada kültür ortamında kollajen jel üzerinde yayılmış olan bovin aortik endotel hücre tabakası üzerine belirli bir değerde kayma gerilmeleri uygulandı. Bu çalışmanın amacı; kayma gerilmelerinin uygulanmasıyla endotel tabaka geçirgenliğinin arttığı yönünde olan ve birçok çalışma tarafından da desteklenmiş olan görüş vasıtasıyla yeni oluşturulan *in vitro* kayma gerilmesi uygulama modelinin denenmesidir. Bunun için 1 saat süresince akım odacığında (flow chamber) endotel hücre tabakasına 5 dyne/cm² değerinde kayma gerilmesi uygulandı. Daha sonra permeabilite ölçümü konfokal mikroskop ile yapıldı. Sonuç olarak; 1 saat boyunca sıvı akımı uygulanan hücre tabakasında, sıvı akımı uygulanmayan kontrol grubuna oranla fluoresan boya ile işaretlenmiş dextranın (FITC-dextran, molekül ağırlığı: 77000 dalton) endotel tabakadan geçerek kollajen jel içinde daha derinlere ulaştığı gözlemlendi.

Bu sonuçlar ile kayma gerilmesi uygulanmasıyla geçirgenliğin arttığı yönündeki görüş arasında paralellik olduğu görüldü ve oluşturulan yeni *in vitro* kayma gerilmesi uygulama modelinin geçerliliği kanıtlandı.

Anahtar Kelimeler: Kayma gerilmesi; akım odacığı; endotel permeabilite; kollajen jel

ABSTRACT:**INVESTIGATION OF EFFECTS OF SHEAR STRESS ON ENDOTHELIAL PERMEABILITY VIA FLOW CHAMBER**

İlyas İNCİ

Dokuz Eylül University

Institute of Health Science

Department of Biomechanics

35340 İnciraltı/İZMİR

The importance of shear stress is accepted for endothelial cell layer to perform its barrier function. In this study, in cell culture condition after confluence of bovine endothelial cells on collagen gel, a certain value of shear stress was applied. The aim of this study is examination of new constructed shear stress application model via a hypothesis which claims increase on endothelial permeability monolayer via application of shear stress. This hypothesis is supported with many studies. For this purpose, 5 dyne/ cm² shear stress was applied on endothelial cell monolayer for 1 hour in flow chamber. Measurement of permeability was performed by using confocal microscopy. In conclusion, it has been observed that diffusion of fluorescent stain labeled dextran (FITC-dextran, Molecular Weight: 77 000 dalton) into collagen gel in cell monolayer which fluid flow was applied for 1 hour, is more deeper than the control group which fluid flow wasn't applied.

These results showed that there is accordance with the hypothesis which claims an increase on permeability via application of shear stress and also results showed that new constructed shear stress application model is suitable for endothelial permeability researches.

Keywords: Shear stress; flow chamber; endothelial permeability; collagen gel

BÖLÜM I

1.GİRİŞ:

1.1. Endotel Hücre Tabakası ve Kayma Gerilmeleri Arasındaki İlişki

Endotel hücreleri, damarların iç yüzeyini kaplayan hücrelerdir. Kan akışı sırasında endotel hücrelerinden oluşan endotel tabakasının maruz kaldığı sürtünme kuvvetine kayma gerilmeleri denir.

Kayma gerilmesi; kan akışı, damar geometrisi ve sıvı viskozitesiyle belirlenen ve birimi dyn/cm^2 olan biyomekanik bir büyüklüktür (1). Endotel tabakası, kayma gerilmesi kuvvetlerine doğrudan maruz kalır ve bu kuvvetler endotel hücrelerinin yapısını ve fonksiyonunu düzenler (2).

Vasküler permeabilite; sıvıların ve moleküllerin vasküler doku ve vasküler doku dışı kısımlar arasındaki hareketidir.

Endotel tabakasının kayma gerilmelerine en belirgin yapısal tepkisi, hücre şeklinde ve yönlendirilmesinde olur. In vivo olarak kayma gerilmelerinin düşük seviyede olduğu yerlerde veya in vitro olarak statik kültür ortamlarındaki hücrelerde küboidal, parke taşı şeklinde bir morfoloji gözlenirken, normal veya yüksek seviyede kayma gerilmesinin olduğu sıvı akımlarında hücrelerde uzama ve akımın olduğu yöne doğru yönelme gözlenmiştir (3,4).

Vasküler endotel tabakası, kan ile dokular arasındaki su ve çözülmüş madde geçişi için esas bariyer konumundadır. Starling (5), dokulara doğru moleküllerin filtrasyonunu sağlayan basınç kuvvetlerini ilk tanımlayan kişidir. Hidrostatik basınç; su ve çözülmüş maddelerin damar dışına çıkmasını sağlayan kuvvettir, bununla birlikte onkotik basınç denilen ve temel olarak hücre içindeki protein ve kolloidlerden kaynaklanan karşıt bir kuvvet vardır.

Kayma gerilmelerinden kaynaklanan kuvvete bağlı endotel geçiş, kan akışındaki değişimlere bağlı olarak damarların dokulara besin teminini düzenleyen fizyolojik bir mekanizma sağlar. Bununla birlikte, kan-doku bariyerinin düzensizleşmesine yol açan belirgin hemodinamik bozulmalar arteroskleroz, hipertansiyon ve diyabet gibi hastalıklarda gözlenmiştir (6–9).

Endotel hücreleri, doğal çevrelerinde, hücre permeabilitesinin değişmesine yol açan fiziksel ve biyokimyasal uyarılara sürekli olarak maruz kalmaktadırlar. Makromoleküllerin endotel bariyerden geçişleri; akım kayma gerilmelerine, hidrostatik basınca, termal şoka ve histamin, trombin, bradikinin ve pharbol 12-myristate 13-acetate (PMA) gibi etkenlere duyarlıdır (10–16).

Endotel tabakası ile hücre kültürü çalışmaları, su ve proteinlerin endotel tabakadan geçişi ile ilgili mekanizmaların daha iyi anlaşılabilmesini kolaylaştırmıştır (17). Bovin aortik endotel hücrelerinin, 10 dyn/cm^2 kayma gerilmelerine maruz bırakılması albumin geçirgenliğini hızlıca

arttırmış, 30 dakika içinde en üst seviyeye ulaşmış ve akım olmadığı zaman oluşan permeabilite seviyesinin 10 katından daha fazla bir seviyede olan permeabilite korunmuştur. Karşılaştırma olması için, hücreler 1 dyn/cm² kayma gerilmelerine maruz bırakıldığında, albumin permeabilitesinin maksimum seviyeye ulaşması için ve akım olmadığında oluşan permeabilite seviyesinin 2 katının korunması için, 1 saatten daha fazla bir süre gerekmiştir (13).

Hidrolik iletkenlik, 10 dyn/cm² kayma gerilmelerinin 1 saat uygulanması ile 2.2 kat artmış ve kayma gerilmelerinin sonlandırılmasından sonra yüksek bir seviyede kalmıştır. Mikroskobik incelemeler, kayma gerilmelerinden sonra endotel tabakasında herhangi bir hasar olmadığını göstermiştir ve böylece hidrolik iletkenliğin artmasının endotel tabaka hasarına bağlı olmadığını göstermiştir (18).

Toplardamarların ve atardamarların fizyolojik kayma gerilmeleri sınırları sırasıyla 1-5 ve 6-40 dyn/cm² dir (119).

Birçok biyolojik faktör, endotel bağlantıları düzenler ve böylece endotel tabakasının geçirgenliği ayarlanmış olur (19).

Trombin ve histamin gibi enflamatuar düzenleyiciler, endotel permeabiliteyi birkaç dakika içinde arttırdığı iyi bilinen faktörlerdir. Permeabilite düzenlenmesindeki mekanizmalar; endotel bağlantıların düzenlenmesi ve bununla bağlantılı olarak daha sonra oluşan aktin-miyozin kontraksiyonuyla ilişkili olan proteinlerin fosforilasyonu, endotel hücrelerin merkezi olarak geri çekilmesi ve endotel hücrelerarası bağlantıların oluşumlarının artmasıdır. Böylece endotel bağlantılardan makro moleküllerin geçişi (paraselüler transport), en azından bilinen enflamatuar düzenleyicilere cevap olarak, endotel permeabilitenin artmasındaki en önemli mekanizmadır (20,21).

Endotel bağlantılar arasından geçiş esas yol olmakla birlikte, makromoleküller endotel tabakasını veziküller vasıtasıyla da geçebilirler (21).

Birçok dış kaynaklı maddelerin, bunlardan besleyici maddelerin, örneğin belirli yağ asitlerinin, endotel tabaka permeabilitesinin artmasına neden olduğu gösterilmiştir (22-24). Yağ asitleriyle ilişkili olarak endotel permeabilitede meydana gelen değişikliklerin ayrıntılı mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (25). Bununla birlikte, bunlar endotel bağlantıların bozulmasını ve endotel hücrelerin geri çekilmesini içeriyor olabilir (26).

Nitrik oksit; monosit adhezyonunu, vasküler düz kas hücrelerinin çoğalmasını ve platelet adhezyonunu ve hücre içi pıhtılaşma mekanizmasının aktive edilmesini engeller (27).Bütün bu etkenler arterosklerozun gelişmesinde önemlidir, çünkü insüline karşı dirençte ve diyabette NO üretiminin azalmasının diyabetle ilgili vasküler rahatsızlıkların gelişmesinde merkezi bir önemi olduğuna inanılmaktadır (28).

VEGF; vasküler permeabiliteyi ve yeni damar oluşumunu (anjyogenez) düzenler, bunun yanında vasküler düz kas hücrelerinin çoğalmasını ve tromboz oluşumunu önler (29). Diyabette ve insüline karşı direnç oluşumunda, vasküler sistemden salınan VEGF miktarında azalma olur (30).

Tip 2 diyabetli hastalarda ve 2 saat boyunca hiperglisemi oluşturulan sağlıklı bireylerde, çözünür adhezyon moleküllerinin konsantrasyonunda artış olduğu görülmüştür (31).

Belirli durumlarda hücrelerin glukoza maruz bırakılması glikolitik metabolizma ürünlerinin ve glukotoksin olarak nitelendirilen glukozun etki ettiği proteinlerde çoğalmaya sebep olduğu bilinmektedir. Genel olarak hiperglisemi vasküler işlev bozukluklarına ya toksik madde ve reaktif metabolizma ürünlerinin üretimi ile ya da hücre içi sinyal yollarını değiştirerek neden olur (32).

Düşük seviyelerde akım gerilmelerinden ya da salınımlı akım gerilmelerinden dolayı, özellikle sıvı akışının düzensiz olduğu yerler, arterosklerotik plakların oluşumunda önemli bir yer tutar. Damarların eğrileştiği bölgelerde ve dallanmaların başladığı bölgelerde ikincil akım oluşumlarının ve sistemik risk faktörlerinin değişen hemodinamik kombinasyonları, arterosklerotik lezyonların başlamasına, gelişmesine ve en son olarak tamamlanmış plakların oluşmasına neden olurlar. Örneğin, azalan kayma gerilmeleri ($<5 \text{ dyn/cm}^2$) arterogenez oluşumuna neden olur çünkü bu durum endotel nitrik oksit sentaz üretimi, damarların gevşemesi ve endotel hücre onarımı gibi kan damarlarının çeperlerinin birçok fonksiyonunun azalmasıyla ilişkilidir (2).

Atardamarlardaki endotel tabakasında, paraselüler yol (endotel hücrelerin bağlantılarının arasından) ve pinositotik yol (veziküler transport mekanizması ile) endotel tabakasını geçişte en önemli yollar olarak kabul edilmektedir (33).

Yüksek tansiyonlu deney hayvanlarıyla yapılan çok sayıda çalışma, paraselüler yollarda genişleme (34–37) ve veziküler transportta artış (38–43) olduğunu göstermiştir.

Bu şekilde endotel tabaka geçişinde permeabilite artışı olması arteroskleroz (44), hipertansif ensefalopatiler (45,46) ve diğer vasküler rahatsızlıklarla ilişkilendirilmiştir.

1.2. Araştırmanın Amacı

Bu projenin amacı; endotel hücrelerinin, vücutta maruz kaldıkları kayma gerilmelerinin (shear stress) laboratuvar ortamında in vitro olarak akım odacığı kullanarak uygulanması ve böylece kayma gerilmelerine maruz kalan hücrelerde meydana gelen permeabilite değişikliklerinin incelenbilmesidir.

BÖLÜM II

2. GENEL BİLGİLER:

2.1. KAYMA GERİLMESİ

Kan akışındaki hemodinamik kuvvetler ve sıvı sürtünme kuvveti ile vasküler çeper arasındaki etkileşim, çeper kayma gerilmelerine neden olur. Tanım olarak, her bir yüzey alanı ile bu alana uygulanan teğetsel kuvvetin birbirine oranına kayma gerilmeleri denir. Endotel hücrelerin üzerindeki kayma gerilmeleri, çeperdeki hızın derecesiyle ve akan sıvının temas bölgesinde sürtünme sayesinde kayma kuvvetlerini iletebilmesiyle belirlenir.

Sıvı kayma özelliklerini ilemesine, sıvının viskozitesi denir. Sıvı hız profilinde bir değişim vardır, çünkü tipik olarak sıvılar çeperde kaymadığı için, çeperdeki hız ihmal edilebilir. Bir tüp içindeki çalkantısız, düzgün bir akışta örneğin bir arter kısmında, silindirik olarak x-ekseninde hız en yüksektir ve diğer hızlar bu x-eksenine simetriklerdir. Momentumun korunumu kanunları, hız profilinin özel ifadesini belirleme vasıtasıyla kayma gerilmelerini hesaplamak için kullanılır.

Sıvı viskozitesi, kayma oranına bağlı olmasına rağmen, sıvılar örneğin hücre ortamı tipik olarak kayma oranı ile büyük oranda değişmez. Bundan dolayı, kayma oranı veya hız değişiminin, sıvı viskozitesi ile çarpımı kayma gerilmelerinin hesaplanmasını sağlar. Arterlerin lümenindeki endotel hücre şekli akışı değiştirebileceğinden dolayı çepere uygulanan kayma gerilmeleri tam olarak bilinemeyebilir. Bu yüzden kayma gerilmesi dağılımını tam olarak yansıtmayan genel kayma gerilmeleri değerleri kullanılır, çünkü sadece hücre topografyası deneysel olarak hesaplanırsa kesin değerler bulunabilir (47).

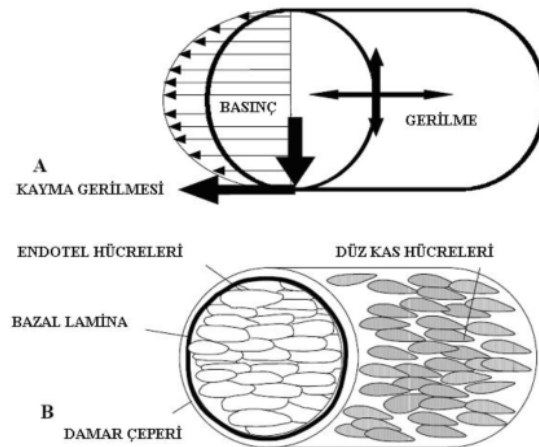


Figure 3. Schematic of a section of a blood vessel wall. Arrows indicate the hemodynamic force components acting on the vessel wall (A). The main vascular wall components are also shown (B).

Şekil 1. Damar duvarının kesitsel şekli. Oklar damar çeperine etki eden hemodinamik kuvvetleri göstermektedir (A). Temel damar çeper kısımları da gösterilmektedir (B). (Elhadj S. Chronic shear stress effects on endothelial cell response.)

2.2. ENDOTEL TABAKA

Endotel tabakası, kan elemanlarını ekstrasvasküler dokulardan ayırır. Endotel hücreler, damarların lümenini sararlar ve internal elastik laminaya kadar uzanan ekstraselüler matriks tarafından oluşturulmuş subendotel bölgede bulunurlar. Internal elastik lamina; tunika intima bölgesini(endotel tabaka, endotel hücreler ve subendotel bölge) tunika media bölgesinden ayırır. Vasküler endotel tabaka, vücut kütlelerinin yaklaşık 1 % kadarını oluşturur ve yüzey alanı yaklaşık olarak 5000 m² kadardır (48). İnsan endotel hücresinin yaklaşık ömür süresi 30 yıldır (49).

Vasküler endotel tabakası, damar duvarının düzenlenişinde çok önemli bir rol oynar. Buna ek olarak endotel hücrelerinin hasar görmesi veya işlevlerinin bozulması, atherosklerozun gelişmesinde önemli bir durum olarak kabul edilmektedir. Endotel tabakası; lökosit filtrasyonunu, media tabakasından intima tabakasına doğru düz kas hücrelerinin göçümünü, düz kas hücrelerinin çoğalmasını ve makrofajların şekil değiştirmiş hali olan köpük hücrelerin oluşmasını uyarır (50,51).

Endotel tabaka, vasküler çeperlerin bütünlüğünün ve metabolizmasının kontrolünü sağlayan aktif biyolojik maddelerin sentezini ve salınımını sağlar. Vasküler mekanizma, şu yönlerden kontrol edilir: a.) vasküler yapı ve geçirgenlik b.) vasküler tonus (kasılma ve gevşeme) c.) pıhtılaşma ve fibrinoliziz d.) enflamatuar cevaplar.

2.2.1. Endotel Tabakanın Bariyer İşlevi

Endotel tabaka; kan damarları ve altındaki dokular arasındaki dokular arasında makromoleküler bir bariyer oluşturur. Birçok eleman endotel tabakanın bütünlüğünü ve dolayısıyla endotel permeabiliteyi düzenler. Bunlar a.)hücreler arası bağlantılar, b.)hücre yüzeyine bağlayıcı proteinler, c.)endotel membranların elektrostatik yükü, d.)temel membranın bileşimi. Birçok kanıt bunların arasında en önemlisinin iki komşu hücre membranları arasında bağlanma oluşturan, hücrelerarası bağlantılar olduğunu göstermiştir (52,53).

Endotel hücrede 3 esas tip hücrelerarası bağlantı belirlenmiştir: sıkı bağlantılar, ara bağlantılar ve adherens bağlantılar. Bu bağlantılar, çok dinamikdir ve bir kaç dakika içinde kan bileşenlerinin dokulara geçişine geri dönüşümlü olarak izin verir. Endotel bağlantılar, sitoplâzmaya ve hücre iskelet proteinlerine bağlı membran proteinleri tarafından oluşturulur.

2.2.2. Sıkı Bağlantılar (Tight Junctions)

Sıkı bağlantılar, komşu hücreler arasında çok yakın bir temas olmasını sağlarlar. Endotel hücre çeşidine göre sıkı bağlantıların sayısı değişebilir. Örneğin, kan-beyin bariyerinin temel ögesi olan beyin endotel hücreleri, sıkı bağlantı sayısı en yüksek olandır (54). En uç bölgelerdeki

kılcal damarlarda sıkı bağlantıların çok basit veya hiç olmamasının aksine büyük atardamarlardaki endotel tabakalarda çok sayıda sıkı bağlantı vardır (52,55). Sıkı bağlantılar; ZO-1(zonula occludens-1), ZO-2(zonula occludens-2), cingulin ve rab13 gibi hücre içi proteinlerle ilişkili olan bir transmembran protein olan occludin tarafından oluşturulur. ZO-1; hücre-hücre temaslarının başlama noktalarında yer alır ve cingulin, ZO-2 ve aktin mikrofilamentleri ile bağlanabilir (55,56).

Sıkı bağlantıların, endotel tabakayı hemodinamik güçlere karşı koruduğunu kanıtlayan çalışmalar vardır. Örneğin, kültür edilmiş endotel hücreleri, laminar kayma gerilmelerine maruz bırakıldığında, sıkı bağlantı bölgelerinin sayısının arttığı gösterilmiştir. Buna ek olarak, yüksek seviyede kayma gerilmelerine maruz kalan aortta, artan sayıda sıkı bağlantı bölgeleri oluşmuştur (57). Bu bölgelerin, yağ birikimine ve atherosklerotik lezyonların gelişmesine karşı korunduğu bilinmelidir. İnsanda atheroskleroz özellikle düşük kayma gerilmelerine maruz kalan bölgelerde gelişir (58) ve bu bölgelerde sıkı bağlantı sayısı azdır.

2.2.3. Ara Bağlantılar (Gap Junctions)

Ara bağlantıları; komşu hücreler arasında iyonların ve moleküllerin değiş tokuşunu sağlar ve hidrofilik transmembran kanalları (konnekzon) tarafından meydana getirilir. Konnekzonlar, konneksin ailesindeki proteinler tarafından şekillendirilir. Örneğin, konneksin 37 (Cx 37), Cx 40, Cx 43 (59). Bununla birlikte, Cx 37 ve Cx 43 endotel hücreler için özel iken, Cx 43 proteininin dağılımı birçok hücre tipinde görülmektedir (60). Ara bağlantılarının sayısı, sıkı bağlantıların sayısı ile ilişkilidir.

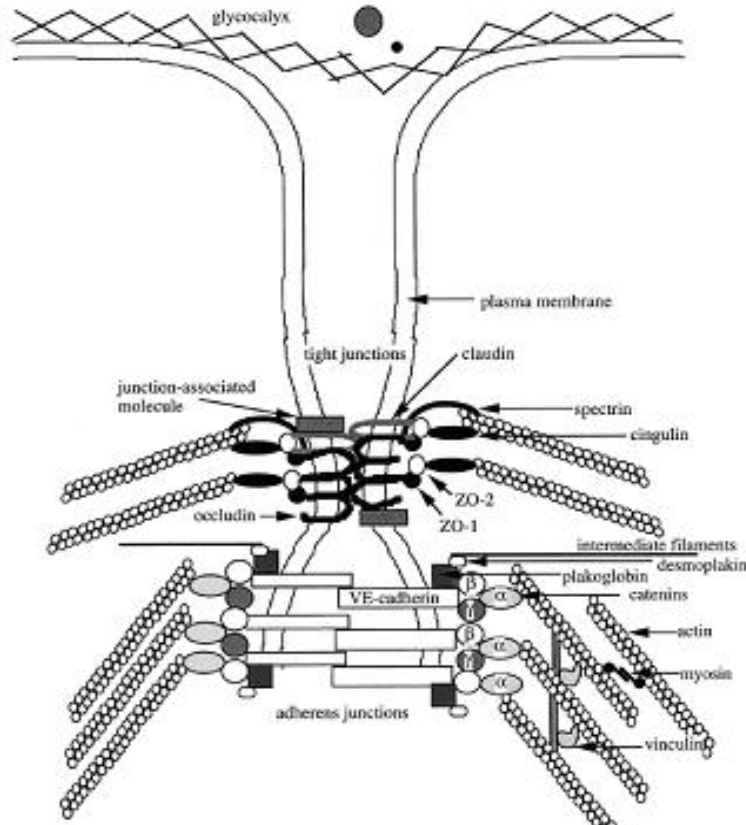
Ara bağlantılarının, endotel hücrelerinin birbiri ile (aynı tip hücre iletişimi) ve bunun yanı sıra endotel hücreleri ile diğer hücre tipleri arasında örneğin düz kas hücreleri veya lökositler ile (farklı tip hücre iletişimi) iletişim mekanizmasını sağladığı düşünülmektedir. Bu bağlantılarla ilişkili olan sinyal moleküllerinin, endotel hücre göçümünü ve yeni damar oluşumunu (anjyogenez) veya yara tamiri sırasında replikasyonu yönettiği öne sürülmüştür (52,55).

2.2.4. Adherens Bağlantılar(Adherens Junction)

Adherens bağlantılar; homofilik kalsiyuma bağlı endotel hücre tanınmasını sağlayan cadherin adlı transmembran proteinler tarafından oluşturulmuştur. Endotel hücreler, özelleşmiş ve özelleşmemiş cadherinleri ifade ederler. Birçok hücre tipinde bulunan özelleşmemiş cadherinler; N-cadherin, P-cadherin veya E-cadherin çeşitleridir. Bunların hücre korunmasındaki rolleri tartışmalıdır. Örneğin, bir çalışma endotel tabakada N-cadherinin bağlantısız olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak, endotel hücreler VE-cadherin (Vascular Endotelial cadherin) adında

özelleşmiş bir cadherin çeşidine sahiptirler. Gerçekte VE-cadherin, endotel tabakadaki adherens bağlantılarının başlıca bileşenidir (55). Cadherinler, sitoplazmik proteinlere ve aktin mikrofilamentlerine bağlanırlar ve böylece hücrelerin bağlanmasını sağlarlar. Örneğin VE-cadherin, α -actinin ve aktin mikrofilamentleri ile bağ oluşturan catenin proteinlerine (α -catenin, β -catenin, plakoglobin ve p120) bağlanır.

Adherens bağlantılar, normal endotel hücre yapısının ve permeabilitesinin korunmasında çok önemli bir rol oynarlar. Bu bağlantılara ayrıca, hem sıkı bağlantıların hem de ara bağlantıların oluşumunda ihtiyaç duyulur. Böylece, adherens bağlantıların, endotel hücre temasının temel düzenlenişinde çok önemli olduğu ve bu şekilde daha karmaşık düzenlemeler olan sıkı bağlantılara ve ara bağlantılara katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Adherens bağlantıların, hücre göçümünde, büyümesinde ve farklılaşmasında önemli bir rol oynayabileceği belirtilmiştir. Yaralanmış bölgeye endotel hücrelerinin göçümünün; plakoglobin, cateninler ve VE-cadherinin kaybolmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Adherens bağlantıların ifadelerindeki değişimler, tümör hücrelerinin istilası ve metastaz ile ilişkilendirilebilir (52, 55, 56).



Şekil 2. Sıkı bağlantıların ve adherens bağlantıların düzenlenişi (Michel CC, Curry FE. Microvascular permeability. *Physiol. Rev.* 79:703–761, 1999; Mitic LL, Anderson JM. Molecular architecture of tight junctions. *Annu. Rev. Physiol.* 60:121–142, 1998; Mitic LL, van Itallie CM, Anderson JM. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am. J. Physiol.* 289:G250–G254, 2000).

2.2.5. Endotel Tabakada Madde Taşınmasına Sıvıların Mekanik Etkileri

Hücreler arası bağlantılar, albumin boyutlarının altındaki su ve suda çözünen maddelerin geçişinde başlıca yoldur. Albumin; endotel tabakasını hücreler arası bağlantılar, sızıntılı bağlantılar ve veziküller sayesinde geçer. LDL ve yüksek moleküler ağırlıklı maddeler normal hücreler arası bağlantılardan geçişte sınırlamaya uğradıkları için, sızıntılı bağlantılardan veya veziküllerden endotel tabakasını geçişte yararlanmak zorundadırlar. Her bir geçiş yolu, endotel hücrelere etki eden akışkanların mekaniksel güçlerinden, özellikle kayma gerilmelerinden etkilenebilir.

Endotel tabakasını geçişte akışkan kayma gerilmelerinin doğrudan etkisi açık bir şekilde ilk olarak Jo ve arkadaşları (13) tarafından, paralel akım odasının kenarlarında oluşturulmuş gözenekli yapının üzerinde bovin aortası endotel hücreleri kullanılarak gösterilmiştir. Bu çalışma 10 dyn/cm^2 düzenli kayma gerilmelerinin 1 saat uygulanmasıyla albumin permeabilitesinin 10 kat arttığını göstermiştir. Kayma gerilmeleri ortadan kalktıktan 2 saat sonra permeabilite, kayma gerilmeleri uygulanmadan önceki seviyesine dönmüştür. Sill ve arkadaşları (18), 20 dyn/cm^2 düzenli kayma gerilmelerine 1 saat maruz kalan bovin aorta endotel hücre tabakasının hidrolik iletkenliğinin belirli bir biçimde arttığını göstermişlerdir.

Bazı çalışmalar aynı endotel tabaka modellerinde düzenli kayma gerilmelerine tepki olarak üretilen Nitrik Oksit (NO)'nun, hidrolik geçirgenliği düzenlemesiyle ilgili araştırmalardır. Bununla birlikte düzenli kayma gerilmelerine albumin permeabilitesiyle ilgili cevap, NO'dan bağımsızdır (61). Bu bulgular endotel tabakayı geçiş sırasında farklı biyokimyasal sinyal mekanizmaları tarafından kontrol edilen farklı geçiş yollarının, albuminin geçişinde suya oranla daha çok kullanıldığını öne sürmektedir.

McIntire ve arkadaşları tarafından (62), gözenekli polikarbonat filtreler üzerinde geliştirilen bovin beyninin mikrovasküler endotel hücre tabakası, 72 saate kadar süren, 1 veya 10 dyn/cm^2 düzenli kayma gerilmelerine maruz bırakılmış ve moleküler ağırlığı 2 milyona varan dextran moleküllerinin permeabiliteleri gözlenmiştir. En yüksek molekül ağırlıklı dextran molekülündeki permeabilitedeki en yüksek artış, 76 kat olarak 10. ve 30. saatler arasında gözlenmiş ve başlangıç seviyesine 48 saatten sonra dönmüştür.

Bovine aorta endotel hücre tabakasının, kayma gerilmelerine bağlı geçirgenliğiyle ilgili en son çalışmalar, hücre tabakaları 20 dyn/cm^2 düzenli veya $10 \pm 10 \text{ dyn/cm}^2$ salınımlı kayma gerilmelerine maruz bırakıldığında permeabilitede benzer cevabın verildiğini göstermişlerdir: 3 saat boyunca boyunca maruz bırakıldığında 3 ile 3.5 kat kadar permeabilitede bir artış. Fakat ters yöne çevrilmiş kayma gerilmelerinin büyüklüğü salınımlı olarak 3 saat boyunca $10 \pm 15 \text{ dyn/cm}^2$

olunca, başlangıç seviyesine göre permeabilite artışı olmamıştır (63). Bu şaşırtıcı tepki, ters yöne çevrilmiş salınımlı kayma gerilmeleri koşullarında permeabilite artışının baskılanması, NO üretiminin etkili bir şekilde artması ile düzenleniyor görünmektedir. Bovin aorta endotel hücre tabakalarında permeabilitenin NO'ya cevabı iki şekilde olmaktadır: Düşük seviyelerde NO artışı permeabiliteyi arttırmakta, bununla birlikte yüksek seviyelerde NO ise permeabiliteyi baskılamaktadır. Bu şekildeki iki farklı davranış, bazı hayvan çalışmalarında kayma gerilmelerindeki değişime bağlı vasküler geçiş özelliklerinde görülen zıt tepkileri anlamada yardımcı olabilir. Örneğin, Kurose ve arkadaşları (64) ve Baldwin ve arkadaşları (65) NO üretiminin, NOS tarafından baskılanması ile fare mezenterlerindeki venüllerde albumin sızıntısını attırdığını göstermişlerdir.

1991'den beri, sıvı akımına veya kayma gerilmelerine bağlı endotel geçirgenlik özellikleri ile ilgili sağlam damarlar kullanarak ve in vivo hazırlama yapılarak birçok çalışma yapılmıştır. Lever ve arkadaşları (66), 20 dakika boyunca 1 dyn/cm^2 'lik kayma gerilmelerinde meydana gelen değişme, canlı organizmanın dışında tavşan karotid arterlerinde akışın % 30 artmasını sağlamıştır. Bununla beraber permeabilitedeki artış in vitro olarak bovin aorta endotel hücre tabakaları ile karşılaştırıldığında çok küçüktür fakat unutulmamalıdır ki arter çeperlerindeki medial tabaka in vitro çalışmalarda yoktur ve arterlerdeki sıvı geçişine olan direncin % 50'sine bu tabakanın katkıda bulunduğu inanılmaktadır (67).

Daha önce hipotezi kurulmasına karşın (68), sıvı akımının kılcal damar permeabilitesine etkisi yakın bir zamanda çalışılmıştır. Shibata & Kamiya (69), dolaylı doku temizleme metodunu kullanarak tavşandaki tenuissimus kasında çeşitli kılcal damar kan akış seviyelerinde Cr-EDTA'nın bölgesel kılcal damar permeabilitesini ölçmüşlerdir. Çok belirgin bir şekilde, kılcal damar geçirgenliği ve kılcaldamar içinden geçen eritrositlerin esas hızları arasında pozitif ilişki gözlemlenmiştir. Yuan ve arkadaşları (70), çeşitli intraluminal perfüzyon hızlarında, izole edilip kanüle edilmiş koroner venüllerde albumin permeabilitesini ölçmüşler ve hız 7 mm/s'den 13 mm/s'ye çıktığı anda permeabilite % 47 artmıştır.

Kajimura ve Michel (71), nitrik oksit tarafından düzenlenmiş olan perfüze edilmiş fare venüllerinde akım hızı ve potasyum iyon geçirgenliği arasında pozitif ilişki gözlemiştir. Williams (72), modifiye edilmiş Landis tekniğini kurbağa mezenterindeki arterioller, kılcaldamarlar ve venüller üzerinde kullanarak kayma gerilmelerindeki seviye değişimleri sonrasında meydana gelen permeabiliteyi ölçmüştür. Damarlardaki fizyolojik cevaplar farklı şekillerde olmuştur. Arterioller kılcaldamarlarda cevap oluşmazken, gerçek kılcal damarlarda orta seviyelerde bir cevap oluşmuş ve venüller kılcal damarlarda güçlü bir cevap (5 kat artış) meydana gelmiştir.

2.2.6. Kayma Gerilmelerinin Sıkı Bağlantılar Üzerine Etkileri

DeMaio ve arkadaşları (73), BAEC hücre tabakalarında 3 saatin üzerinde bir süre, düzenli kayma gerilmelerinin occludin ve ZO-1 içeriğine olan etkisini belirlemişlerdir. Bu iki proteinin, sıkı bağlantı proteinlerinden beklendiği gibi özellikle hücre sınırlarında yer aldığı immünofloresan boyama ile gösterilmiştir. 10 veya 20 dyn/cm² kayma gerilmelerine 3 saat süre ile maruz bırakmanın ZO-1 içeriğine etkisi olmazken, occludin içeriğini % 44 ile % 50 oranında azaltmıştır. Paralel geçiş deneyleri 20 dyn/cm² kayma gerilmesinin 3 saat sonunda sıvı geçirgenliğini 4.7 kat arttırdığını göstermiştir. Occludin ekspresyonu ve sıvı geçirgenliği, erbstatin A'nın hem kayma gerilmelerinden kaynaklanan occludin içeriğindeki düşüşü hem de sıvı geçirgenliğindeki artışı azaltmasından dolayı, tirozin kinaz aktivitesine bağlıdır. Kayma gerilmeleri 5 dakikadan sonra occludin fosforilasyonunu artırır ve fosforilasyon 3 saat boyunca oluşur. Kayma gerilmelerinden kaynaklanan occludin fosforilasyonunun artması, kayma gerilmelerinin neden olduğu sıvı geçirgenliğindeki artışı tersine çevirdiği gösterilen bir faktör olan dibütiril (DB) cAMP tarafından azaltılır (74). Occludin içeriği ve fosforilasyondaki değişikliklerin, kayma gerilmelerinin değiştirdiği sıvı geçirgenliğine bağlı mekanizmalar olduğu ortaya çıkmıştır. Fosforilasyonun en önce oluşması ve occludin içeriğindeki değişimden çok, sıvı geçirgenliğindeki değişimlerle ilişkili olması, geçirgenlik cevabında fosforilasyon olayının merkezi bir yeri olduğunu belirtir.

Benzer bir çalışmada, VEGF'in BREC (Bovin Retinal Mikrovasküler Endotel Hücre) tabakalarında 15 dakika içinde occludin fosforilasyonunu (75) ve 30 dakika içinde sıvı geçirgenliğini arttırdığı gösterilmiştir (76).

Bununla ilişkili bir başka madde geçişi ile ilgili çalışmada, DeMaio ve arkadaşları (77) BREC yapısında VEGF'in önce veya sonra kendiliğinden idare etmesi ile 70 kDa dextranla sıvı geçirgenliğini ve permeabiliteyi ölçmüşlerdir. VEGF, su ve çözülmüş madde geçişinde 120 dakika sonra 3.5 kat artış sağlamıştır fakat sıvı geçirgenliği arttığı sırada yansıma katsayısı (σ) sabit kalmıştır. Bu çalışmalar biraraya getirildiğinde, VEGF'in BREC yapısında geçişe etkisi, sıkı bağlantı bölgelerinin düzensizliğine ya kopma noktalarındaki sayının artışı ya da kopma bölgelerinin uzunluğunun artması şeklinde etki ederek olur çünkü occludinin fosforilasyonu meydana gelir. Bu gerçekleştiği zaman kopma noktalarından su geçişinde ve buna bağlı olarak çözülmüş madde geçişinde artış olur fakat glikokaliks denilen ve çözülmüş madde geçişinde filtre görevi yapan ve yansıma katsayısını belirleyen yapı etkisiz kalır. Kayma gerilmelerinin ve VEGF'in sıkı bağlantı bölgelerindeki proteinleri ve geçişi değiştirmeleri göz önüne alındığında,

kayma gerilmelerinin de sıkı bağlantı bölgelerini aynı şekilde değiştirdiği akla makul gelmektedir.

2.2.7. Kayma Gerilmelerinin Adherens Bağlantılar Üzerine Etkileri

Schnittler (78) ve arkadaşları, HUVEC (İnsan göbek kordunu endotel hücre) tabakasına 20 dyn/cm² büyüklüğünde kayma gerilmeleri uygulayarak VE-cadherin, plakoglobin ve Ca²⁺ iyonundan bağımsız olan bir transmembran adhezyon molekülü olan PECAM 1 (Kan pulcuğu endotel hücre adhezyon molekülü 1)' in bağlantı bölgelerindeki yoğunluklarını incelemiştir. Ekstraselüler Ca²⁺ iyonunun tükenmesi, bağlantı bölgelerinde hem VE-cadherin hem de plakoglobinin kaybolmasına yol açarken PECAM 1'in dağılımını etkilemez. Hücreler düşük konsantrasyonlu Ca²⁺ ortamlarında tutulup, 15 dakikalık 20 dyn/cm² düzenli kayma gerilmeleri uygulandığında hücrelerden kopmalar olduğu gözlenmiştir. Kayma gerilmelerine karşı dayanıklılığı arttırmak amacıyla plakoglobin eksikliği olmayan, plakoglobin içeriği normal olan hücrelere Ca²⁺ verilmiştir. Bu çalışma, kayma gerilmeleri altında hücreler arası adhezyon için, bağlantı bölgelerindeki cadherin moleküllerinin plakoglobin ile ilişkisine ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir.

Endotel hücre tabakasının, statik kültür ortamlarında küboidal, parketaşı morfolojisi gösterdiği bununla birlikte hafif veya yüksek şekilde düzenli kayma gerilmelerine 24–48 saatlik sürelerde maruz bırakıldıklarında, uzama ve akışın olduğu yöne doğru yönelme yaptıkları iyi bilinmektedir (79,80). Bu morfolojik yeniden yapılanma sürecinde hücreler arası bağlantıların da yeniden şekillenmesi beklenmektedir. Bunu araştırmak için Noria ve arkadaşları (81), domuz aorta endotel hücrelerini 15 dyn/cm² kayma gerilmelerine 0, 8.5, 24 ve 48 saatlik sürelerde maruz bırakmış ve VE-cadherin, α ve β catenin ve plakoglobin için immünboyama ve Western blot tekniklerini uygulamışlardır. Statik koşullar altında, bütün proteinlerin boyanması hücre-hücre bağlantılarında hemen hemen sürekli bir bant şekli oluşturan, yoğun ve periferel bir şekil almıştır. 8.5 saatlik kayma gerilmelerinden sonra, bütün proteinlerin kısmi olarak boyanması, adherens bağlantı bölgelerindeki kısmi düzensizliğe işaret etmektedir. 48 saat ile hücre şeklinin değişimi tamamlandığında, bütün proteinler için yoğun bir şekilde boyanmanın devam etmesi, adherens bağlantı bölgelerinin yeniden düzenlendiğini belirtmektedir. Western blot analizleri, 8.5 saatlik kayma gerilmelerinden sonra VE-cadherin, α -catenin ve plakoglobin protein seviyelerinin azaldığını gösterirken, β catenin seviyesinin arttığını göstermiştir. 48 saat içinde, plakoglobin dışında bütün protein seviyeleri artmıştır. Çünkü adherens bağlantı bölgelerindeki hücreler arası adhezyonun, sıkı bağlantı bölgelerini de içeren diğer bağlantı yapılarının düzenlenişinde bir öngereklilik olduğu düşünülmektedir (82), bunun sebebi adherens bağlantılar bozulduğunda, sıkı

bağlantıların parçalanması veya dağılması ve daha sonra adherens bağlantılar yeniden düzenlendiğinde sıkı bağlantı bölgelerinin yeniden şekil almasıdır.

McIntire ve arkadaşlarının (62), in vitro madde geçişi çalışmalarında endotel tabakada en yüksek madde geçişinin 10–30 saat süre ile düzenli kayma gerilmelerine maruz bırakılması ve başlangıç değerlerine dönüşün 48 saatlik bir sürede olması, hücreler arası bağlantıların bozulması ve yeniden düzenlenmesi ile tutarlıdır. Bu ayrıca Friedman & Fry'ın önerdiği, kan dinamiğindeki değişimlere (kayma gerilmeleri), endotel tabakasının uyumsal cevabı uyum dönemi boyunca atherogenik alınımında geçişsel bir artışa sebep olmaktadır şeklindeki hipotez ile tutarlıdır. Fakat kayma gerilmelerindeki değişimden sonra sıkı bağlantı bölgelerinin çok hızlı bir şekilde düzenlendiği hatırlanmalıdır.

2.2.8. Kayma Gerilmelerinin Sızıntılı Bağlantılar Üzerine Etkileri

Sızıntılı bağlantılar; hücre çoğalması veya mitoz ve hücre ölümü (apoptoz) ile ilişkilendirilmiştir. Bu süreçlerin her ikisi de sıvı kayma gerilmelerinden etkilenir. Birçok çalışmada artan seviyelerdeki düzenli kayma gerilmelerinin, endotel hücre çoğalmasını azalttığı gösterilmiştir (83,84). Ayrılmış veya yeniden dolaşım oluşan bölgelerdeki artan hücre mitozu erken atherogenez oluşumuna işaret eder. Sıvıların mekaniksel mekanizmasının bu artışı sağlaması, ayrılma bölgelerindeki artan uzamsal seviyeye (85) ve aynı bölgedeki kayma gerilmelerinin artan temporal seviyesine katkıda bulunur (86).

Birçok çalışma kan akımındaki veya kayma gerilmelerindeki oranların azalmasının, endotel hücrelerdeki apoptoz oranını arttırdığını bununla birlikte kayma gerilmelerindeki artışın ters etkiyi arttırdığı gösterilmiştir (87,88). HUVEC ile çalışmalarda kayma gerilmelerinin apoptozu inhibe edici etkisinin, NO sentezinin arttırılması ile düzenlendiğini ve bu mekanizmanın yaşlanmış hücrelerde bozulmasından dolayı kayma gerilmelerinin antiapoptotik etkilerinin görülemediği açıklanmıştır (89).

Karotid arterlerde, insan atherosklerotik plakları analiz edildiğinde; sıvı akışına karşı akışların olduğu bölgelerde, sıvı akışı ile aynı yönde akışların olduğu bölgelere göre düşük akım ve düşük temel kayma gerilmelerinin daha çok olduğu ve bu bölgelerdeki plaklarda apoptozun nisbeten daha çok olduğu gözlenmiştir (90).

Bu çalışmalar bir araya getirildiğinde kayma gerilmelerindeki temporal salınımların ve uzamsal seviyelerinin birlikte yer aldığı düşük temel kayma gerilmeleri bölgelerinde (dallanma ve yeniden bağlanma noktalarının yakınında) endotel hücre çoğalması oranları, apoptoz oranları ve bununla ilişkili olarak sızıntılı bağlantı bölge yaygınlığının daha fazla olduğunu göstermiştir (91).

Sıvıların bu mekaniksel özellikleri atherosklerozun yerleşimi ile ilişkilendirilir. Ayrıca hipoksiya'nın endotel hücre apoptozuna yol açtığı belirtilmelidir (92,93) ve bu mekaniksel özellikleri hipoksiyaya neden olan sıvıların sızıntılı bağlantılara yol açtığı belirtilmektedir. Hipoksiya çoğunlukla atherosklerotik plak oluşumu ile ilişkilendirilen ayrılmış ve ikincil akımların olduğu bölgelerde oluşmaktadır.

2.2.9. Kayma Gerilmelerinin Veziküller Üzerine Etkileri

Davies ve arkadaşları (94), bovin aorta endotel hücrelerinde (BAEC), kayma gerilmelerinin pinositoz üzerine etkisini hücre içine HRP (yaban turpu peroksidazı) alınımını inceleyerek belirlemişlerdir. Düzgün bir akımda, düzenli kayma gerilmelerine (1–15 dyn/cm²) sürekli maruz kalınması sırasında zaman ve kayma gerilmeleri düzeyine bağlı pinositotik orandaki artışın bir kaç saatlik uygulamanın sonunda kontrol seviyelerine geri döndüğünü buldular.

Düzenli kayma gerilmelerinin ortadan kaldırılması pinositotik oranda düzenli bir artışla sonuçlanmıştır. 1 Hz'deki salınımlı düz kayma gerilmeleri pinositotik oranları etkilememiştir fakat uzun sürelerde (15 dakika) pinositotik oran yükselmiştir. Artmış düzenli kayma gerilmelerinin, hücre yüzey lipoprotein reseptörlerinin ekspresyonu vasıtasıyla LDL endositozunu arttırdığı gösterilmiştir (95). Kudo ve arkadaşları (96), domuz aorta endotel hücrelerinin 48 saat düzenli kayma gerilmelerine maruz kalmasıyla, albuminin hücre içine alınmasının arttığını belirtmişlerdir. Özellikle 10 dyn/cm²'lik kayma gerilmelerinde en yüksek seviyeye ulaştığını, daha sonra ise kayma gerilmesinin 80 dyn/cm²'ye kadar ve daha da artmasıyla birlikte hücre içi alınımının azaldığını göstermişlerdir. Bu çalışmalardan hiçbiri, vezikül oranlarının ölçümünün, endotel tabakadan tüm geçişlerin ölçümü olduğunu göstermez ve bundan dolayı pinositotik orandaki artışın, endotel tabakalar arası geçişteki bir artış ile eşitlenebileceğinden emin olamayız. Gelecek çalışmalarla bu konunun açığa kavuşması gerekir. Davies ve arkadaşları yaptığı çalışma ile (94), kayma gerilmelerindeki değişimin veziküler geçişi kademeli olarak yükseltebileceğini ve bunun Fry & Friedman (97), tarafından ileri sürülen kademeli adaptasyon hipotezi ile tutarlı olduğunu ileri sürmüşlerdir.

BÖLÜM III

3. GEREÇ VE YÖNTEM:

3.1. Malzemeler

DMEM (Fenol Red içermeyen), L-glutamin, Fetal Bovin Serum (FBS), Penicillin/Streptomycin, Trypsin/EDTA, 10x DMEM, NaHCO₃, PBS, DMSO, Trypan blue ve FITC-dextran SIGMA şirketinden temin edildi. NaCl, KCl, CaCl₂, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, MgSO₄ ve NaOH kimyasal maddeleri MERCK firmasından temin edildi. Kollajen (Cellagen AC-5, %0,5) Cellagen şirketinden, FBS Biochrom AG şirketinden ve HEPES kimyasal maddesi Calbiochem şirketinden temin edildi. Bu çalışmada, bovin aortik endotel hücreleri (BAEC) kullanıldı.

3.2. Hücre Kültürü

Hücre kültüründe, bovin aortik endotel hücreleri(BAEC) kullanıldı. Endotel hücreler, sıvı nitrojen tankından çıkarıldıktan sonra buzlarının çözülmesi için su banyosunda bekletildi (en fazla 5 dakika). Daha sonra 5 ml FCS, 0.5 ml Penicillin/Streptomycin, 0.5 ml L-glutamin ve 44 ml renksiz DMEM kullanılarak hazırlanan komple ortamdan 5 ml alınarak endotel hücrelerin olduğu tüpe eklendi. Daha sonra, komple ortam ve endotel hücrelerinden oluşan bu karışım, daha önce hücreleri dondurmak için kullanılan DMSO`yu uzaklaştırmak için 120 g`de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst faz uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine hızlıca 5 ml komple ortam eklenip, pipetleme işlemi yapıldı. Bunun ardından ortam ve hücreler 2.5`er ml olacak şekilde flaslara dağıtıldı. Sonra, tekrardan 5 ml komple ortam alındı ve bu da, 2.5`er ml olacak şekilde flaslara dağıtıldı. Flasklar, hücrelerin çoğalması için 37°C`de %5`lik CO₂ inkübatörüne yerleştirildi.

Hücreler yeterli sayıya ulaştıktan sonra, hücrelerin eski ortamları uzaklaştırıldı ve her bir flaska 5`er ml PBS eklenip hemen uzaklaştırıldı. Böylece ölü hücreler de flasktan uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra, Tripsin/EDTA her bir flaska 3`er ml olacak şekilde eklendi. Hücreler kalktıktan sonra 3`er ml komple ortam her bir flaska eklendi ve bunlar başka bir tüpe alındı. Daha sonra 2`şer ml komple ortam her bir flaska eklendi ve bunlar da diğer tüpe alındı. Santrifüj 120 g`de 5 dakika yapıldı ve daha sonra üst faz atıldı. Pipetaj için tüpteki hücrelerin üzerlerine hızlıca 2 ml komple ortam eklendi ve pipetaj işlemi ile homojenizasyon yapıldı. Tüpteki toplam 2 ml`lik karışımın 1 ml`si her bir flaska 0.5`er ml olacak şekilde dağıtıldı ve geriye kalan 1 ml`lik karışım kollajen jellerin üzerlerine hücre ekiminde kullanıldı. Daha sonra komple ortamdan 9 ml alıp, her bir flaska 4.5`er ml olacak şekilde dağıtıldı. Endotel hücrelerinin sayımının yapılması için hücrelerin pasajlanmasındaki yöntemde, pipetaj işlemi sonrasında basamağa kadar gelindi. 100 µl homojenize edilen karışımdan alındı ve ependorf tüpüne eklendi. Daha sonra 200 µl

Trypan blue ve 200 µl PBS ependorf tüpüne eklendi. Tüpteki karışım homojenize edildikten sonra, Toma lamındaki her iki bölmeye 10`ar µl karışım eklendi. 5x5 lik karelerden, ortadakinden 4x4 lük küçük karelerden 5 tanesindeki hücreler sayıldı. Toplam hücre sayısı aşağıdaki formül kullanılarak bulundu:

Sayılan karelerdeki hücre sayısı x Sulandırma miktarı x 2500(Sabit sayı)=1mililitredeki hücre sayısı.

Her 1 ml`deki hücre sayısı belirlendi ve her bir kollajen jelin üzerine 100 µl karışımdan eklendi. Böylece her bir kollajen jelin üzerine belirli bir sayıda hücre ekildi.

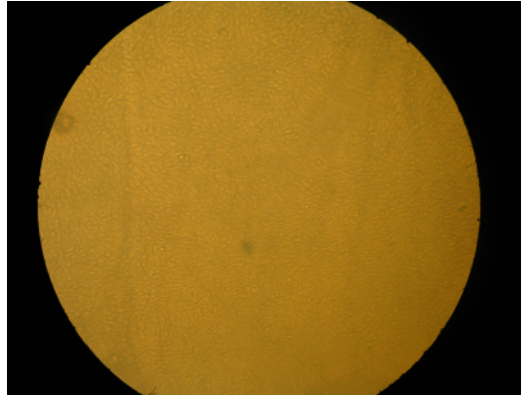
3.2.1. Kollajen Jel Hazırlanması

Kollajen jel hazırlanması için önce 10x HEPES tampon çözeltisi eklendi. Bu çözeltiyi hazırlamak için 8 g NaCl, 0.298 g KCl, 0.1998 g CaCl₂, 0.286 g Na₂HPO₄, 0.0276 g NaH₂PO₄, 0.172 g MgSO₄, 2 g HEPES ve 0.16 g NaOH 100 ml distile suda çözüldü (98). Daha sonra hazırlanan bu tampon çözeltisinden 350 µl tüpe eklendi. Bunun ardından % 7.5`lik NaHCO₃ tampon çözeltisinden 350 µl eklendi. Daha sonra 350 µl 10x DMEM çözeltisinden ve 2450 µl kollajenden tüpe eklendi ve homojenizasyon yapıldı. Kollajen kullanırken buza gömülü olmasına dikkat edildi çünkü kollajen oda sıcaklığında çok çabuk polimerize olabilmektedir.



Şekil 3. Hazırlanan kollajen jel çözeltisinin üzerinden akım geçirilecek lamaların bölmelerine eklenmesi (A). Kollajen jel hazırlamak için gerekli maddeler olan % 7.5 lik NaHCO₃ tampon çözeltisi, 10x HEPES tampon çözeltisi, 10x DMEM çözeltisi ve kollajen çözeltisi (B).

Bu işlemlerden sonra, çözelti, 4 bölmeli kaptaki her bir bölmeli lama 650`ser µl olacak şekilde eklendi. Bunun ardından, 4 bölmeli kap ve içindeki bölmeli lamalar 37°C`de 15 dakika bekletildi. Böylece, kollajen jelin polimerleşmesi sağlanmış oldu. Kollajen jel hazırlandıktan sonra, daha önce sayımı yapılmış olan endotel hücreler her bir kollajen jel üzerine 100 µl eklendi. Bu şekilde, kollajen jeller inkübatörde 15 dakika bekletilerek, hücrelerin jelle tutunması sağlandı. Daha sonra, 12 ml komple ortam her bir bölmeye gelecek şekilde eklendi. Bu işlemten sonra, hücreler 2 gün inkübatörde bekletilerek çoğalmaları sağlandı.



Şekil 4. Kollajen jel üzerinde çoğalan endotel hücrelerinin inverted mikroskoptaki görüntüsü (40x, Department of Cellular Engineering, University of Applied Sciences Aachen, Almanya).

3.2.2. Agaroz Jel Hazırlanması

Agaroz jel hazırlanması için çeşitli konsantrasyonlarda agaroz çözeltileri hazırlandı. Bunun için, 100'er ml PBS içinde 2 g, 1.75 g ve 1.85 g agaroz çözülerek çözeltiler hazırlandı. Daha sonra, polimerleşmeleri için bu çözeltiler 20 dakika 4°C`de bekletildi. Bu işlemlerden sonra, polimerleşmiş her bir çözeltiye 4'er ml FITC-dextran eklendi. Daha sonra, 30 dakika, 1 saat, 2 saat ve 4 saat sonra jeldeki fluoressan tabaka transilluminatör ile incelendi.

Agaroz jel üzerinde endotel hücrelerinin çoğalmalarının gözlenmesi için % 1.75'lik agaroz çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiden 4 bölmeli kabın her bir bölmesine 10'ar ml olacak şekilde eklendi. Daha sonra polimerleşme olması için 4°C`de 20 dakika bekletildi. Polimerleşme olduktan sonra Tripsin/EDTA ile kaldırılıp, santrifüj edilen ve daha sonra pipetleme yapılan hücreler 5 ml komple ortam ile birlikte agaroz jelin üzerine aktarıldı. Bu işlemlerden sonra 37°C`de inkübatörde bekletildi. Daha sonra hücrelerin agaroz jele yapışıp yapışmadığı gözlemlendi.

3.2.3. Jelâtin Jel Hazırlanması

Jelatin jel hazırlanması için 10 ml PBS içinde 0.3 g jelatin çözüldü. Jelâtin çözeltisinin belli bir kıvama gelmesi için beklendi (Mikropipetle alınabilecek fakat kullanılacak lam üzerinden akmayacak kıvama geldi). Daha sonra jelâtin çözeltisi mikropipetle 4 bölmeli kabın içindeki lamaların üzerine yayıldı. Bu işlemlerden sonra 4 bölmeli kabın kapağı kapatıldıktan sonra 4°C`de bekletildi. Bir gün bekletilen kapların üzerlerine Tripsin/EDTA ile kaldırılıp, santrifüj edilen ve daha sonra pipetleme yapılan hücreler 5 ml komple ortam ile birlikte jelatin jelin üzerine aktarıldı. Daha sonra hücrelerin jelâtin jele yapışıp yapışmadığı gözlemlendi.

3.3. Kayma Gerilmelerinin Uygulanması

Renksiz DMEM ve FITC-dextran ile bir karışım hazırlandı. 8 mg/ml FITC-dextran konsantrasyonuna ulaşmak için 50 ml renksiz DMEM içinde 400 mg FITC-dextran çözüldü (99). 4 bölmeli kaba yerleştirilmiş akım lamı içindeki kollajen jel üzerinde yeterli sayıya ulaşmış olan endotel hücrelerinin, kollajen jel dışında kalanları plastik spatula ile uzaklaştırıldı. Bundan sonra PBS ile hücreler bir kez yıkandı. Akım lamı, akım odasına (flow chamber) yerleştirildi. Rezervuara 50 ml'lik çözelti eklendi. Atımlı akım oluşturan pompa 0.46 ml/sn debide akım oluşturacak hıza ayarlandı. 0.46 ml/sn hacimsel debi uygulanması için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\tau = 6Q\mu/bh^2$$

Bu formülde τ kayma gerilmesini (dyn/cm^2), μ hazırlanan ortamın viskozitesini (dyn.sn/cm^2), b akım odasının genişliğini, h akım odasının yüksekliğini, Q akım hızını (ml/sn) ifade eder (100). Akım odasının yüksekliği (h) 0.03 cm, akım odasının genişliği (b) 2.6 cm olduğu bilinmektedir.

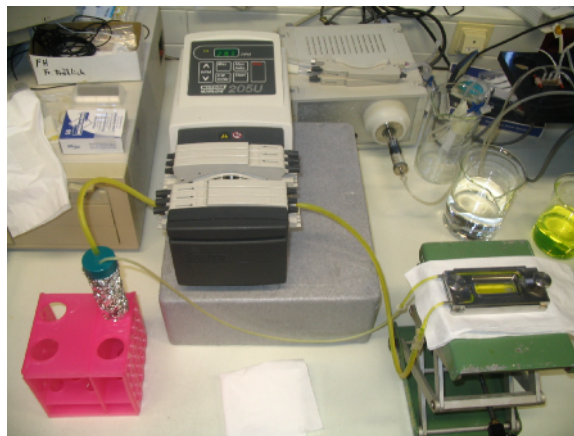
$\mu_{\text{DMEM}} = 0.0084$ Poise `dir (101).

1 Poise 1 dyn.sn/cm^2 dir.

5 dyn/cm^2 kayma gerilmesi uygulanması için;

5 $\text{dyn/cm}^2 = 6 \times 0.0084 \text{ dyn.sn/cm}^2 \times Q / (0.0009 \text{ cm}^2 \times 2.6 \text{ cm}) \Rightarrow Q = 0.46 \text{ cm}^3/\text{sn} = 0.46 \text{ ml/sn}$ olur.

Sonuçta atımlı pompa ile 0.46 ml/sn`lik bir hızda sıvı akımı üretilerek hücrelere 5 dyn/cm^2 büyüklüğünde kayma gerilmesi 1 saat süreyle uygulandı. Rezervuardan atımlı pompaya sıvının gidişi ve oradan sıvının akım odasına (flow chamber) geçişi ve ardından tekrar rezervuara dönüşü kılcal plastik borular aracılığı ile oldu. Kontrol grubunda ise hücrelere herhangi bir sıvı akımı uygulanmadan 2 ml FITC-dextran çözeltisi (8mg/ml) eklendi ve 1 saat süreyle beklendi.



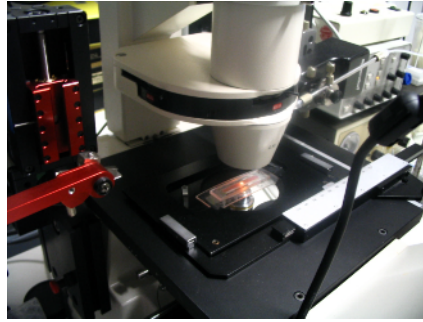
Şekil 5. Kayma gerilmesinin uygulanması için akım odası, atımlı pompa ve kılcal plastik borulardan oluşan düzenek.



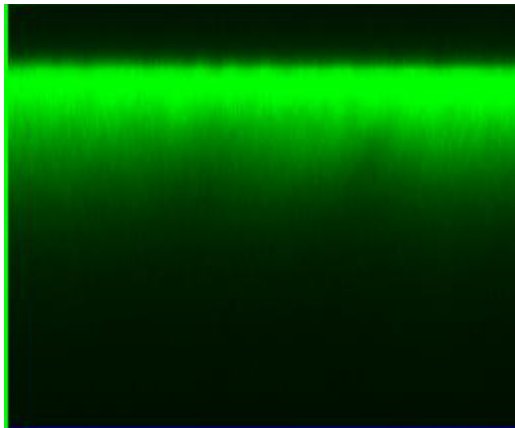
Şekil 6. Akım lamının, akım odasına yerleştirilmesi ve akım odasının kapatılması.

3.4. Permeabilitenin Ölçülmesi

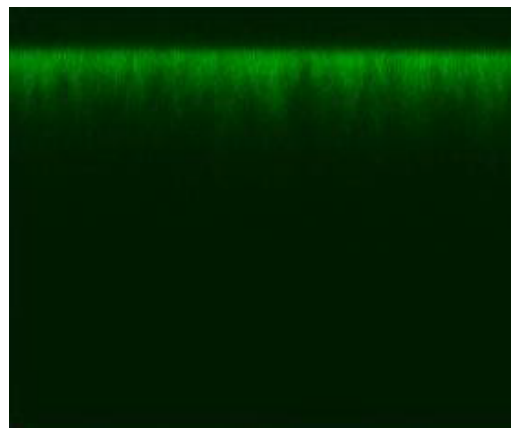
Deney grubundaki ve kontrol grubundaki kollajen jellerdeki FITC-dextranın kalınlığı floresan mikroskopla (Axiovert 100, Department of Cellular Engineering, University of Applied Sciences Aachen, Almanya).



Şekil 7. Floresan mikroskop ile permeabilitenin ölçülmesi.

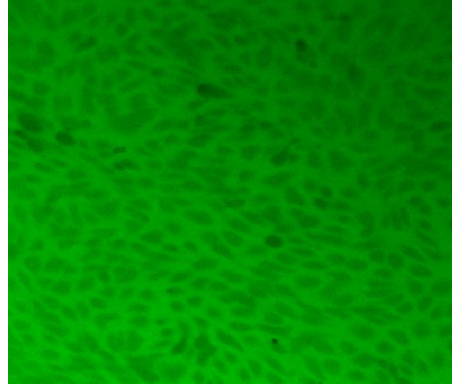


A

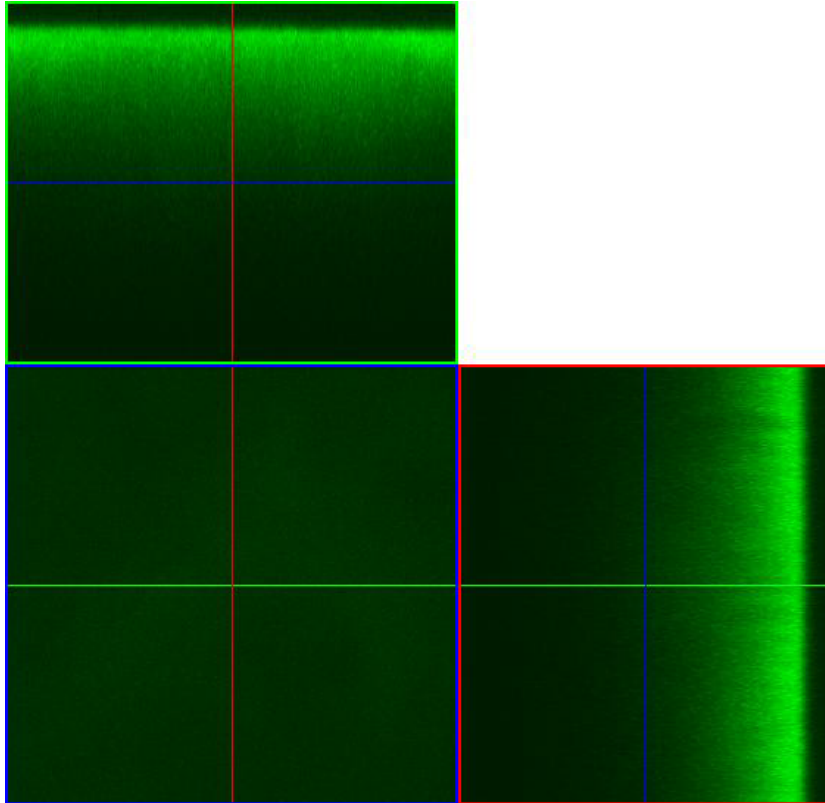


B

Şekil 8. Kollajen jellerdeki FITC-dextranın permeabilitesinin deney grubundaki (A) ve kontrol grubundaki (B) görüntülerinin LSM Image Browser programındaki görüntüleri.



Şekil 9. Kayma gerilmesi uygulanmış endotel hücre tabakasının fluoresan mikroskoptaki görüntüsü.



Şekil 10. LSM Image Browser programında, kollajen jellerdeki FITC-dextran derinliği ölçülürken kullanılan ölçütler. Mavi çizgi Z eksenini, kırmızı çizgi Y eksenini, yeşil çizgi X eksenini göstermektedir.

BÖLÜM IV

4. BULGULAR:

Kontrol grubundan 8 ve deney grubundan 8 olmak üzere toplam 16 örnek ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular tablolar halinde sunulmuştur.

Tablo 1. Örneklerdeki kollajen jellerdeki FITC-dextranın ulaştığı derinlikler (n = 16)

	Kontrol 1	Kontrol 2	Kontrol 3	Kontrol 4
Genişlik:919.448 µm				
Y=171				
	Derinlik (µm)	Derinlik (µm)	Derinlik (µm)	Derinlik (µm)
X=51	316.80	288.00	316.80	387.10
X=102	295.20	288.00	309.60	382.20
X=153	302.40	273.60	302.40	406.70
X=204	288.00	288.00	309.60	406.70
X= 255	273.60	302.40	309.60	411.60
X= 306	288.00	280.80	316.80	401.80
X=357	295.20	295.20	302.40	396.90
X=408	288.00	295.20	302.40	406.70
X=459	295.20	288.00	316.80	401.80
X= 510	280.80	273.60	302.40	382.20
Y=340				
X=51	288.00	302.40	316.80	396.90
X=102	280.80	280.80	302.40	401.80
X=153	288.00	288.00	302.40	396.90
X=204	295.20	273.60	288.00	401.80
X= 255	280.80	295.20	295.20	411.60
X= 306	288.00	295.20	316.80	382.20
X=357	302.40	280.80	309.60	401.80
X=408	288.00	295.20	295.20	396.90
X=459	288.00	295.20	302.40	406.70
X= 510	280.80	280.80	309.60	401.80
Y=510				
X=51	280.80	295.20	309.60	396.90
X=102	280.80	302.40	302.40	421.40
X=153	288.00	295.20	295.20	401.80
X=204	302.40	273.60	295.20	411.60
X= 255	295.20	295.20	302.40	411.60
X= 306	288.00	302.40	302.40	406.70
X=357	273.60	288.00	302.40	421.40
X=408	288.00	302.40	288.00	416.50
X=459	295.20	302.40	302.40	416.50
X= 510	273.60	280.80	295.20	406.70

	Kontrol 5	Kontrol 6	Kontrol 7	Kontrol 8
Genişlik:919.448 µm				
Y=171				
	Derinlik (µm)	Derinlik (µm)	Derinlik (µm)	Derinlik (µm)
X=51	316.80	331.20	395.30	324.00
X=102	309.60	352.80	408.70	331.20
X=153	302.40	360.00	388.60	324.00
X=204	295.20	345.60	375.20	316.80
X= 255	302.40	338.40	402.00	302.40
X= 306	280.80	396.00	408.70	309.60
X=357	309.60	367.20	402.00	324.00
X=408	302.40	396.00	395.30	331.20
X=459	302.40	388.80	388.60	295.20
X= 510	309.60	367.20	408.70	316.80
Y=340				
X=51	316.80	381.60	388.60	331.20
X=102	295.20	396.00	395.30	316.80
X=153	302.40	367.20	395.30	316.80
X=204	288.00	396.00	375.20	302.40
X= 255	309.60	388.80	408.70	295.20
X= 306	295.20	374.40	402.00	288.00
X=357	309.60	381.60	408.70	295.20
X=408	295.20	367.20	415.40	288.00
X=459	316.80	396.00	375.20	295.20
X= 510	302.40	388.80	381.90	288.00
Y=510				
X=51	309.60	396.00	415.40	331.20
X=102	295.20	381.60	408.70	309.60
X=153	288.00	374.40	415.40	309.60
X=204	280.80	403.20	402.00	324.00
X= 255	302.40	388.80	408.70	309.60
X= 306	302.40	403.20	388.60	302.40
X=357	309.60	396.00	395.30	316.80
X=408	295.20	410.40	388.60	302.40
X=459	309.60	388.80	402.00	302.40
X= 510	302.40	388.80	395.30	295.20

	Deney 1	Deney 2	Deney 3	Deney 4
Genişlik:919.448 µm				
Y=171				
	Derinlik (µm)	Derinlik (µm)	Derinlik (µm)	Derinlik (µm)
X=51	351.00	337.90	327.60	414.20
X=102	374.40	348.80	327.60	425.10
X=153	339.30	348.80	339.30	436.00
X=204	339.30	337.90	315.90	414.20
X= 255	351.00	327.00	315.90	425.10
X= 306	327.60	348.80	327.60	436.00
X=357	315.90	337.90	339.30	436.00
X=408	315.90	359.70	304.20	425.10
X=459	327.60	348.80	327.60	414.20
X= 510	315.90	348.80	304.20	414.20
Y=340				
X=51	339.30	337.90	315.90	425.10
X=102	351.00	359.70	304.20	436.00
X=153	327.60	348.80	315.90	425.10
X=204	315.90	359.70	315.90	446.90
X= 255	315.90	359.70	304.20	414.20
X= 306	339.30	348.80	304.20	436.00
X=357	327.60	359.70	339.30	414.20
X=408	315.90	337.90	315.90	414.20
X=459	339.30	327.00	304.20	425.10
X= 510	327.60	348.80	315.90	414.20
Y=510				
X=51	339.30	370.60	315.90	457.80
X=102	315.90	337.90	304.20	425.10
X=153	304.20	348.80	327.60	425.10
X=204	339.30	370.60	315.90	446.90
X= 255	315.90	337.90	304.20	425.10
X= 306	315.90	327.00	315.90	425.10
X=357	315.90	359.70	327.60	414.20
X=408	304.20	337.90	315.90	414.20
X=459	339.30	348.80	327.60	425.10
X= 510	327.60	327.00	304.20	436.00

	Deney 5	Deney 6	Deney 7	Deney 8
Genişlik:919.448 µm				
Y=171				
	Derinlik (µm)	Derinlik (µm)	Derinlik (µm)	Derinlik (µm)
X=51	362.70	436.00	339.30	457.80
X=102	351.00	414.20	327.60	425.10
X=153	339.30	414.20	315.90	414.20
X=204	351.00	425.10	327.60	436.00
X= 255	327.60	468.70	315.90	446.90
X= 306	351.00	457.80	327.60	436.00
X=357	339.30	425.10	351.00	457.80
X=408	339.30	468.70	351.00	414.20
X=459	315.90	457.80	339.30	414.20
X= 510	327.60	436.00	315.90	414.20
Y=340				
X=51	351.00	436.00	315.90	414.20
X=102	339.30	436.00	327.60	436.00
X=153	362.70	446.90	304.20	414.20
X=204	351.00	425.10	315.90	414.20
X= 255	374.40	446.90	327.60	446.90
X= 306	339.30	457.80	339.30	436.00
X=357	351.00	436.00	315.90	425.10
X=408	327.60	446.90	339.30	446.90
X=459	351.00	436.00	327.60	436.00
X= 510	327.60	425.10	315.90	436.00
Y=510				
X=51	351.00	425.10	351.00	457.80
X=102	362.70	446.90	339.30	436.00
X=153	351.00	425.10	315.90	468.70
X=204	339.30	436.00	315.90	457.80
X= 255	339.30	446.90	327.60	436.00
X= 306	327.60	436.00	315.90	414.20
X=357	351.00	457.80	304.20	425.10
X=408	362.70	446.90	315.90	414.20
X=459	362.70	479.60	304.20	414.20
X= 510	374.40	425.10	304.20	436.00

Tablo 2. Kollajen jellerdeki FITC-dextranın ulaştığı derinliklerin ortalamaları

ÇALIŞMA	FITC-dextran maddesinin ulaştığı ortalama derinlik (µm)
Kontrol 1	288.96
Kontrol 2	289.92
Kontrol 3	304.07
Kontrol 4	403.11
Kontrol 5	312.00
Kontrol 6	380.40
Kontrol 7	397.98
Kontrol 8	309.84
Deney 1	329.16
Deney 2	346.62
Deney 3	317.46
Deney 4	426.19
Deney 5	346.71
Deney 6	440.72
Deney 7	324.48
Deney 8	432.73

Bağımsız iki grubun verilerinden yani kontrol grubundan 8 ve deney grubundan 8 olmak üzere en az birinin ölçüm sayısı 30'dan küçük olacağı için parametrik çözümleme koşullarını karşılaması olası değildir. Bu durumda t testinin yanlış sonuç verme olasılığı yüksek olduğu için, t testi yerine kullanılabilen çözümleme yöntemlerinden, bağımsız gruplarda uygulanan Mann-Whitney U Testi kullanıldı.

Bovin aort endotel tabakasına 1 saat boyunca 5 dyn/cm² kayma gerilmesi uygulanması ve uygulanmamasının birbirlerinden anlamlı ölçüde farklı olup olmadığının incelenmesini amaçlayan bu araştırmada iki grup oluşturulmuştur. Daha sonraki işlemde ise bir flüoresan boya

olan FITC-dextran maddesinin kollajen jel içinde ne kadar derine kadar indiği LSM Image Browser adlı program ile ölçülmüştür.

Kayma gerilmesi uygulanan grupta FITC-dextran maddesinin kollajen jel içinde daha derinlere ulaşması beklendiğinden, çözümlene tek yönlü olarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubu; A grubu ve deney grubu; B grubu olarak adlandırılmıştır.

Kontrol grubu ve deney grubunun sıra değerleri:

Tablo 3. Kollajen jellerdeki FITC-dextranın ulaştığı derinliklerin ortalamalarının Mean-Whitney U Testi için sıra değerleri

ÖLÇÜM	GRUP	SIRA
288.96	A	1
289.92	A	2
304.07	A	3
309.84	A	4
312.00	A	5
317.46	B	6
324.48	B	7
329.16	B	8
346.62	B	9
346.71	B	10
380.40	A	11
397.98	A	12
403.11	A	13
426.19	B	14
432.73	B	15
440.72	B	16

Yapılan hesaplamalar sonucunda $U_1=49$ ve $U_2=13$ bulunmuştur. Bulunan iki U değerinden küçük olanı yani 13 seçildi ve tablo U değeri ile karşılaştırıldı. Elde edilen U değeri, tablo U değerinden küçük ise fark anlamlı kabul edilmektedir. $n_1=8$ ve $n_2=8$ için 0.05 düzeyinde tek yönlü tablo U değeri 15'tir. Bulunan U değeri, tablo değerinden küçük olduğundan, fark anlamlıdır. Buna göre “ Bir saat boyunca 5 dyn/cm^2 kayma gerilmesi uygulanmış bovin aort endotel tabakasındaki permeabilite, kayma gerilmesi uygulanmamış bovin aort endotel tabakasındaki permeabiliteden anlamlı ölçüde büyüktür ($U=13$, $p>0.05$) “.

BÖLÜM V

5. TARTIŞMA:

Kayma gerilmelerine bağlı permeabilite ile ilgili in vivo olarak birçok çalışma yapılmıştır. Kayma gerilmeleri; F-aktin mikrofilament dağılımlarını (102), vazoaktif maddelerin üretimini (103) ve gen ifadelerini (104) içeren endotel yapı ve fonksiyonlarını (105) düzenler. Böylece, sıvı faz ve endotel tabaka, kayma gerilmelerine bağlı olarak madde geçişinde farklı dirençlerin oluşumuna neden olurlar.

Sıvı faz ve endotel tabakada geçişe olan direncin göreceli olarak önemini ölçmek için, Caro (106) ve Nerem (107), izotop ile işaretlenmiş kolesterol ve albumin alımını, kesip çıkarılmış atardamarlarda sıvı akış oranının bir fonksiyonu olarak ölçmüşlerdir. Bu maddelerin alımını, sıvı faz tarafından sınırlandırılan madde geçişi için sınır tabaka teorisi ile yapılan tahminlerle karşılaştırıldı. Hem madde alımının ve hem de sıvı akış oranının, sınır tabaka teorisi ile yapılan tahminlerden farklı olduğu ortaya çıkmıştır. Benzer sonuçlar, Carew (108) tarafından da elde edilmiştir. Makro moleküllerin alımında, endotel tabakası, sıvı faza göre daha fazla direnç göstermesine karşın, endotel hücreler arasından geçiş in vivo olarak kayma gerilmeleriyle zayıf bir şekilde ilişkilidir. Bir başka çalışmada, kurbağa kılcal damarlarıyla yapılan incelemelerde, küçük toplardamarlarda ve kılcal damarlarda artan kayma gerilmelerine bağlı olarak sıvı geçişinin arttığı görülmüştür (72). Buna karşın kılcal damarlarla bağlantılı olan küçük arterlerde artan kayma gerilmelerine bağlı olarak sıvı geçişinde değişiklik görülmemiştir (72). Tavşanlarda interkostal bölgelerde tıkanmadan dolayı albumin geçirgenliği ile ilgili dağılışta değişiklik olması, bölgesel sıvı dinamiğinde oluşun değişikliklerin permeabiliteyi etkilediği yönünde öne sürülen savları desteklemektedir. Çünkü bu çeşit tıkanmalar dallanma olan bölgelerde muhtemelen kayma gerilmelerini azaltmaktadır (109).

Kayma gerilmelerinde uzun dönemli değişimler, endotel tabakadan geçişi etkileyebilir (110). Bu hipotezi test etmek için, Evans blue boyasının alımını, 1 dakikadan 80 dakikaya varan aralıklarla açılıp kapanan femoral arteriovenöz şant ile ölçüldü (111). Evans blue kanda albumine bağlanır ve albumin alımının bu boyanın alımını olduğu varsayıldı bununla birlikte bağlanmamış Evans blue alımını ve elastine bağlanma oldu. Bununla beraber sonuçlar uzun dönemli sıvı akımının ve kayma gerilmelerinin değişiminin, madde alımını etkilediğini göstermiştir.

In vivo çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile in vitro çalışmalar ile elde edilen sonuçları karşılaştırmak doğru olmayabilir çünkü in vitro sistemlerde endotel hücre tabakası permeabilitesi sağlam ve sürekliliğini devam ettiren endotel tabakadan 10 ile 100 kat daha fazladır (112). Bununla birlikte in vitro çalışmalarda endotel hücrelerin mekanik ortama karşı daha açık ve belirgin cevap vermesi avantajı vardır. Bu nedenlerden dolayı in vitro düzenekler, in vivo olarak

endotel tabakanın permeabilitesinin üzerine olan etkilerinin gerçek olarak kabul edilmesinde yararlıdır.

Endotel tabakası ile hücre kültürü çalışmalarında, bu tabakadan su ve proteinlerin geçişlerindeki moleküler mekanizmaların belirlenmesinden yararlanılır. Bovin aort endotel hücrelerinin 10 dyn/cm^2 kayma gerilmelerine maruz kalması ile albumine olan geçirgenlik hızla artmış 30 dakika en yüksek noktaya ulaştıktan sonra herhangi bir sıvı akımı uygulanmayan değerden 10 kat fazla olan geçirgenlik seviyesi devam etmiştir (13). Akım kesilince albumine olan geçirgenlik hızlıca akım uygulanmadan önceki seviyeye geri dönmüştür.

Hidrolik iletkenlik, 10 dyn/cm^2 kayma gerilmelerinin 1 saat uygulanmasıyla 2.2 kat artmış ve kayma gerilmeleri sona erdikten sonra yüksek bir seviyede kalmıştır. Mikroskopik incelemeler, kayma gerilmelerine maruz kalınmasıyla endotel tabakada hasar oluşmadığını ve bunun da hidrolik iletkenliğin artmasının, endotel tabaka hasarı vasıtasıyla oluşmadığını göstermiştir. Sill ve arkadaşları (18) hidrolik iletkenlikte ve yüksek ile düşük kayma gerilmeleri ve makro moleküler permeabilitede farklı mekanizmaların etkili olduğunu öne sürmüşlerdir.

Birçok *in vitro* çalışmada porlu membranlar üzerinde çoğaltılan endotel hücre permeabiliteleri ölçülmüş ve statik koşullarda 4.8 ile $7.7 \times 10^{-6} \text{ cm/saniye}$ olarak ölçülmüştür (112,113,114). Bir başka çalışmada önceki çalışmalara benzer olarak düz kas hücreleri ile birlikte endotel hücrelerinin birlikte kültür çalışması yapılmış ve permeabilite statik koşullarda $6.5 \times 10^{-6} \text{ cm/saniye}$ olarak ölçülmüştür. Aynı çalışmada sadece endotel hücreler kullanılarak permeabilite ölçümleri yapılmış ve statik koşullarda permeabilite değeri 5.1×10^{-6} bulunmuştur.

Önceki çalışmalardan bazıları, kayma gerilmelerinin çözünen maddelerin endotel tabakadaki geçirgenliğine olan etkilerini göstermişlerdir. Jo ve arkadaşları (13), bovin aort endotel hücrelerine 10 dyn/cm^2 değerinde kayma gerilmesi 60 dakika boyunca uygulanınca, albumine karşı olan geçirgenliğin 10 kat arttığını ve bu kayma gerilmesi ortadan kaldırıldığında geçirgenlik değerlerinin, kayma gerilmesi uygulanmadan önceki seviyelere 60 dakika sonra döndüğünü belirtmişlerdir.

Yuan ve arkadaşları (115), izole edilip kanule edilmiş domuz koroner venüllerinde, akımın 7 mm/s 'den 13 mm/s 'ye çıkarılması ile albumine karşı olan geçirgenliğin 48% arttığını göstermişlerdir. Waters ve arkadaşları (116), sodyum fluorescein ve siyanokobalamin-B12'nin sıvı akımıyla permeabilitesinin düzenlenmesini, bovin pulmoner arter endotel hücrelerini geçirgen mikro taşıyıcı kürelerin üzerinde yetiştirerek göstermişlerdir. Akım oranı 0.9 ml/dakika 'dan 3.2 ml/dakika 'ya yükselince her iki işaret maddesinin de geçirgenlik değerlerinin belirgin bir şekilde arttığını gözlemlemişlerdir.

Bazı çalışmalar, kayma gerilmelerinin endotel tabakaların sıvı geçirgenliğini arttırdığını bildirmişlerdir. Sill ve arkadaşları (18), bovin aort endotel hücrelerinin sıvı geçirgenliğinin, 20 dyn/cm² kayma gerilmeleri 3 saat uygulandığında 3.76 kat arttırdığını göstermişlerdir. Lever ve arkadaşları (66), tavşanlarda yaptıkları çalışmalarda karotid arterlerdeki sıvı geçirgenliğinin, kayma gerilmelerinde 1 dyn/cm²'lik değişmelerin 20 dakika uygulanmasıyla belirgin şekilde arttığını göstermişlerdir. Williams ve arkadaşları (72), kurbağa mezenter kılcal damarlarını akım yönüne göre arteriolar kılcal damarlar, gerçek kılcal damarlar ve venüler kılcal damarlar olarak sınıflandırmış ve bu damarların kayma gerilmelerindeki değişmelerdeki bozukluklara olan cevaplarını çalışmışlardır. Sıvı geçirgenliği ile ilgili olarak, arteriolar kılcal damarlarda herhangi bir cevap görülmezken, gerçek kılcal damarlarda belirgin olmayan bir cevap oluşmuş ve venüler kılcal damarlarda belirgin bir cevap oluşmuştur ve bu kılcal damar yatağında bulunan bütün kısımların, mekanik uyarıya aynı şekilde cevap vermediğini göstermiştir. Lakshminarayanan ve arkadaşları (117), bovin retiküler endotel hücrelerine 3 saat 20 dyn/cm² kayma gerilmesi uygulanmasının, 3 saat sonunda kontrol grubuna göre sıvı geçirgenliğini 14.6 kat arttırdığını gözlemlemişlerdir.

Bir başka çalışmada DePaola ve arkadaşları (99), 0.4 µm çaplı gözenekleri olan polikarbonat filtreler üzerinde endotel hücrelerinden oluşan bir tabaka elde etmişler ve endotel tabaka üzerine 5 saat boyunca 10 dyn/cm² büyüklüğünden kayma gerilmesi uygulamışlardır. Polikarbonat filtrenin alt kısmına yerleştirmek için ise 22 mm kalınlığında agaroz jel hazırlanmıştır. Derişimi 8 mg/ml olacak şekilde FITC-dextran (Moleküler ağırlığı 70,000 dalton) çözeltisi PBS kullanılarak hazırlanmış ve hazırlanan sıvı endotel tabakanın üzerinden geçirilmiştir. Akım odasının giriş bölümüne 0.5 mm yüksekliğinde bir engel yerleştirilmiş ve atardamarlardaki dallanmaların olduğu bölgelerdeki düzensiz akıma benzer bir sıvı akışı olması sağlanmıştır. 5 saat sonunda FITC-dextran maddesinin birim alandaki yoğunluğuna bakarak madde geçişi hesaplanmıştır. Buna göre düzenli akım uygulandığında, akım uygulanmayan örneklerle göre 2.9 kat artış olurken, düzensiz akım uygulandığında 5.5 kat artış gözlenmiştir. Permeabilite ölçümleri polikarbonat filtreler tarafından kısmen engellenebilirken, çalışmamızda kollajenin permeabilite ölçümü için kullanıldığı yöntemde ise FITC-dextranın geçişinde herhangi bir engel bulunmamaktadır.

Van Haaren ve arkadaşları (118) tarafından yapılan bir çalışmada; membran ilişkili proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar, glikoproteinler, glikolipidler ve ilişkili plazma proteinleri tarafından oluşturulmuş ve endotel hücreleri çevreleyen tabaka olan endotel yüzey tabakasının boyutları ve geçirimsizlik özellikleri belirlenmiştir. İzole edilen fare mezenter arterleri (çap~150 µm), iç kısımdan çift uçlu ve dış kısımdan düz pipetlerle kanule edilmiştir. Büyük moleküler

ağırlıklı FITC-dextran(148 kDa) arterlerdeki hacmin büyük bir kısmını 1 dakikada doldurmuş fakat lüminal bölgedeki $2.6 \pm 0.5 \mu\text{m}$ genişlikteki kısımdan boya perfüzyonu ile 30 dakikada uzaklaştırılmıştır. Orta büyüklükteki moleküler ağırlığa sahip FITC-dextran (50.7 kDa), endotel yüzey tabakasına 30 dakikada yavaşça yayılmış fakat atardamar duvarına geçmemiştir. Küçük moleküler ağırlıklı FITC-dextran (4.4 kDa) hızlıca endotel yüzey tabakasını geçmiş ve atardamar duvarında birikmiştir. Bu çalışma çözünmüş maddelerin geçişi sırasında bariyer görevine yardımcı olan kalın bir endotel yüzey tabakası olduğunu ve bu tabakanın hasara uğramasının atherosklerozdaki ilk olayları şekillendirebildiğini göstermiştir. Çalışmanın in vitro olarak yapılmaması yapmış olduğumuz çalışma ile karşılaştırma şansını azaltmaktadır. Çünkü bizim yapmış olduğumuz in vitro çalışmada sadece endotel tabakası varken, bu çalışmada endotel tabakasına ek olarak düz kas hücreleri tabakası da vardır.

Çalışmamızda eksik kalan kısım olarak ortam sıcaklığının ayarlanması olmuştur. Atımlı sıvı akımı oluşturan pompanın sterilizasyonunun imkânsız oluşu ve bu yüzden inkübatörün içine yerleştirilememesi, çalışmaların oda sıcaklığında (25°C) yapılmasına neden olmuştur.

BÖLÜM VI

6. SONUÇ VE ÖNERİLER:

6.1. Sonuçlar

Çalışma kollajen jel üzerinde çoğaltılan endotel hücre tabakasına 5 dyne/cm² değerinde kayma gerilmesi uygulanmasının permeabiliteye olan etkisinin araştırılması amacıyla yapılmıştır. Bu çalışmada, 5 dyne/cm² kayma gerilmesi uygulanmış örneklerde, kayma gerilmesi uygulanmamış örneklere göre endotel hücre tabakasındaki permeabilite Mann-Whitney U Testi sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde büyük bulunmuştur (U=13, p>0.05).

6.2. Öneriler

Endotel hücrelerine etki eden kayma gerilmeleri, bu hücrelerin işlevlerini tam olarak yerine getirebilmesi için gerekli olsa da fizyolojik sınırların dışında meydana gelen kayma gerilmeleri arteroskleroz, hipertansiyon ve diyabet gibi rahatsızlıklarda kan-doku bariyerindeki madde geçişinde meydana gelen bozukluklara neden olabilir. Çalışmamızda kullandığımız yöntem ile arteroskleroz, hipertansiyon ve diyabet modelleri oluşturulup kayma gerilmelerinin etkileri üzerinde çalışılması önerilmektedir.

Buna ek olarak, kardiyovasküler sistemde kullanılmak üzere ilaç geliştirme aşamalarında endotel hücre tabakası üzerine bu ilaçların etkilerinin araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Resnick N, Yahav H, Shay-Salit A ve ark. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol.*, 2003;81:177–199.
2. Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Laboratory Investigation*, 2005.
3. Flaherty JT, Pierce JE, Ferrans VJ, Patel DJ ve ark. Endothelial nuclear patterns in the canine arterial tree with particular reference to hemodynamic events. *Circ Res.*, 1972;30:23–33.
4. Langille BL, Adamson SL. Relationship between blood flow direction and endothelial cell orientation at arterial branch sites in rabbits and mice. *Circ Res.*, 1981;48:481–488.
5. Starling EH. On the absorption of fluids from connective tissue spaces. *J Physiol (Lond)*, 1896; 19: 312–326.
6. Ashino Y, Ono S, Tanita T, Tida M ve ark. Hydraulic conductivity of the visceral pleura with hemodynamic lung edema in dogs. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi.*, 1995 ; 33: 120–126.
7. Gimbrone MA Jr. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost*, 1999; 82: 722–726.
8. Pedrinelli R, Penno G, Dell’Omo G, Bandinelli S ve ark. Microalbuminuria and transcapillary albumin leakage in essential hypertension. *Hypertension*, 1999; 34: 491–495.
9. Schmetterer L, Wolzt M. Ocular blood flow and associated functional deviations in diabetic retinopathy. *Diabetologia*, 1999; 42: 387–405.
10. Baetscher M, Brune K. An in vitro system for measuring endothelial permeability under hydrostatic pressure. *Exp. Cell Res.*, 1983;148: 541–547.

11. Eaton BM, Toothill VJ, Davies HA, Pearson JD ve ark. Permeability of human venous endothelial cell monolayers perfused in microcarrier cultures: effects of flow rate, thrombin, and cytochalasin D. *J. Cell. Physiol.*, 1991;149: 88–99.
12. Ehringer WD, Edwards MJ, Miller FN. Mechanisms of a-thrombin, histamine, and bradykinin induced endothelial permeability. *J. Cell. Physiol.*; 1996; 167: 562–569.
13. Jo H, Dull RO, Hollis TM, Tarbell JM. Endothelial albumin permeability is shear dependent, time dependent, and reversible. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 1991;260: H1992–H1996.
14. Liu SM, Sundqvist T. Effects of hydrogen peroxide and phorbol myristate acetate on endothelial transport and F-actin distribution. *Exp. Cell Res.*, 1995; 217: 1–7.
15. Ohshima N, Ookawa K. Effects of shear stress on cytoskeletal structure and physiological functions of cultured endothelial cells. In: *Cell Mechanics and Cellular Engineering*. New York: Springer-Verlag, 1994, p. 107–117.
16. Waters CM. Flow-induced modulation of the permeability of endothelial cells cultured on microcarrier beads. *J. Cell. Physiol.*, 1997;168: 403–411.
17. Ogunrinade O, Kameya GT, Truskey GA. Effect of Fluid shear stress on the permeability of the arterial endothelium. *Annals of Biomedical Engineering*, 2002; Vol. 30, pp. 430–446.
18. Sill HW, Chang YS, Artman JR, Frangos JA ve ark. Shear stress increases hydraulic conductivity of cultured endothelial monolayers. *Am. J. Physiol.*, 1995; 37:H535–H543.
19. Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol.*, 1999; 94: 295 – 314.
20. Lum H, Malik AB. Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can J Physiol Pharmacol.*, 1996; 74: 787–800.
21. Lum H, Malik AB. Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol.*, 1994; 267: L223–41.

22. Toborek M, Barger SW, Mattson MP, Barve S ve ark. Linoleic acid and TNF- α cross-amplify oxidative injury and dysfunction of endothelial cells. *J Lipid Res.*, 1996; 37: 123–35
23. Toborek M, Hennig B. Role of linoleic acid in gene expression; relationship to atherosclerosis. In: Quinn PJ, Kagan VE (eds) *Biochemistry of Lipid-soluble Vitamins. Subcellular Biochemistry*. Plenum Press, New York, 1998; London, pp. 415–436
24. Toborek M, Hennig B. Fatty acid mediated effects on the glutathione redox cycle in cultured endothelial cells. *Am J Clin Nutr.*, 1994; 59: 60–5
25. Hennig B, Toborek M, McClain CJ, Diana JN. Nutritional implications in vascular endothelial cell metabolism. *J Am Coll Nutr.*, 1996; 15: 345–58
26. Cader AA, Butterfield DA, Watkins BA, Chung BH ve ark. Electron spin resonance studies of fatty acid induced alterations in membrane fluidity in cultured endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol.*, 1995; 27: 665–73
27. Biegelsen ES, Loscalzo J. Endothelial function and atherosclerosis. *Coron Artery Dis.*, 1999; 10: 241–56.
28. Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q ve ark. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest.*, 2001; 108: 1341–8.
29. Zachary I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2001; 280: C1375–86.
30. Chou E, Suzuma I, Way KJ ve ark. Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in insulin resistant and diabetic states: a possible explanation for impaired collateral formation in cardiac tissue. *Circulation*, 2002; 105: 373–9.
31. Marfella R, Esposito K, Giunta R ve ark. Circulating adhesion molecules in humans: role of hyperglycemia and hyperinsulinemia. *Circulation*, 2000; 101: 2247–51.

- 32.** He Z, Rask-Madsen C, King GL. Managing heart disease Mechanisms of cardiovascular complications in diabetes and potential new pharmacological therapies. *European Heart Journal Supplements*, 2003; 5 (Supplement B), B51–B57.
- 33.** Majack RA, Bhalla RC. Ultrastructural characteristics of endothelial permeability pathways in chronic hypertension. *Hypertension*, 1981; 3: 586-595.
- 34.** Forthomme D, Cantin M. The retinal capillaries of the rat in deoxycorticosterone hypertension. *Am J Pathol.*, 1976; 85: 263.
- 35.** Giacomelli F, Juechter KB, Wiener J. The cellular pathology of experimental hypertension. VI. Alterations in retinal vasculature. *Am J Pathol.*, 1972; 68: 81.
- 36.** Nagy Z, Mathieson G, Huttner I. Opening of tight junctions in cerebral endothelium. II. Effect of pressure-pulse induced acute arterial hypertension. *J Comp Neur.*, 1979; 185: 579.
- 37.** Nagy Z, Mathieson G, Huttner I. Blood-brain barrier opening to horseradish peroxidase in acute arterial hypertension. *Acta Neuropath (Berlin)*, 1979; 48: 45.
- 38.** Bronsted HE, Westergaard E. Increased vesicular transport of horseradish peroxidase across the blood-brain barrier after chemical induction of hypertension. *In Advances in Neurology*, edited by Cervos-Navarro J, Betz E, Ebhardt G, Ferszt R ve ark. New York: Raven Press, 1978; 20: 347-348.
- 39.** Hansson HA, Johansson B, Blomstrand C. Ultrastructural studies on cerebrovascular permeability in acute hypertension. *Acta Neuropath (Berlin)*, 1975; 32: 187.
- 40.** Nag S, Robertson DM, Dinsdale HB. Cerebral cortical changes in acute experimental hypertension. An ultrastructural study. *Lab Invest.*, 1977; 36: 150.
- 41.** Nag S, Robertson DM, Dinsdale HB. Quantitative estimate of pinocytosis in experimental acute hypertension. *Acta Neuropath (Berlin)*, 1979; 46: 107.

42. van Deurs B. Observations on the blood-brain barrier in rats, with particular reference to phagocytic pericytes. *J Ultrastruct Res.*, 1976; 56: 65.
43. Westergaard E, van Deurs B, Bronsted HE. Increased vesicular transfer of horseradish peroxidase across cerebral endothelium, evoked by acute hypertension. *Acta Neuropath (Berlin)*, 1977; 37: 141.
44. Ross R, Glomset J, Harker L. The response to injury and atherogenesis: the role of endothelium and smooth muscle. *In Atherosclerosis Reviews*, edited by Paoletti R, Gotto AM Jr. New York: Raven Press, 1978; 3: 69-76
45. Giacomelli F, Wiener J, Spiro D. The cellular pathology of experimental hypertension. V. Increased permeability of cerebral arterial vessels. *Am J Pathol.*, 1970; 59: 133.
46. Johansson B, Strandgaard S, Lassen NA. On the pathogenesis of hypertensive encephalopathy. The hypertensive "breakthrough" of autoregulation of cerebral blood flow with forced vasodilatation, flow increase, and blood-brain barrier damage. *Circ Res* 34 and 35 (suppl I), 1974; 1-167.
47. Barbee KA, Davies PF, Lal R. Shear stress-induced reorganization of the surface topography of living endothelial cells imaged by atomic force microscopy. *Circ Res.*, 1994; 74:163-71.
48. Jaffe EA. *Biology of the Endothelial Cell*. 1984, 1st ed. Martinus Nijhoff, New York.
49. Vanhoutte PM. Endothelium dependent responses and inhibition of angiotensin-converting enzyme. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 1996; 23: S23-9.
50. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993; 362: 801-9
51. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis – an update. *N Eng J Med.*, 1986; 314: 488-500
52. Edgington TS, Dickinson CD, Ruf W. The structural basis of function of the TF. VIIa complex in the cellular initiation of coagulation. *Thromb Haemost.*, 1997; 78: 401-5

- 53.** Ewing JF, Janero DR, Grinnell TA, Schroeder JD ve ark. Reactivity of nitrogen monoxide species with NADH: implications for nitric oxide dependent posttranslational protein modification. *Arch Biochem Biophys.*, 1997; 343: 131–9
- 54.** Staddon J, Ratcliffe M, Morgan L, Hirase T ve ark. Protein phosphorylation and the regulation of cell-cell junctions in brain endothelial cells. *Heart Vessels Suppl.*, 1997; 12: 106–9
- 55.** Dejana E, Corada M, Lampugnani MG. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J*, 1995; 9: 910–8
- 56.** Dejana E, Valiron O, Navarro P, Lampugnani MG. Intercellular junctions in the endothelium and the control of vascular permeability. *Ann N Y Acad Sci.*, 1997; 811: 36–43
- 57.** Yoshida Y, Okano M, Wang S, Kobayashi M ve ark. Hemodynamic-force-induced difference of interendothelial junctional complexes. *Ann NY Acad Sci.*, 1995; 748: 104– 20
- 58.** Krams R, Wentzel JJ, Oomen JA, Vinke R ve ark. Evaluation of endothelial shear stress and 3D geometry as factors determining the development of atherosclerosis and remodeling in human coronary arteries in vivo. Combining 3D reconstruction from angiography and IVUS (ANGUS) with computational fluid dynamics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 1997; 17: 2061–5
- 59.** Arnal JF, Yamin J, Dockery S, Harrison DG. Regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA, protein, and activity during cell growth. *Am J Physiol.*, 1994; 267: C1381–88
- 60.** Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem.*, 1996; 65: 475–502
- 61.** Chang Y. *The mechanism of shear-induced increases in endothelial transport properties.* PhD thesis. The Penn. State Univ. University Park, PA, 1998.
- 62.** McIntire LV, Wagner JE, Whitson PA. Effect of flow on macromolecular transport across bovine brain endothelial cell monolayers. *ASME/BED Bioeng. Conf.*, 1995; 29:79–80

63. Hillsley MV, Tarbell JM. Oscillatory shear alters endothelial hydraulic conductivity and nitric oxide levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 293:1466–71
64. Kurose I, Kubes P, Wolf R, Anderson DC ve ark. Inhibition of nitric oxide production: mechanisms of vascular albumin leakage. *Circ. Res.*, 1993; 73:164–71
65. Baldwin AL, Thurston G, Naemi H. Inhibition of nitric oxide synthesis increases venular permeability and alters endothelial actin cytoskeleton. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 1998; 274:H1776–84
66. Lever MJ, Tarbell JM, Caro CG. The effect of luminal flow in rabbit carotid artery on transmural fluid transport. *Exp. Physiol.*, 1992; 77:553–63
67. Tedgui A, Lever MJ. Filtration through damaged and undamaged rabbit thoracic aorta. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 1984; 247:H784–91
68. Crone C, Levitt DG. Capillary permeability to small solutes. The cardiovascular system. Microcirculation. In *Handbook of Physiology*, Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc., 1984; IV: 10:411–66
69. Shibata M, Kamiya A. Blood flow dependence of local capillary permeability of Cr-EDTA in the rabbit skeletal muscle. *Jpn. J. Physiol.*, 1992; 42:631–39
70. Yuan Y, Granger HJ, Zawieja DC, Chilian WM. Flow modulates coronary venular permeability by a nitric oxide-related mechanism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 1992; 263:H641–46
71. Kajimura M, Michel CC. Flow modulates the transport of K^+ through the walls of single perfused mesenteric venules in anaesthetized rats. *J. Physiol.*, 1999; 512:665–77
72. Williams DA. Network assessment of capillary hydraulic conductivity after abrupt changes in fluid shear stress. *Microvasc. Res.*, 1999; 57:107–17

73. DeMaio L, Chang YS, Gardner TW, Tarbell JM ve ark. Shear stress regulates occluding content and phosphorylation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2001; 281:H105-13
74. Chang YS, Yaccino JA, Lakshminarayanan S, Frangos JA ve ark. Shear-induced increase in hydraulic conductivity in endothelial cells is edited by a nitric oxide-dependent mechanism. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000; 20:35–42
75. Antonetti DA, Barber AJ, Hollinger LA, Wolpert EB ve ark. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274:23463–67
76. Lakshminarayanan S, Antonetti DA, Gardner TW, Tarbell JM. Effect of VEGF on retinal microvascular endothelial hydraulic conductivity: the role of NO. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2000; 41:4256–61
77. DeMaio L, Antonetti D, Tarbell JM. Pathways mediating VEGF-induced increases in transendothelial transport. *Ann. Biomed. Eng.*, 2000; 28:5.77 (Abstr.)
78. Schnittler H-J, Pschel B, Drenckhahn D. Role of cadherins and plakoglobin in intrendothelial adhesion under resting conditions and shear stres. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 1997 ; 269:H2396-405
79. Langille BL, Adamson SL. Relationship between blood-flow direction and endothelial-cell orientation at arterial branch sites in rabbits and mice. *Circ. Res.*, 1981; 48:481-88
80. Dewey CF, Bussolari SR, Gimbrone MA, Davies PF. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J. Biomech. Eng.*, 1981; 103:177-85
81. Noria S, Cowan DB, Gotlieb AI, Langille BL. Transient and steady state effects of shear stress on endothelial cell adherens junctions. *Circ. Res.*, 1999; 85:504-14
82. Dejana E, Corada M, Lampugnani G. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J.*, 1995; 9:910-18

- 83.** Gooch KJ, Dangler CA, Frangos JA. Exogenous, basal, and flow-induced nitric oxide production and endothelial cell proliferation. *J. Cell Physiol.*, 1997; 171:252-58
- 84.** Levesque MJ, Nerem RM, Sprague EA. Vascular endothelial cell proliferation in culture and the influence of flow. *Biomaterials*, 1990;11:702-7
- 85.** DePaola N, Gimbrone MA, Davies PF, Dewey CF. Vascular endothelium responds to fluid shear stress gradients. *Arterioscler. Thromb.*, 1992; 12:1254-57
- 86.** White CW, Haidekker MA, Frangos JA. Temporal gradients in shear, but not spatial gradients, stimulate endothelial cell proliferation. *Circulation*, 2001; 103:2508-13
- 87.** Dimmeler S, Haendeler J, Rippmann V, Nehls M ve ark. Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett.*, 1996; 399:71-74
- 88.** Cho A, Mitchell L, Koopmans D, Langille BL. Effects of changes in blood flow rate on cell death and cell proliferation in carotid arteries of immature rabbits. *Circ. Res.*, 1997; 81:328-37
- 89.** Hoffman J, Haendeler J, Aicher A, Rossig L ve ark. Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circ. Res.*, 2001; 89:709-15
- 90.** Tricot O, Mallat Z, Heymes C, Belmin JM ve ark. Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation*, 2000; 101:2450-53
- 91.** Haidekker MA, White CR, Frangos JA. Analysis of temporal shear stress gradients during the onset phase of flow over a backward-facing step. *J. Biomech. Eng.*, 2001; 123:455-63
- 92.** Matsushita H, Morishita R, Nata T, Aoki M ve ark. Hypoxia-induced endothelial apoptosis through nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-mediated bcl-2 suppression: in vivo evidence of the importance of NF-kappaB in endothelial cell regulation. *Circ. Res.*, 2002; 86:974-81

- 93.** Ikeda R, Furukawa T, Kitazono M, Ishitusha K ve ark. Molecular basis for the inhibition of hypoxia-induced apoptosis by 2-deoxy-D-ribose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 291:806-12
- 94.** Davies PF, Dewey CF, Bussolari SR, Gordon EJ ve ark. Influence of hemodynamic forces on vascular endothelial function- *in vitro* studies of shear stress and pinocytosis in bovine aortic cells. *J. Clin. Invest.*, 1984; 73:1121-29
- 95.** Sprague EA, Steinbach VL, Nerem RM, Schwartz CJ. Influence of a laminar steady-state fluid-imposed wall shear stress on the binding, internalization and degradation of low density lipoproteins by cultured arterial endothelium. *Circulation*, 1987; 76:648-56
- 96.** Kudo S, Ikezawa K, Ikeda M, Oka K ve ark. Albumin concentration profile inside cultured endothelial cells exposed to shear stress. *ASME/BED Proc. Bioeng. Conf.*, 1997; 35:547
- 97.** Friedman MH, Fry DL. Arterial permeability dynamics and vascular disease. *Atherosclerosis*, 1993; 104:189-94
- 98.** Trzewik J, Artmann-Temiz A, Linder P, Demirci T ve ark. Evaluation of Lateral Mechanical Tensionin Thin-Film Tissue Constructs. *Annals of Biomedical Engineering*, 2004; 32:1243–1251
- 99.** Phelps JE, DePaola N. Spatial variations in endothelial barrier function in disturbed flows in vitro. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2000; 278: H469– H476
- 100.** Frangos JA, McIntire LV, Eskin SG. Shear Stress Induced Stimulation of Mammalian Cell Metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, 1988 ;32:1053–1060
- 101.** Moon JJ, Matsumoto M, Patel S, Lee L ve ark. Role of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans in Endothelial Cell Migration and Mechanotransduction. *J. Cell. Physiol.*, 2005; 203: 166–176
- 102.** Colangelo S, Langille BL, Steiner G, Gotlieb AI. Alterations in endothelial F-actin microfilaments in rabbit aorta in hypercholesterolemia. *Arterioscler., Thromb. Vasc. Biol.*, 1998; 18:52–56

- 103.** Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow *in vivo*. *Hypertension*, 1986; 8:37–44
- 104.** Chien S, Li S, Shyy JYJ. Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells. *Hypertension*, 1998; 31:162–169
- 105.** Langille BL, Adamson SL. Relationship between blood-flow direction and endothelial-cell orientation at arterial branch sites in rabbits and mice. *Circ. Res.*, 1981, 48:481–488
- 106.** Caro CG. Transport of ¹⁴C-4-cholesterol between perfusing serum and dog common carotid artery: A shear dependent process. *Cardiovasc. Res.*, 1974; 8:194–203
- 107.** Nerem RM, Mosberg AT, Schwerin WD. Transendothelial transport of ¹³¹I-albumin. *Biorheology*, 1976; 13:71–77
- 108.** Carew TE. Mechano-chemical response of canine aortic endothelium to elevated shear stress *in vitro*. 1971, PhD, Catholic University of America
- 109.** Staughton TJ, Lever MJ, Weinberg PD. Effect of altered flow on the pattern of permeability around rabbit aortic branches. *Am. J. Physiol.*, 2001; 281:H53–H59
- 110.** Friedman MH, Fry DL. Arterial permeability dynamics and vascular disease. *Atherosclerosis*, 1993; 104:189–194
- 111.** Friedman MH, Henderson JM, Aukerman JAP, Clingan A. Effect of periodic alterations in shear on macromolecular uptake. *Biorheology*, 2000; 37:265–277
- 112.** Albelda SM, Sampon PM, Haselton ER, McNiff MJ ve ark. Permeability characteristics of cultured endothelial cell monolayers, *J. Appl. Physiol.*, 1988; 64:308–322
- 113.** Okano M, Yoshida Y. Endothelial cell morphometry of atherosclerotic lesions and flow profiles at aortic bifurcations in cholesterol feed rabbits. *J. Biomech. Eng.*, 1992; 114 :301–308

- 114.** Shasby DM, Shasby SS. Effect of calcium on transendothelial albumin transfer and electrical resistance. *J. Appl. Physiol.*, 1986; 60:71–79.
- 115.** Yuan Y, Granger HJ, Zawieja DC, Chilian WM. Flow modulates coronary venular permeability by a nitric oxide-related mechanism. *Am J Physiol.*, 1992;263: H641–646
- 116.** Waters CM. Flow-induced modulation of the permeability of endothelial cells cultured on microcarrier beads. *J Cell Physiol.*, 1996;168:403–11.
- 117.** Lakshminarayanan S, Gardner TW, Tarbell JM. Effect of shear stress on the hydraulic conductivity of cultured bovine retinal microvascular endothelial cell monolayers. *Current Eye Research*, 2000; 21:944–951
- 118.** Van Haaren PMA, Van Bavel E, Vink H, Spaan JAE. Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2003; 285: H2848–H2856
- 119.** Zarines CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottiurai VS. *Circ. Res.*, 1983; 53:502