

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI HEMATOLOJİ BİLİM DALI**



**ORAK HÜCRE ANEMİSİNDE DOLAŞIMDAKİ ENDOTELYAL HÜCRELER: Endotelyal hücre
izolasyonu, kültür ve immun tiplendirme çalışmaları**

Hematoloji Yan Dal Uzmanlık Tezi

Doç Dr. Can BOĞA

Adana/2007

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI HEMATOLOJİ BİLİM DALI**



**ORAK HÜCRE ANEMİSİNDE DOLAŞIMDAKİ ENDOTELYAL HÜCRELER: Endotelyal hücre
izolasyonu, kültür ve immun tiplendirme çalışmaları**

**DANIŞMANI
Doç. Dr. Hakan ÖZDOĞU**

Hematoloji Yan Dal Uzmanlık Tezi

Doç Dr. Can BOĞA

Adana/2007

ÖZET

ORAK HÜCRE ANEMİSİNDE DOLAŞIMDAKİ ENDOTELYAL HÜCRELER: Endotelial hücre izolasyonu, kültür ve immün tiplendirme çalışmaları

Kemik iliğinde bulunan endotelial öncü hücrelerinin, zararlanmış dokuların tamir edilmesi ve yeni damar oluşumu işleminde önemli rol oynayabildikleri bilinmektedir. Bu hücreler, kemik iliğinden periferik dolaşımına geçerek daha olgun hücreler haline dönüşebilirler. Dolaşımdaki endotelial hücre sayısının bilinmesi; damar zararlanması ile ilişkili hastalıklarının tanısı, prognozu, ve takibi yönünden yarar sağlayabilir. Endotelial hücrelerin tam olarak bilinmeyen olgunlaşma süreçlerinin anlaşılması ise yeniden damar oluşumunu sağlayan etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini sağlayabilir. Uygun şekilde izole edilip çoğaltılmaları, hücre tedavileri uygulamalarına fırsat verebilir. Ancak endotelial hücrelerin olgunlaşma süreçleri tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca endotelial hücrelerin izole edilmesi ve periferik kanda sayılma yöntemleri konusunda tam bir görüş birliği sağlanamamıştır. Endotelial hücre boyutu ve granülaritesinin olgunlaşma ile ilişkisi açık değildir.

Bu çalışmada, ilk defa endotele özel yeni bir antikor kombinasyonu (anti-CD144, anti-CD146) seçilerek, hazırlama ve analiz aşamalarında ise yeni bir teknik kullanılarak endotelial hücre izolasyonu, immün fenotiplendirme ve akım sitometrede dolaşımda bulunan endotel hücrelerinin sayım işlemleri yapılmıştır. Ayrıca, özel boyalar kullanılarak immün floresan mikroskopta morfolojik özellikler araştırılmıştır. Endotelial hücre kaynağı olarak, orak hücre hastalığı olan hastaların periferik kan örnekleri, kemik iliği, insan göbek kordonu endotelial hücre dizisi ve safen ven örnekleri kullanılmıştır. Damar hasarının yoğun olduğu orak hücre hastalığında bazı klinik parametrelerin (yaş, cins, ağrılı kriz sayısı, bacak yaraları, hepatik nekroz, akut nörolojik olay, avasküler kemik nekrozu, hidroksiüre kullanımı) ve laboratuvar parametrelerin (stabil durumdaki hemoglobin, mutlak nötrofil sayısı, hemoglobin S konsantrasyonu) endotelial hücre sayısı ile ilişkisi araştırılmıştır.

Sonuç olarak, orak hücre hastalığında literatürde belirtilen değerlerden daha yüksek endotelial hücre sayısı elde edildi (Kontrollerde ortalama 2396.55 ± 658.37 TEH/mL' ye karşılık orak hücre stabil grupta 6766.0 ± 1077 TEH/mL, veya vasoklusif kriz grubunda 18393.6 ± 4642.7 TEH/mL, $P < 0.05$ iki grup için). Bu değerlerin orak hücre hastalığının klinik faktörleri ile ilişkili olmadığı tespit edildi. Hemoglobin değerleri ile dolaşımdaki endotelial hücre sayılarının artışı arasında korelasyon olduğu saptandı. Endotelial hücreler arasında küçük ve lenfosit benzeyen hücreler yanında, boyut ve granülaritesi farklı monosit ve granülositlere benzeyen hücrelerin bulunabileceği gözlemlendi. İlave olarak kemik iliği endotelial öncü hücreleri arasında olgun hücre yüzey belirleyicilerinin de bulunabileceği tespit edildi. Bu sonuçlar, endotelial döngünün hızlı olduğu orak hücre hastalığında yapılacak endotelial hücre çalışmalarının, hastalıkların mekanizması ve seyri yanında endotelial hücrelerin geleceğini yönlendirebilecek çalışmalara yol gösterebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: Orak hücre hastalığı, dolaşımdaki endotelial hücreler, akım sitometri.

ABSTRACT

CIRCULATING ENDOTHELIAL CELLS IN SICKLE CELL DISEASE: Endothelial cell isolation, cultur, and immunophenotyping studies.

Bone marrow cells contain a group of cells (a special sub-type of progenitor cells) which are able to differentiate into mature endothelial cells can play a role in tissue repair and neovascularization of ischemic organs. These cells can migrate from bone marrow to systemic circulation. Identification and quantification of circulating endothelial cells may provide useful material for diagnosis, prognosis and the course of vascular diseases. To clarify of maturation process of the endothelial cells may lead to establish an effective strategy for therapeutic neo-vascularization. When placed *in vivo*, these cells can obtain with the proper milieu that allows them to reconstitute organ systems. However, a full consensus has not been established yet for identification and quantification of endothelial cells in peripheral blood. It is not clear whether size and granularity of these cells are associated with maturation. In this study, for the first time, we identify and quantify endothelial cells by using a monoclonal antibody combination specific for endothelial cells (anti-CD144, anti-CD146) and a new technique for preparing and analysis of the samples. In addition, we examined morphology of endothelial cells by using immunofluorescent microscopy. In these study, we isolated endothelial cells from peripheral blood samples of the sickle cell patients, bone marrow, saphenous vein, and human umbilical vein. In addition, we defined the effects of clinical factors (age, sex, number of painful crisis, acute neurological event, hepatic necrosis, bone necrosis, leg ulcer, hydroxyurea use) and other laboratory variables (the steady state hemoglobin, neutrophil count, and levels of hemoglobin S) on circulating endothelial cell count in sickle cell disease. This protocol produced much higher values for the number of circulating endothelial cells (a mean of $2396.55 \pm 658.37/\text{mL}$ in controls vs $6766.0 \pm 1077/\text{mL}$ in the steady-state group, or $18393.6 \pm 4642.7/\text{mL}$ in the vaso-occlusive crises group, $P < 0.05$ for both), and also showed variable endothelial cells size and granularity, which may reflect activated, or early release endothelial cells. Circulating endothelial cell counts was not associated with clinical factors. The hemoglobin level was correlated with an increase in circulating endothelial cell counts. We noted low numbers of CD34- cells that co-expressed the endothelial markers, CD146 and CD144. In conclusion, this study may help methodological optimization of endothelial cell identification, quantification, and administration to improve the efficacy of endothelial cell transplantation in future.

Keyword: Sickle cell disease, circulating endothelial cells, flow cytometry.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR ve SİMGE DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Endotelyal öncü hücreler ve dolaşımdaki endotelyal hücreler	3
2.1.1. Dolaşan endotel hücrelerin izolasyon, fenotipik özellikleri, ve olgunlaşma süreci	6
2.1.2. Dolaşan endotel hücrelerin mobilizasyon, ve salınma süreci	6
2.1.3. Endotel hücre kültürleri	7
2.1.4. Damar hastalıklarında endotel hücrelerin rolü	8
2.1.5. Damar hasarlanmalarda dolaşan endotelyal hücreler	8
2.1.6. Dolaşımdaki endotel hücrelerinin şekli ve sayısını etkileyen faktörler	9
2.1.7. Dolaşımdaki endotelyal hücreleri ile ilgili öne sürülen hipotezler	11
2.1.8. Hastalıkların tanı ve tedavisinde dolaşımdaki endotelyal hücrelerin klinik kullanımı	12
2.2.9Orak hücre anemisinde dolaşımdaki endotelyal hücreler	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Çalışma grubu ve örnek toplama	16
3.2. Çalışma protokolü	16
3.3. Yöntem	22
3.3.1. Endotelyal hücrelerin immun tiplendirmesi	22
3.3.1.1. Antikorlar	22
3.3.1.2. Akım sitometresi	22
3.3.1.3. Kapılama ve endotelyal hücrelerin sayılması	23
3.3.2. Dolaşımdaki endotelyal hücrelerin morfolojik karakteristikleri	25
3.3.3. Endotelyal hücre kültürü	26
3.3.4. Safen ven endotelyal hücre analizi	26
3.3.5. Kemik iliği endotelyal hücre analizi	26
3.3.6. Tüp testi	26
3.3.7. Dolaşımdaki endotelyal hücre boyutu	26
3.3.8. İstatistiksel analiz	27
4. BULGULAR	27
4.1. Akim sitometri ve immun floresan mikroskopi inceleme sonuçları	27
4.2. Safen ven endotelyal hücre çalışması	32
4.3. Kültüre edilmiş endotelyal hücrelerden elde edilen sonuçlar	33
4.4. Kemik iliği örneğinde endotelyal hücre izolasyonu	35
4.5. Endotelyal hücre boyutu ve granülaritesinin anlamı	35
4.6. Endotelyal hücre morfolojisi zaman ilişkisi	37
4.7. Endotelyal hücre sayısının klinik ve laboratuvar parametreleri ile ilişkisi	37
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	46
7. KAYNAKLAR	47

KISALTMALAR VE SİMGE DİZİNİ

7-AAD	: 7-aminoactinomycine D
ANO	: Akut nörolojik olay
ALT	: Alanin aminotransferaz
BY	: Bacak yaraları
c-kit	: CD117
DilAc-LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein asetile-Dil kompleks
E	: Erkek
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EF	: Ejeksiyon fraksiyonu
EH	: Endotelyal hücreler
eNOS	: Nitrik oksit sentaz
EÖH	: Endotelyal öncü hücreler
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
Hb	: Hemoglobin
Hb S	: Hemogloblin S konsantrasyonu
HK	: Hidroksiüre kullanımı
HN	: Hepatik nekroz
HUVEC	: İnsan göbek kordon kanı endotelyal hücreleri
KABC	: Koroner arter by-pass cerrahisi
K	: Kadın
KN	: Kemik nekrozu
Kr	: Kreatinin
KOS	: Yıllık ortalama kriz sayısı
MMP-9	: Membran metallo proteinaz-9
TEH	: Toplam endotelyal hücre sayısı
VEGF	: Vasküler endotelyal growth faktör
VGFR-2	: Vasküler endotelyal growth faktör reseptörü-2
VE-cadherin	: Vasküler endotelyal kadherin
G-CSF	: Granülosit koloni uyarıcı faktör
KİMH	: Kemik iliği mononükleer hücreleri
Mİ	: Myokard infarktüsü
NS	: Mutlak nötrofil sayısı
PBMH	: Periferik kan mononükleer hücreler
PBS	: Fosfat tamponlu solusyon
PC-5	: Cyanin-5
PE	: Phycoerythrin
SF	: Serum fizyolojik
SS	: Standart sapma
Tk	: Transkütanöz
Ulex-lectin	: <i>Ulex europaeus</i> den elde edilmiş lektin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Endotelyal hücrelerin farklılaşma şeması.	5
Şekil 2.2. Orak hücre hastalığında endotelyal aktivasyon şeması.	15
Şekil 3.1. A-G. Akım sitometresinde endotelyal hücrelerin tanınması için kapılama stratejisi.	24
Şekil 4.1. Kriz döneminde ve stabil dönemde bulunan orak hücre hastalığında dolaşımdaki toplam endotelyal hücreler ve öncü endotelyal hücreler	28
Şekil 4.2. Kriz döneminde bulunan hastalarda dolaşımdaki endotelyal hücre sayısının seyri.	29
Şekil 4.3. Kriz dönemi otomatik alyuvar değişimi ile sonlandırılan hastaların kriz öncesi ve kriz sonrası dolaşımdaki endotelyal hücre sayıları.	29
Şekil 4.4. A-C. Stabil durumda olan orak hücre hastalığında dolaşımdaki endotelyal hücrelerin morfolojik özellikleri.	31
Şekil 4.5. A-B. Orak hücre hastalığı olan hastaların periferik kanında CD34- endotelyal hücrelerin tespit edilmesi.	32
Şekil 4.6. A-E. İnsan safen ven örneğinden izole edilen endotelyal hücrelerin morfolojik özellikleri.	33
Şekil 4.7. A ve B. İnsan göbek kordonu endotelyal hücre kültürü.	34
Şekil 4.8. A ve B. Kemik iliğinde endotelyal hücrelerin tespit edilmesi.	35
Şekil 4.9. A-F. Endotelyal hücre boyutu ve granülaritesi ile melanoma hücresi adhezyon molekülü bağlanması arasındaki ilişki.	36
Şekil 4.10. A ve B. Tüp testi sonuçları.	37
Şekil 5.1. Endotelyal hücre farklılaşma akış şeması.	42

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Dolaşımdaki endotelyal hücrelerin tespit edilmesi ve sayılması için kullanılan yöntemlerin özellikleri.	6
Tablo 2.2. Klinikte yayınlanmış, vasküler tedavi amaçlı otolog kök hücre uygulamaları	13
Tablo 3.1. Çalışma sırasında ağırlı kriz gurubunda olan orak hücreli hastanın klinik özellikleri.	18
Tablo 3.2. Çalışma sırasında stabil grupta olan orak hücreli hastanın klinik özellikleri	19
Tablo 3.3. Çalışma sırasında ağırlı kriz gurubunda olan orak hücreli hastanın laboratuvar özellikleri.	20
Tablo 3.4. Çalışma sırasında stabil hasta grubunda olan orak hücreli hastanın laboratuvar özellikleri.	21
Tablo 4.1. Dolaşımdaki endotelyal hücrelerin sayılması	27
Tablo 4.2. Dolaşımdaki toplam endotelyal hücre sayısı ile orak hücre hastalığına ait klinik parametreler arasındaki ilişki.	38

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Endotelial öncü hücreler periferik kan dolaşımında bulunan bir hücre popülasyonudur. Bu endotelial öncü hücreler hem hematopoietik stem/ öncü hücre yüzey belirleyicileri (CD34 veya CD133) ve hem de endotelial yüzey belirleyicilerini (VE-cadherin veya VEGFR-2) birlikte ifade eder. Hayvan modellerinde endotelial öncü hücrelerin yeni damar oluşan bölgelere yerleşerek yeni damar oluşumu işleminde rol oynayabildikleri anlaşılmıştır. Endotelial öncü hücreler anjiogenetik etkilerinin yanı sıra, işlevi bozulmuş endotel hücrelerinin yerini alarak, “tamir hücreleri” olarak görev yaparlar. Bu yüzden endotelial zararlanmalar ile ilişkili hastalıklarda ve iskemik hastalıkların revaskülarizasyon tedavilerinde, otolog endotelial öncü hücrelerin kullanılması gündeme gelmiştir. Çalışmalarda endotelial öncü hücrelerin doku tamiri amacı ile klinikte kullanılması ile iskemik kalp hastalıklarında başarılı sonuçlar alındığı bildirilmektedir.

Endotelial öncü hücrelerin değişik kaynaklardan kültür veya manyetik tanecikler (mikrobeads) kullanılarak izolasyon işlemleri tanımlanmıştır. Ancak endotelial öncü hücrelerin *in vivo* yaşam süreleri ve olgunlaşma süreçleri ile ilgili yeterli veriler yoktur. Aynı zamanda günümüzde *in vivo* olarak kemik iliği kaynaklı endotelial öncü hücrelerin farklılaşmalarını uyaran veya baskılayan mekanizmalar ve bu hücrelerin yapışması, seyahat etmesi ve zararlanmış dokuya yerleşmesini (homing) sağlayan sinyaller halen büyük ölçüde bilinmemektedir. Sağlıklı erişkin kişilerin dolaşımdaki endotelial öncü hücrelerin sayıları ile ilgili yayınlanmış olan bulgular sınırlı ve yetersizdir. Dolaşan endotelial hücrelerin tanınması ve sayılması konusunda tam bir görüş birliği sağlanamamıştır. Dolaşımda bulunan olgun endotelial hücrelerin kaynağı açık değildir. Dolaşımda bulunan endotelial hücrelerin boyutları da tam olarak belli değildir. Endotelial hücre boyutu ve granülaritesinin aktivasyon ile mi yoksa olgunlaşma süreci ile mi ilgili olduğu tam olarak bilinmemektedir.

Endotelial öncü hücreler dolaşımda çok az sayıdadır (dolaşımdaki mononükleer hücrelerin yaklaşık 0.01%-0.0001%'i). Ancak damar zararlanması veya sitokinlerin sistemik etkileri ile kemik iliğinden periferik dolaşıma geçebilirler (1,3-5). Yetişkin bir insanda endotelial hücre sayısının $1-6 \times 10^{13}$, yaklaşık 1 kg ağırlığında olduğu, ve $1-7 \text{ m}^2$ yüzey kapladıkları hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar doğru ise özellikle endotelial hasarın ve

endotelyal dögünün yüksek olduğu hastalıklarda, kemik iliğinden dolaşıma geçen ve damar ağından dolaşıma dökülen endotelyal hücrelerin sayısının literatürde belirtilenden daha yüksek olması beklenir. Dolaşımda bulunması beklenen endotelyal hücrelerin sayısının tahmin edilenin altında olmasının nedeni'nin yöntem farklılığından kaynaklandığı düşünülmüştür. Çünkü farklı laboratuvarların endotelyal hücrelerin tespiti için kullandıkları monoklonal antikor panelleri farklıdır. Bir çok laboratuvarların kullandığı periferik kan mononükleer hücrelerinin ayrılması işleminden kaynaklanan hücre kayıpları ortaya çıkmaktadır. İlave olarak, akım sitometresinde kullanılan kapılama tekniklerinden (dar kapılama) kaynaklanan ölçüm farklılıkları olabilmektedir. Bu nedenler ile dolaşımdaki endotelyal hücrelerin analizleri konusunda tam bir görüş birliği ve standardizasyon sağlanamamıştır. Son zamanlarda bu problemlerin aşılmasına yönelik çalışmalar sürdürülmektedir. Yöntem ile ilgili iyileştirmenin sağlanması ile sadece endotelyal hücrelerin tespit edilmesi ve sayılması değil aynı zamanda olgunlaşma süreçleri hakkında bilgi edinilmesi kolaylaşabilir.

Orak hücre hastalığı, yaygın doku iskemisinin ve kronik organ hasarının olduğu bir damar hastalığı olarak kabul edilebilir. Anormal şekilli (orak şeklinde) alyuvarların küçük damarlar içerisinde geçerken alyuvarların zarlarında ifade edilen bağlayıcı moleküller yardımı ile damar duvarındaki endotel hücrelerine köprü kurulur. Bu anormal yapışma neticesinde çekirdekli alyuvarlar ve nötrofiller gibi diğer iltahap hücrelerinin endotel hücreleri ile olan teması neticesinde, endotelyal bütünlük ve endotelyal işlev bozulur. Endotelyal zararlanma ortaya çıkar ve endotel hücreleri apoptozis'e zorlanır. Diğer yandan, mikrotrombüslerin oluşması ile doku perfüzyonu bozulur, ve dokularda küçük mikroinfarktüs alanları meydana gelir. Kemik iliği ise çabuk parçalanan alyuvarların yenilerini yetiştirebilmesi için hiperaktiftir. Bütün bu özellikleri ile orak hücre hastalığında, dolaşan endotelyal hücreler konusunda yapılacak araştırmalar için uygun materyaller sağlanabileceği düşünülebilir.

Bu çalışmada; endotelyal aktivasyon'un ve endotelyal dögü'nün en belirgin olduğu hastalıklardan birisi olan orak hücre hastalığında, dolaşımda bulunan endotelyal hücrelerin yeni bir protokol kullanılarak tanınması ve periferik kanda sayılması,

Dolaşımda bulunan olgun endotel hücrelerin immun fenotipik özellikleri ve morfolojik özelliklerinin iyi anlaşılması amacı ile kontrol olarak insan safen veni endotel hücrelerinde izolasyon çalışmaları ve morfolojik inceleme yapılması,

Olgunlaşma sürecinin daha iyi anlaşılması ve dolaşımda bulunan olgun endotel hücre kaynağının sadece damar yatağından dökülen endotel hücrelerin olup olmadığının anlaşılması için, kemik iliğinde endotel öncü hücrelerde izolasyon çalışmaları, immun fenotipik özellikler ve morfolojik incelemelerin yapılması,

Dolaşımda bulunan endotel hücre boyutunun anlaşılması ve hücre boyutunun endotel hücre aktivasyonu ile mi, yoksa olgunlaşma ile mi ilgili olduğunun tespit edilmesi,

Periferik kan örneklerinde bulunan endotel hücrelerin yüzey belirleyicilerinde belirli bir zaman diliminde hızlı bir değişim olup olmadığının belirlenmesi,

Orak hücre hastalığında dolaşımda bulunan endotel hücrelerin sayısının bazı klinik parametreler (yaş, cins, ağırlı kriz sayısı, bacak yaraları, hepatik nekroz, akut nörolojik olay, avasküler kemik nekrozu, hidroksiüre kullanımı) ve laboratuvar parametreler (stabil durumdaki hemoglobin, mutlak nötrofil sayısı, hemoglobin S konsantrasyonu) ile ilişkisinin araştırılması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.1. Dolaşan endotel hücrelerin izolasyon, fenotipik özellikleri, ve olgunlaşma süreci

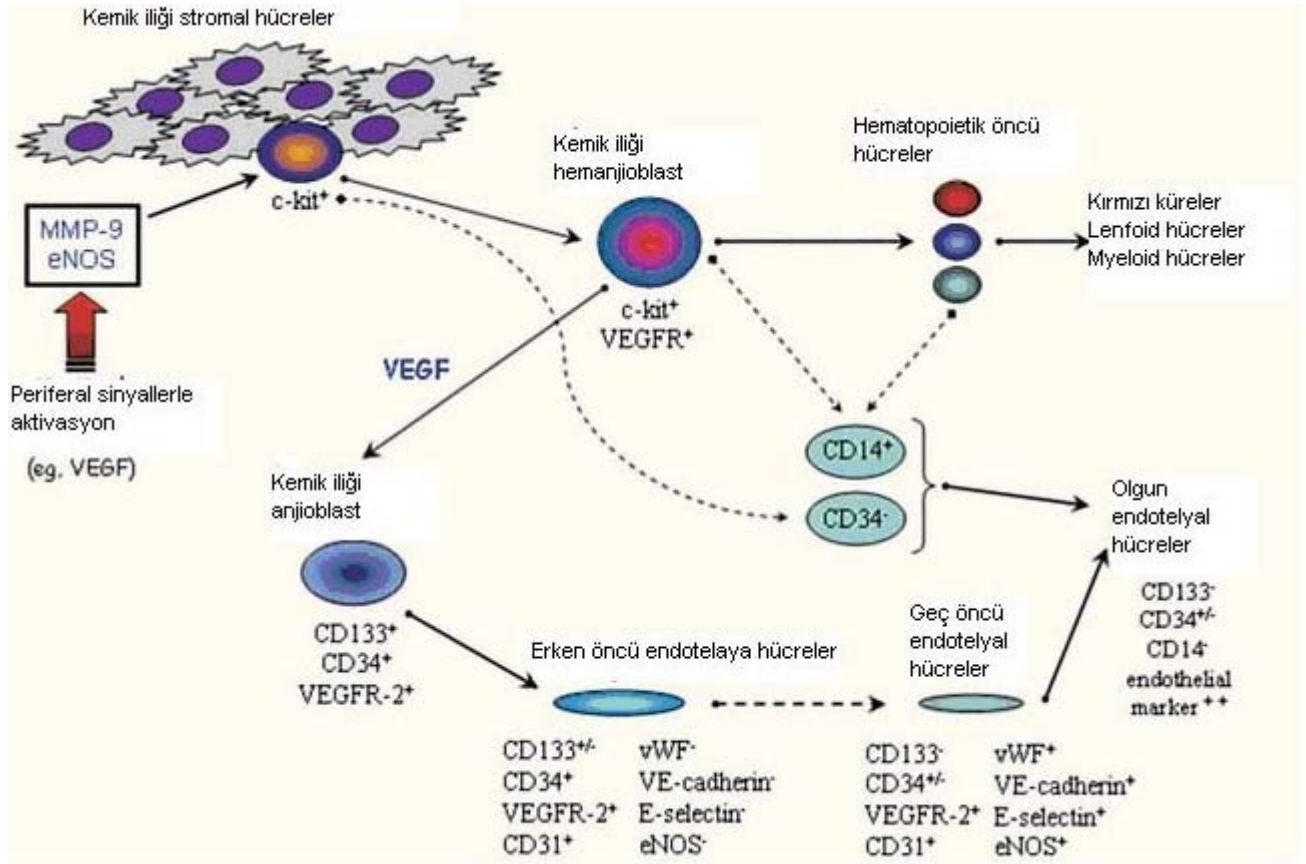
Bilindiği kadar; kemik iliğinden izole edilen endotel öncü hücreler olgunlaşmamış hücrelerdir ve erken hemopoetik hücre yüzey belirleyicisi olan CD133 (veya AC133) ve CD117 (c-kit) ifade ederler (1-4). Bu hücrelerin fenotipi genellikle CD133+/CD117+/CD34+/VGFR-2+/VE-cadherin- şeklindedir (2,4,5). Buna karşılık, periferik kandan izole edilen endotel öncü hücreler belirgin şekilde CD133'ü kaybeder ve giderek olgun endotel hücrelerine doğru farklılaşmaya başlar (1,6,7).

İlginç olarak izole edilen endotel öncü hücreler 4-7 günlük kültürde yüksek oranda monosit/makrofaj kökenli yüzey belirleyicilerini (CD14, CD11b, CD11c) ifade eder. Fakat

VE-cadherin ve endothelial nitric oksid sentaz (eNOS) negatiftir (6,8,9,10). Sadece bu hücrelerin az bir alt grubu (yaklaşık %5) CD34, VE-cadherin ve E-selectin, gibi öncü hücre ve endotel yüzey belirleyicilerini ifade ederler. Muhtemelen bu alt grup hücreler, proliferasyon yeteneği olan gerçek endotelial öncü hücrelerdir (3,10).

Periferik kandan izole edilen erken endotelial öncü hücreler ise (izolasyondan 4-7 gün sonra) CD133+/-/CD34+/VEGFR-2+/CD14-/VE-cadherin-/eNOS- yüzey belirleyicilerini ifade ederler ve mononükleer hücrelerin küçük bir alt grubudur (4,6,8,11). Kültür periyodu sırasında, birkaç hafta içinde bu hücreler olgun endotel hücrelerinin fenotip yüzey belirleyicilerini (CD133-/CD34+/-/VEGFR-2+/CD14-/VE-Cadherin+/eNOS+/vWF+/E-Selectin+) ifade etmeye başlarlar (1,3,6).

Bu olgunlaşma süreci muhtemelen *in vivo* olarak kemik iliği kaynaklı ilkel öncü hücrelerin sistemik dolaşıma seyahati ile olur. Kan örneklerinden dolaşımdaki bu hücrelerin hesaplanması akım sitometri ile CD133+/VEGFR-2+, CD117+/VEGFR-2+ veya CD34+/VEGFR-2+ oranlarının hesaplanması ile mümkün olabilir (1,12-14). Bundan başka, CD34- hücrelerden endotelial fenotipte hücreler gelişebileceği ve kemik iliği kaynaklı CD34-/CD14+ mononükleer hücrelerin infüzyonunun zararlanmış damar re-endotelizasyonunda etkin olabileceği bildirilmiştir (Şekil 2.1.) (1,12,14). İlave olarak, monositlerin aynı zamanda endotelial yüzey belirleyicilerini ifade ettikleri ve anjiogenik koşullarda *in vivo* olarak tüp benzeri yapılar oluşturduğu gösterilmiştir (9,10,13). Bu yakın ilişki monosit ve endotelial dizi hücrelerinin kökenlerinin muhtemelen kemik iliğinde bulunan ve hemanjioblast olarak adlandırılan erken bir öncü hücre olduğunu düşündürmektedir (5,13-15).



Hristov M, ve ark. J. Cell. Mol. Med. 8 (4): 498-508, 2004 den alınmıştır.

Şekil 2.1. Endoteloyal hücrelerin farklılaşma şeması

Görüldüğü gibi dolaşan endoteloyal öncü hücrelerin tam fenotipik özellikleri hala tam açık değildir ve endoteloyal öncü hücrelerin bir alt grubu olan monositik hücreleri de içeren heterojenite gösterdiğinden tanımlamada çok dikkatli olunmalıdır (1,9,14). Çünkü endoteloyal yüzeyindeki belirleyiciler, endoteloyal hücrelerin olgunlaşması ile ya da aktive olması ile değişebilmektedir (6,16). Endotel hücrelerine özgü en sık kullanılan yüzey belirleyicilerinden birisi olan ve melanoma hücrelerinde tanımlanan CD146 (melanoma hücre-adhezyon molekülü) endotel hücrelerinden başka düz kas hücreleri, trofoblastlar, veya aktive T-hücrelerinde bulunabilir (16,17,18). Diğer endotel yüzey belirleyicisi olan CD144 (vasküler endoteloyal kadherin) ise fetal karaciğer hematopoietik doku hücrelerinde de tespit edilebilmişlerdir (19). Bu iki endotel yüzey belirleyicisinin endoteloyal hücrelerin tanınması amacı ile analiz yöntemlerinde birlikte kullanıldığı çalışmaya rastlanılmamıştır. Endotel hücrelerin olgunlaşma süreci ve aktivasyonu için yapılacak yeni çalışmalarda bu iki yüzey belirleyicisinin birlikte kullanılması avantaj sağlayabilir (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1. Dolaşımdaki endotel hücrelerin tespit edilmesi ve sayılması için kullanılan yöntemlerin özellikleri.

Dolaşımdaki endotel hücreler	Mononükleer izolasyon/yıkama	Kapılama tekniği	Yüzey belirleyicileri	Yöntemle ilgili yeterli performans çalışmaları*
Rafii ve Lyden ve ark (62).	+	Lenfosit bölgesi	CD133, c-kit, CD34, VEGFR2	-
Dimmeler ve ark (31).	+	Lenfosit bölgesi	CD105, VE-Cadherin, CD31, vWF	-
Geoge ve ark (38).	+	Lenfosit bölgesi	S-endo-1 (CD146)	-
Mancuso ve ark (3).	+	Lenfosit bölgesi	CD106	-
Del Papa ve ark (95).	+	Lenfosit bölgesi	CD45, 34, CD146	-
Dulic-Silis ve ark (75).	-	Geniş kapılama	CD2, CD13, CD22, VEGFR2, CD133	-
Özdoğu ve ark (86).	-	Geniş kapılama	CD34, CD117,, CD144, CD146	+

*Performans çalışmalarından metod içi ve metodlar arası, tekrarlanabilirlik, yeniden üretilebilirlik ve linearite analizleri kastedilmektedir.

2.1.2. Dolaşan endotel hücrelerin mobilizasyon, ve salınma süreci

Birçok kök hücreler gibi endotel hücrelerin de orijini'nin kemik iliği hücreleri olduğu düşünülmektedir (20-22). Kemik iliği transplant çalışmalarında kemik iliği kaynaklı endotel hücrelerin fizyolojik ve patolojik durumlarda yeniden damar oluşumuna katıldıklarını göstermiştir (21,22). Benzer katılımın östrojen uyarısı ile ovulasyon induksiyonu sonrasında uterus endometriumunda fizyolojik yeniden damar oluşumu sırasında olduğu gözlenmiştir (23). Çalışmalar, egzersiz, yaralar ve travmalar sırasında hematopoietik plüripotent hücrelerin mobilize olduğunu göstermiştir (24,25). Bütün bu gözlemler kemik iliği kaynaklı endotel hücrelerin doku iskemisi olduğunda yeniden damar oluşumuna katılmak ve doku tamiri amacı ile kemik iliğinden kan dolaşımına geçebildiklerini (mobilize olduğunu) göstermektedir.

Granülosit-makrofaq uyarıcı faktörün ana öncü hücreleri (stem hücre) ve myeloid öncü hücreleri kemik iliğinden mobilize ettiğı iyi bilinmektedir (9,26). Son zamanlarda aynı zamanda endotel öncü hücre kinetiğı için de güçlü bir uyarıcı olduğı anlaşılmıştır (9,26).

Diğer büyüme faktörleri arasında vasküler endotelial büyüme faktörünün yeniden damar oluşumunu arttırdığı bilinmesinin yanısıra aynı zamanda endotelial hücreleri kemik iliğinden mobilize ettiğı de öğrenilmiştir (27). Benzer gözlemler granulosit koloni uyarıcı faktör, stroma kaynaklı faktör-1, eritropoietin, östrojen ve endojen hormonlar için yazılmıştır. Endotelial öncü hücrelerin kemik iliğinden mobilizasyonu çeşitli enzimler, büyüme faktörleri (eNOS, VEGF, G-CSF ve yüzey reseptörleri (VEGFR-2) tarafından düzenlenen karmaşık bir işlemdir (3,28). İlk basamak olarak membrana bağı Kit ligant'ın soluble Kit liganta dönüşümünü sağlayan matris metalloproteinase-9'un aktivasyonudur (29). Bu aktivasyon erken c-Kit pozitif (CD117) progenitor hücrelerin kemik iliğı stromal alanından kemik iliğı vasküler alanına mobilizasyonunu sağlar.

Mobilize olan endotelial öncü hücreleri kemik iliğinin vasküler zonundan dolaşıma salınır. Bu güne kadar dolaşan endotelial öncü hücrelerin *in vivo* olarak olgun ve tam olarak differansiye olmuş endotel hücreye ne zaman dönüştüğü ile ilgili yeterli bilgi yoktur.

Hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılan statinlerin endotelial hücrelerin biyoaktivitelerini arttırdığı bilinmektedir. Ancak son zamanlarda statinlerin en önemli fonksiyonlarından birisinin kemik iliğı kaynaklı endotel öncü hücreleri mobilize etmesi olduğı anlaşılmıştır (30,31). Anjiostatin ise kemik iliğı kaynaklı endotelial progenitor hücrelerin kinetiğini inhibe etmektedir. Bu yüzden tümör gelişmesini geriletteğı iddia edilmiştir (3,32).

2.1.3. Endotel hücre kültürleri

Endotelial hücreler, ficol dansite gradient yöntemi ile periferik kandan ayrılan mononükleer hücrelerden üretilebilirler (1,2,33). Bunun için, endotel hücre kültür ortamı içerisine, damar endoteli büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü, insüline benzer büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü, ve %5 fetal bovin serum ilave edildikten sonra 10^6 mononükleer hücre/cm² olacak şekilde fibronektin kaplı doku kültür flasklarına ekilmesi gerekir. Kültürden 4 gün sonra flasklara yapışmayan hücreler PBS ile yıkanarak uzaklaştırılır.

Yapışan hücrelerin endotel boyası ile boyanarak immun floresan mikroskop altında morfolojilerinin incelenmesi, daha sonra da yapışan hücrelerin kültür yüzeyinden ayrılarak akım sitometresinde incelenmesi sonrasında gelişen hücrelerin endotel hücreleri olduğu değerlendirilmelidir. Benzer şekilde izole edilmiş endotelyal öncü hücrelerin çoğunluğu 4-günlük kültürden sonra güçlü olarak monosit/makrofaj orjinli markerleri ifade eder. Sadece bu hücrelerin az bir alt grubu (yaklaşık %5) CD34, VE-cadherin ve E-selectin, gibi öncü hücre ve endotel yüzey belirleyicilerini ifade ederler. Bu yakın ilişki monosit ve endotelyal dizi hücrelerinin muhtemelen kemik iliğinde lokalize hemanjioblast olarak adlandırılan erken öncü hücreden ortak orjinli olduğunu düşündürmektedir (13-15).

Kültür periyodu sırasında birkaç hafta içinde bu hücreler olgun endotel hücrelerinin fenotip yüzey belirleyicilerini ifade etmeye başlarlar (4,34). Bu olgunlaşma süreci muhtemelen *in vivo* olarak kemik iliği kaynaklı öncü hücrelerin sistemik dolaşıma seyahati ile olur (35-38).

2.1.4. Damar hastalıklarında endotelyal hücrelerin rolü

Damar hastalıklarının oluşmasında endotel hücrelerinin önemli rol oynadıkları hayvan modellerinde ortaya konmuştur (39-41). Ancak, girişimsel metodlar ile insan patolojisinin araştırılmasının oldukça güç olduğu bilinmektedir. Damar yapısının sağlıklı bir şekilde kalabilmesi, endotel yapısının ve işlevlerinin normal olması ile mümkündür. Temel olarak kan ve dokular arasında bulunan endotelyal yapı mikroçevre koşullarından etkilenen oldukça dinamik bir hücre topluluğudur. Sitokinler, büyüme faktörleri, infeksiyon ajanları, oksidatif stresler, lipoproteinler, apoptotik uyarılara maruz kalan, ve kanın şekilli elemanları ile temas eden endotel hücreleri bu uyarılara cevap verme durumunda kalmaktadır (3,27). Uzun süre ve aşırı uyarılmış endotel hücreleri yapısal ve işlevsel düzen geri dönüşümsüz olarak bozulmakta apoptoz ve nekroz gelişmektedir (42). Çok sayıda hayvan çalışmaları olmakla birlikte insanların damar hastalıklarında *in-vivo* olarak endotelyal hücrelerin etkilendiğinin gösterilmesi zor olmuştur.

2.1.5. Damar hasarlanmalarında dolaşımdaki endotelyal hücreler

Bazı hayvan ve insan çalışmaları myokard infarktüsünden sonra endotelyal öncü hücrelerin kalbin işlevlerinin düzeltilmesinde tedavi edici etkisini göstermiştir. (43-53). İlave

olarak, kemik iliği kaynaklı anjioblastların transplantasyonunun infarktüstün sonra kardiyomyositleri apoptosisten korunmasında ve negatif yönde olan kalp adelesi yeniden şekillenmesinin azaltılmasında rol oynadığı rapor edilmiştir (54). Endotelyal öncü hücrelerin alt gruplarını içeren kemik iliği kaynaklı mononükleer hücreleri, insanda tedavi amaçlı yeniden damar oluşturulmasının gerçekleştirilebilmesi için yeni bir tedavi yaklaşımı oluşturur. Bu tedavi yaklaşımı, ilk defa kronik iskemik bacak problemi olan hastalarda mononükleer hücrelerin transplantasyonundan sonra 6 aylık takip süresinde iskemik bacağın fonksiyonlarında belirgin düzelme ile gösterilmiştir (55). Daha sonraki klinik çalışmalarda, otolog kemik iliği kaynaklı hücrelerin veya izole edilmiş ve *ex vivo* çoğaltılmış otolog endotelyal öncü hücrelerin insanda infarkt oluşmuş kalp adelesinin parsiyel tamir kapasitesi ile desteklenmiştir (56,57). Bir diğer uygulama ise, endotelyal öncü hücrelerin iskemik/zararlanmış bölge yakınına lokal uygulamadır (intra-koroner veya intra myokardial v.b.). İnfüze edilen öncü hücrelerin kalp fonksiyonunu düzeltmelerindeki mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılammıştır. Muhtemelen, gözlenen pozitif etki, infüze edilen öncü hücrelerin *in vivo* olarak kalp kası hücrelerine farklılaşmalarından çok iskemik myokardium bölgesinde yeniden damarsal yapıların oluşması ile ilgilidir (57,58). Diğer bir uygulama alanlarından birisi damar greftların endotelyal hücreler ile örtülmesi, diğeri ise balon kateter uygulamalarından sonra oluşan zedelenmenin yeniden endotelizasyonun sağlanmasıdır (40,51). İlave olarak, hücre tabanlı gen tedavi stratejileri uygulanabilir. Örneğin, çok yakın zamanda tavşanlarda genetik müdahale ile aşırı miktarda eNOS ifade ettirilen otolog endotelyal öncü hücrelerin zararlanmış damar içine transplante edilmesi ile endotel tamirinin belirgin şekilde sağlandığı ve fonksiyonlarının düzeldiği, böylece tromboz ve neointimal hiperplazinin inhibisyonu sağlandığı gösterilmiştir (3,52).

İskemik dokunun yeniden damar oluşumuna endotelyal öncü hücrelerin belirgin şekilde katılırlar, fakat bu dokuların yenilenmesi olayında hücresele ve/veya parakrin mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. Endotelyal öncü hücrelerin, zedelenmiş endoteli yenileme işleminde muhtemelen ölen endotel hücrelerinin apoptotik kalıntıları sinyal olarak rol oynar (27,42,53). Endotelyal öncü hücrelerin fonksiyonlarının anlaşılmasında, bu hücrelerin farklılaşması, yaşam süresi, yerleşme ve dokuya dağılımının anlaşılması için daha fazla deneysel çalışmalara gereklilik vardır. Dokuların yenilenmesi için damar oluşturan hücrelerin hücresele tedavide kullanılmasının muhtemel ve istenmeyen yan etkilerinin dikkate alınması gereklidir.

2.1.6. Dolaşımdaki endotel hücrelerinin şekli ve sayısını etkileyen faktörler

Endotel hücreleri arasındaki reseptörler, matriks bağlı proteinler, endotel hücre komponentleri, yeni damar oluşumunu uyaran ya da baskılayan büyüme faktörleri, mekanik zararlanmalar, ve apoptotik proteinler endotel hücrelerin birbirinden ayrılması ve dolaşıma dökülmesi sürecinde önemli rol oynarlar (3,59,60). Vitronektin ve fibronektin gibi matriks proteinlerinin yapışmalarına izin veren integrin, ve aynı zamanda kadherin ailesinden VE-cadherin endotelyal örgünün tek tabaka halinde kalmasını kontrol eder (3,27). Bazı virus infeksiyonlarının, (sitomegalovirus ve herpes virus tip 2 gibi) endotel hücrelerinde hasarlanma sonucunda oluşan tamiri güçleştirdiği, aynı zamanda nötrofillerin endotel hücrelerine yapışarak proteazların salınımına yol açtığı ve bunun da endotellerde ayrılmaya ve dökülmeye yol açtığı bildirilmektedir (61). Yani virus ile infekte endotellerin inflamatuvar hücreleri davet ettiği anlaşılmaktadır. Apoptosis'in ise her zaman endotel hücrelerin dökülmesinden sorumlu olmadığı, koroner arter hastalığında ve orak hücre anemisinde düşük derecede apoptosis olabileceği, VEGFR'nin apoptosis inhibisyonunda rol oynayabileceği bilinmektedir (23). Endotelyal öncü hücrelerin sayı ve fonksiyonel karakterleri (koloni oluşturması, adhesyon potansiyelleri v.b.) iskemik kalp hastalıkları için tanı aracı ve/veya prognostik parametre olarak kullanılabilir (3,53,62,63). Örneğin dolaşımdaki endotelyal öncü hücrelerin azalmış sayı ve adhezyon bozukluğu stent restenozu ile ilişkili bulunmuştur (51). Endotelyal öncü hücrelerin klinik uygulaması iki yönde olabilir; iskemik dokuların yeni damar oluşumları veya zararlanmış endotelin (balon anjioplasti v.b.) ve damar greftlerinin endotelizasyonu. Bununla birlikte olog-postnatal endotelyal öncü hücrelerin tedavi amaçlı kullanılmasında en önemli sınırlayıcı faktör dolaşımda yeterli olmayan sayısıdır. Bu düşük sayının iskemik koroner kalp hastalığında daha da düşük olması bir risk faktörüdür (3,64-66). Bu problemin aşılması üç yaklaşım ile mümkün olabilir: (i) değişik genlerle *ex vivo* transfeksiyon (3,67), (ii) endotelyal öncü hücrelerin *in vivo* mobilizasyonu (66), (iii) ön seleksiyon yapılmadan olog kemik iliği hücre süspansiyonunun lokal infüzyonu (46,67). Günümüzdeki çalışmalar VEGF geni kodlayan adenovirüs ile *ex vivo* transfeksiyonundan sonra izole edilen insan endotelyal öncü hücrelerin sayısında belirgin artış göstermiştir (3,68). Hedef iskemik dokuya yeni damar oluşumunu arttıran kemokinler ile birlikte gen transferi yapılması tedavi amaçlı damar oluşturma işlemi için diğer bir yaklaşım olabilir. Ayrıca, intramusküler veya intramyokardial VEGF gen transferi, ekstremitte iskemisi veya girişimsel

işleme uygun olmayan koroner hastalığı olan hastalarda endotelyal öncü hücreleri mobilize ettiği gösterilmiştir (3,68). Bu işlem, sadece dolaşımdaki endotelyal öncü hücrelerin sayısını artırmaz, fakat aynı zamanda hücrelerin zararlanmış alana yerleşmesini (homing) düzenleyen endotelyal öncü hücrelerin yüzeyindeki adezyon moleküllerinin ifadesini de artırır. (3,68).

Sonuçta vasküler yapılardan dolaşıma dökülen bu hücreler dolaşan endotel hücreleri olarak tespit edilebilir. Normal insanlarda da dolaşımda endotel hücrelerinin bulunduğu düşünülür ise, endotel dökülmesinin sadece patolojik durumları yansıtmadığı anlaşılmaktadır. Bu hücrelerin bir kısmının öncü hücreler olduğu ve proliferasyon ve plastisite özelliklerinin var olduğu düşünülür ise, bu hücrelerin sadece damarsal yapılardan dökülen hücreler olmadığı bir kısmının kemik iliği kaynaklı hücrelerden dolaşıma mobilize olduğu anlaşılmaktadır.

2.1.7. Dolaşımdaki endotelyal hücreler ile ilgili öne sürülen hipotezler

Akut koroner sendromları, orak hücre anemisi, trombotik trombositopenik purpura gibi hastalıklarda yüksek miktarda dolaşan endotel hücreleri olduğunun tespit edilmesi, bu hücrelerin yüksek trombojenik potansiyeli olabileceğine işaret edebilir (69-73).

Stabil durumda veya ağırlı krizde olan orak hücre anemili olgularda normal kişilere göre daha yüksek dolaşan endotel hücrelerinin bulunması, bu hücrelerin akut krizleri önceden belirleyen bir parametre olabileceği fikrini ortaya koyabilir (70).

Riketsiyal infeksiyonlarda komplikasyon gelişmemiş ise dolaşan endotel hücrelerin sayısının düşük olduğu, yüksek olduğu durumlarda ise hastalığın daha kötü gidişli olduğu tespit edilmiştir. Bu hastalıkta yüksek endotel hücre düzeylerinin hastalığın öldürücü formunun söz konusu olduğuna önceden işaret edebileceği öne sürülmüştür (74).

Sitomegalovirus infeksiyonlarında dolaşan endotelyal hücrelerin sayısının >10 mL olduğu durumlarda yüksek viremi ve belirgin klinik sendrom anlamına geldiği ve dolaşan endotelyal hücrelerin analizinin sitomegalovirüs organ tutulumuna işaret edebileceğini göstermektedir (61).

Behçet hastalığında da beyin tutulumu olan olgularda dolaşan endotel hücre sayısının tedavi ile birlikte azaldığı tespit edilmiştir (75).

Dolaşan endotelial hücreler ile kronik böbrek hastalığı ve dolaşım problemleri arasında korelasyon olduğu ve ileri evre kronik böbrek yetmezliğinde bu hücrelerin sayısında azalma olduğu rapor edilmiştir (76).

Kalp ve damar sistemi hastalıklarında koloni uyarıcı faktör kullanılması, statin kullanılması, ya da eksersiz'in dolaşan endotel hücreleri sayısını arttırdığı ve bu hücrelerin sayısının tespit edilmesinin tedavi etkinliğinin takibi yönünden yararlı olabileceği bildirilmiştir (71,73).

İnflamatuvar barsak hastalığında dolaşan endotel hücrelerin analizi'nin intestinal hasarın kemik iliği kaynaklı hücreler tarafından onarılmasını yansıtabileceği fikri oluşmuştur (75).

Farelerde deneysel olarak akciğer zararlanması oluşturulduğunda endotelial öncü hücrelerin kemik iliğinden mobilize olduğu gösterilmiştir. Akut akciğer zararlanması olan hastalarda yüksek miktarda endotel hücrelerinin dolaşımında bulunması, bu hücrelerin zararlanmış akciğerin tamirinde görev aldıklarını düşündürmüştür (77-79).

Yaşlanma ile ilişkili yeniden damar oluşumunun zayıflaması dolaşan endotel hücre sayısı ile ilişkili bulunmuştur (65).

Endotel progenitor hücrelerin gen tedavileri ile genetik yapılarına müdahale edilerek daha çok anjiogenetik faktörler ifade etmesini sağlamak bioaktivitesini kontrol etmek ve daha uzun yaşamalarını sağlamak mümkün olabilecektir (3,68).

2.1.8. Hastalıkların tanı ve tedavisinde dolaşımdaki endotelial hücrelerin klinik kullanımı

İskemik dokularda *ex vivo* ortamlarda oluşturulmuş endotelial öncü hücrelerin iskemik dokuda yeniden damar oluşturduğu saptanmıştır. Bu hücrelerin sadece yeniden damar oluşumunu arttırmadığı aynı zamanda önemli biyolojik fonksiyonları da yeniden kazandırdığı not edilmiştir (49,53,62,67). Kontrol olgulara göre bacak nekrozunu ve oto amputasyonu % 50 azaltmıştır (55). Son zamanlarda üç amaç için endotelial öncü hücre transplantasyonu yapılmaktadır. Birincisi, arteriosklerosis obliterans veya Burger hastalığındaki bacak

iskemisinin düzeltilmesi içindir (44,55). İkincisi, myokard infarktüsü sonrasında iskeminin düzeltilmesi amacı ile kullanılmaktadır (45-47,53,54,56,67). Üçüncüsü ise damar greftlerinin biyolojik uyumunun kolaylaştırılması amacı ile yapılmaktadır (3,51,54). Kocher ve arkadaşları intravenöz uygulanan CD 34 mononükleer hücre infüzyonu ile sol ventrikül fonksiyonlarında iyileştirme sağlanabildiği ve kardiyomyosit apoptosisinde inhibisyon yapılabildiğini göstermiştir (54). Çeşitli deneysel çalışmalar otolog kemik iliği hücrelerinin bacak iskemi ve myokard iskemi modelinde iskemik dokuda yeniden damar oluşumunu arttırdıkları ve bunun esas olarak anjiogenik büyüme faktörler aracılığı ile oluştuğu not edilmiştir (53-56). Özdoğu ve arkadaşları orak hücre hastalığı olan ve otomatik alyuvar değişimine dirençli bacak ülserleri gelişen iki olguda, doku iskemisi'nin düzeltilmesi amacı ile bölgeye enjekte ettikleri kemik iliği kaynaklı mononükleer hücreler ile klinik düzelmeye sağladıklarını rapor etmiştir (Tablo 2.2.) (80,81). Bütün bu çalışmalar endotelial öncü hücrelerin periferik ve koroner arter hastalıklarının tedavisinde kullanılabileceğini desteklemektedir.

Tablo 2.2. Klinikte yayınlanmış, vasküler tedavi amaçlı otolog kök hücre uygulamaları

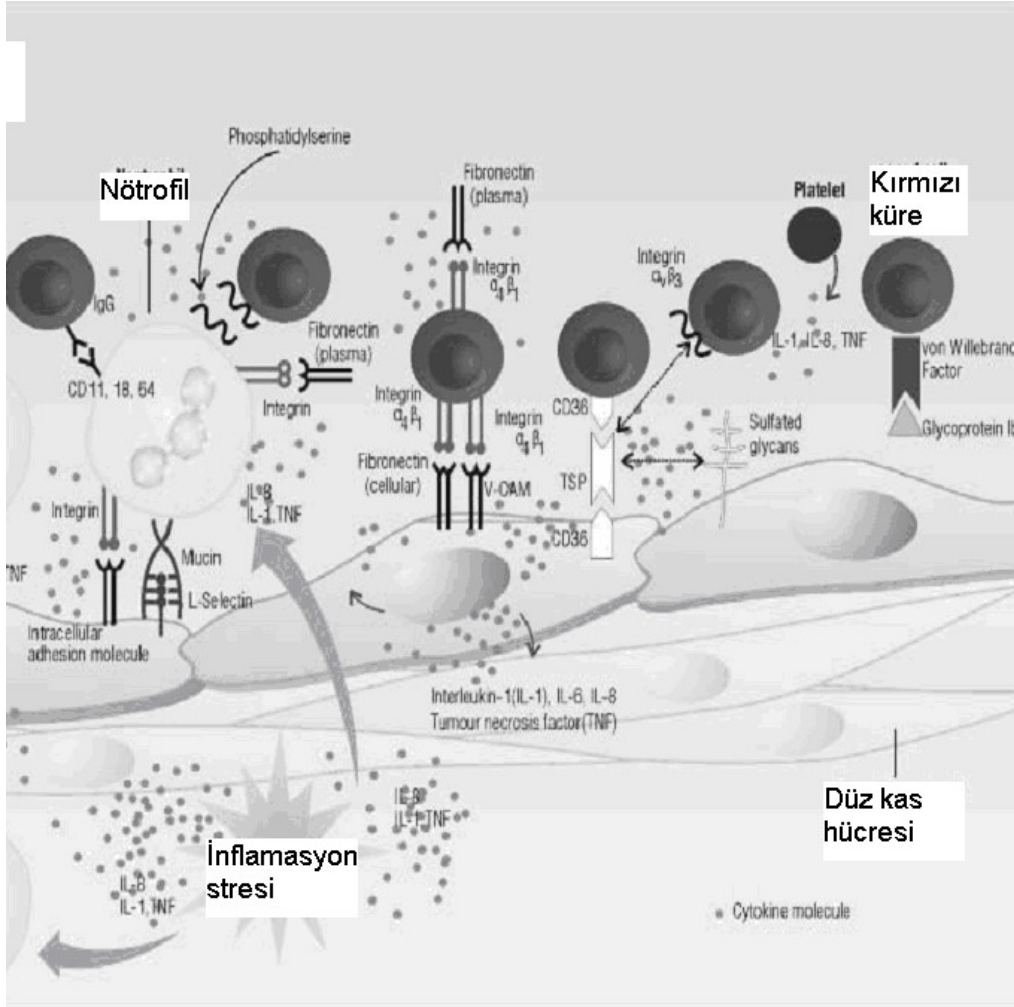
Çalışma/Araştırmacı	Çalışma dizaynı	Patoloji	Hastalar	Hücreler	İnjesiyon tipi	Sonuçlar
TACT			n=45	KİMH	İntramusküler,	Kol-dirsek basıncı↑yürütme
Tateishi-Yuyama ve ark	randomize kontrollü	Bacak iskemisi	n=20	KİMH	İntramusküler, gastroknemius	mesafesi↑ Tk O ₂ pressure↑
Lancet, 2002			n=25	SF		KİMH > PBMH
Strauer ve ark		akut Mİ	n=10	PBMH	intrakoroner	EF↑duvar hareketleri↑ perfusion↑
TOPCARE-AMI		akut Mİ	n=11	PBMH	intrakoroner	EF↑duvar hareketleri↑ perfusion↑, CFR↑
Assmus ve ark			n=9	EÖH		KİMH =EÖH
Circulation, 2002						
Stamm ve ark		Mİ sonrası	n=6	KİMH, AC133 ⁺	Myokart içi	perfüzyon↑
Lancet, 2003						
		<3 ay			KABC esnasında	(KABC sahası olmayan)
MAGIC	randomize kontrollü	akut MI	n=10	G-CSF ile mobilize PBMH kontrol	intrakoroner over-the-wire	EF↑,perfüzyon↑ stent restenozu↑
Kang ve ark.			n=10			
Lancet, 2004			n=7			
BOOST	randomize kontrollü çift kör	akut MI	n=30	PBMH	intrakoroner	MR:EF↑ Duvar hareketi↑
Wollert ve ark.			n=30			
Lancet, 2004						
Ozdogu ve ark.	Olgu sunumu	Orak hücre hastalığı, bacak yarası	n=2	KİMH	İntramusküler, gastroknemius	Yara iyileşmesi
Cytherapy, 2005, Kök hücre Kongresi, Trabzon, Türkiye, 2006						

PBMH: Periferik kan mononükleer hücreler, KİMH: Kemik iliği mononükleer hücreleri, EÖH: Endotelial öncü hücreler, G-CSF: Granülosit koloni uyarıcı faktör, KABC: Koroner arter by-pass cerrahisi, EF: Ejeksiyon fraksiyonu, Mİ: Myokard infarktüsü, Tk: Transkütanöz, SF: Serum fizyolojik.

2.1.9. Orak hücre hastalığında dolaşımdaki endotelial hücreler

Orak hücre hastalığı, kalıtsal geçişli bir hemoglobin hastalığıdır. Orak hücre sendromu, anormal bir hemoglobin olan hemoglobin S'in mevcut olduğu bir grup hastalığı tanımlamaktadır. Orak hücre hastalığı ise hemoglobin S için bir homozigotluk durumu olduğu ve esnekliğini yitirmiş eritrositlerin (orak şeklinde) oluştuğu, kansızlığın eşlik ettiği ciddi bir klinik tabloyu işaret etmektedir. Hemoglobinin beta zincirinde altıncı amino asit pozisyonunda, glutamik asit yerine valin'in geçmesi ile hemoglobin S oluşmaktadır. Orak hücre hastalığı, kronik hemolizler, sık infeksiyonlar, ve sıklıkla ağrılı krizlere ve organ hasarlarına yol açan küçük damarlarda tekrarlayan tıkanıklıkların oluşması (vasookluzyon) ile karakterize bir hastalıktır (69,82). Ağrılı krizler arasındaki zaman aralığına stabil dönem (steady state) denir. Çalışmalar, orak hücre hastalığında alyuvarların damar duvarındaki endotel hücrelere yapışarak vasooklusif krizlerin başlatıldığını göstermektedir (69,82). Hemoglobin S içeren alyuvarların küçük damarlar içerisinde geçerken yavaşlamaları sonucunda retikülosit ve genç eritroid hücrelerin damar duvarına anormal bir şekilde yapışmaları, alyuvarların damar içerisinde geçişlerini daha da yavaşlatır. Bu anormal yapışmaların oluşmasını sağlayan mekanizmalarda kırmızı kan hücrelerin membranlarındaki integrin alfa4beta1, glikoprotein IV (CD36) gibi moleküller, endotel membranındaki damar hücresi adhesive molekül-1, CD36, fibronektin ve bazı plazma faktörleri (örneğin sitokinler) rol oynarlar (27,69,82). Orak hücre hastalığında hem kırmızı küreler hemde endotelial hücreler yüzeylerinde CD36 ifade ederler. Bu molekül sitokinleri kontrol eden trombospondinlerin reseptörüdür. Aynı zamanda kırmızı küreler ile endotel arasında bir köprü görevini üstlenirler (27). Von Willebrant faktör de anormal yapışma olayında görev alır. Kronik endotelial aktivasyon ve zararlanma ve artmış inflamatuvar sitokinler (IL-1, IL-6, IL-8, TNF) sonucunda mikro infarktüsler ortaya çıkar (27). Bu sitokinler endotelial hücreleri daha da aktive eder ve orak hücrelere, nötrofillerin, ve plateletleri yapışmasını artırır (Şekil 2.2) (27,69,83). Kriz ve stabil durum arasındaki denge kırılındır ve endotel hücrelerin aktivasyonunu ya da kırmızı kürelerin endotele yapışmalarını etkileyen her olay krizi davet eder. Damar endotel hücresi tarafından stabil durumdaki orak hücre anemisinde salgılanan endotelin-1, kriz ve endotel zararlanması olduğunda artarak inflamatuvar bir sitokin olan IL-6'nın sentezini artırır ve endotel apoptosisini inhibe eder (27). Ortamda bulunan IL-1, ve TNF ise endotel apoptosisini artırır (27). Slove ve arkadaşları, mikrovasküler orijinli aktive olmuş endotelial hücrelerin orak hücre anemili olguların dolaşımlarında arttığını, bu hücrelerin % 34'ünün ise ölü hücreler olduğunu rapor etmiştir (84). Vasküler endotelial growth faktör ve endotelin'in endotel apoptosisini engelleyerek endotel yapısını korumaya çalıştığı anlaşılmaktadır (27).

Orak hücre hastalığında endotelial aktivasyon'un bu hastalığa bağlı klinik tabloların ortaya çıkmasında önemli rol oynadığı anlaşılmaktadır (27,69). Orak hücre hastalığı endotelial zararlanmanın ve endotelial döngü (turn-over)'nün en belirgin olduğu vasküler hastalık olarak tanımlanabilir. Bu yüzden orak hücre hastalığında endotelial hücrelerin yaşam süreleri, orijini, yüzey belirleyicileri ve dinamiği merak konusu olmuştur.



Makis AC ve ark. Ann Hematol, 79, 407-413, 2000. den alınmıştır.

Şekil 2.2. Orak hücre hastalığında endotelial aktivasyon şeması

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma grubu ve örnek toplama

Orak hücre hastalığı olan 44 hasta (18 kadın ve 26 erkek; yaş aralığı, 16-45 yaş) ve 20 sağlıklı gönüllü (11 kadın ve 9 erkek; yaş aralığı, 20-27 yaş) çalışmaya katılmayı kabul ettiler. Hasta grubu seçilmiş bir gruptu. Çalışmaya katılan hastalar en az 6 aydan beri takipte olan, fiziksel durumları veya ağrı sıklığı gibi hastalığın seyri ile ilgili bilgilerin kayıtlı olduğu hastaları içermektedir. Bu hastalar ile ilgili klinik tanımlamalar aşağıdaki gibiydi: Homozigot orak hücre hastalığı yüksek performanslı likid kromatografisi yöntemi ile yapılan hemoglobin elektroforezine göre tanımlandı (Bio-Rad Laboratories, Inc, Irvine, California, USA). Küçük damar tıkanmaları ve doku iskemisi sonucunda tipik olarak kostalara, vertebralara, kol ve bacaklara yayılan ağrılar olması ve analjezik ilaç uygulamaları ile ağrının kaybolması ağrılı kriz olarak tanımlandı. Kan örnekleri alınmadan önceki 30 gün içerisinde ağrılı kriz ve başka bir akut klinik olay olmaması stabil durum (steady state) olarak tanımlandı. Krizin düzelmesi ise ağrılı durumun kaybolması, hastanın kliniğinin stabilleşmesi olarak tanımlandı. İki hastada inme, 1 hastada akut görme kaybı, 1 hastada grand mal konvülzyon Amerikan Nöroloji Birliği kriterlerine göre akut nörolojik olay olarak tanımlandı (85). Hepatik nekroz, ilgili biyokimyasal bulgulara göre tanımlandı. Hidroksiüre kullanan hastalar, hemoglobin F değerlerinde tedavi öncesine göre en az %10'luk artış saptandığı için, en az 6 aydan beri tedavisine devam edilen hastalardı. Sağlıklı gönüllü (kontrol) grubu; evlilik işlemleri ile ilişkili ya da tarama amaçlı olarak yapılan tam kan sayımları ve hemoglobin elektroforezleri normal olarak değerlendirilen ve klinik olarak herhangi bir hastalık bulgusu olmayan olgulardan oluşturuldu.

3.2. Çalışma protokolü

Hasta grubu 2 alt gruba ayrıldılar: ağrılı krizi olan orak hücre anemili hastalar (8 kadın ve 10 erkek) ve stabil durumda olan orak hücre anemili hastalar (10 kadın ve 16 erkek). Hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri Tablo 3.1-3.4. de özetlendi. Çalışmaya giren her hasta ve sağlıklı gönüllüden periferik kanda dolaşan endotelial hücrelerin değerlendirilmesi amacı ile 21-gauge iğne ile 5mL periferik kan örneği alındı ve EDTA içeren tüplere konuldu. Orak hücre hastalarında elde edilen dolaşımdaki endotelial hücre sayılarının, bazı klinik (yaş, cins, ağrılı kriz sayısı, bacak yaraları, hepatik nekroz, akut nörolojik olay, avasküler kemik nekrozu, hidroksiüre kullanımı) ve laboratuvar özellikleri (stabil durumdaki hemoglobin,

mutlak nötrofil sayısı, hemoglobin S konsantrasyonu) ile ilişkisi araştırıldı. Kriz döneminde bulunan yaşları 19-45 olan 1'i kadın toplam 3 hastanın dolaşımdaki endotelial hücreleri kriz sırasında, 24 saat sonra ve kriz sonunda takip edildi. Kriz döneminde bulunan ve yaşları 19-28 arasında olan 1'i kadın 5 hastada ise, başlangıçta ve otomatik alyuvar değişimi ile krizleri sonlandıktan sonraki 5. günde dolaşımdaki endotelial hücreleri analiz edildi. Otomatik alyuvar değişimi Cobe spectra 7.0, Lakewood, Colo, USA cihazı ile yapıldı (82). Ayrıca, 42 yaşındaki kemik iliği toplanan bir erkek kardiyomyoplasti hastasının kemik iliği örneğinde, öncü endotelial hücreler yanında olgun endotelial hücrelerin bulunup bulunmadığının anlaşılması ve kemik iliğindeki endotelial hücrelerin immunofenotipik ve morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi amacı ile endotel hücre analizi yapıldı. Endotelial hücrelerin morfolojik karakteristikleri, immun fenotipik özellikleri, ve olgunlaşma süreçleri hakkında bilgi toplayabilmek amacı ile insan safen ven örneğinde ve insan göbek kordonu endotelial hücrelerinde de benzer çalışmalar yapılarak bulgular bir bütün olarak değerlendirildi. Orak hücre hastalığı olan hastalarda tüp testi ile olgunlaşma süreci ile ilgili değişiklikler izlendi.

Tablo 3.1. Çalışma sırasında ağırlı kriz gurubunda olan orak hücreli hastanın klinik özellikleri.

KOS: Yıllık ortalama kriz sayısı, ANO: Akut nörolojik olay, HN: Hepatik nekroz, KN: Kemik nekrozu, BY: Bacak yaraları, HK: Hidroksiüre kullanımı, K: Kadın, E: Erke

Hasta No	Yaş (Yıl)	Cins (K/E)	KOS (Atak/Yıl)	ANO (Evet/Hayır)	HN (Evet/Hayır)	KN (Evet/Hayır)	BY (Evet/Hayır)	HK (Evet/Hayır)
1	26	K	4	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Evet
2	25	K	3	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Evet
3	25	K	3	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Evet
4	24	E	4	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
5	26	E	4	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Evet
6	23	E	5	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Hayır
7	22	K	2	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Evet
8	38	K	4	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Hayır
9	22	E	5	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
10	24	E	4	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
11	22	K	2	Evet	Hayır	Hayır	Hayır	Evet
12	19	E	3	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Evet
13	26	K	2	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Hayır
14	22	E	2	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Hayır
15	21	E	4	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Hayır
16	26	K	3	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Hayır
17	22	E	3	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Hayır
18	23	E	3	Hayır	Hayır	Evet	Hayır	Hayır

Tablo 3.2. Çalışma sırasında stabil grupta olan orak hücreli hastanın klinik özellikleri

Hasta No	Yaş (Yıl)	Cins (K/E)	KOS (Atak/Yıl)	ANO (Evet/Hayır)	HN (Evet/Hayır)	KN (Evet/Hayır)	BY (Evet/Hayır)	HK (Evet/Hayır)
Hasta No	Yaş (Yıl)	Cins (K/E)	Hb (g/dL)	Hb S (%)	MNS (X 10 ⁹ /L)	Kr (mg/dL)	ALT (IU/L)	
1	24	K	3	7,03	Hayır	Hayır	Hayır	Evet
2	25	K	3	9,75	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
3	25	K	3	10,20	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
4	24	E	4	6,87	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
5	27	E	4	7,73	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
6	23	E	4	9,42	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
7	22	K	2	9,18	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
8	38	K	2	8,68	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
9	22	K	2	8,76	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
10	24	E	4	5,19	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
11	22	K	5	10,80	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
12	29	E	5	7,08	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
13	26	E	3	9,77	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
14	22	K	3	11,20	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
15	21	E	3	6,23	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
16	26	K	2	10,30	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
17	22	E	4	9,12	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
18	23	E	2	8,74	Hayır	Hayır	Evet	Hayır
19	25	E	2		Hayır	Hayır	Evet	Hayır
20	21	E	4		Hayır	Hayır	Evet	Hayır
21	20	K	3		Evet	Hayır	Hayır	Hayır
22	20	K	3		Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
23	26	E	2		Hayır	Hayır	Evet	Hayır
24	24	E	3		Hayır	Hayır	Evet	Hayır
25	28	E	3		Evet	Evet	Hayır	Hayır
26	21	E	3		Hayır	Hayır	Evet	Hayır

KOS: Yıllık ortalama kriz sayısı, ANO: Akut nörolojik olay, HN: Hepatik nekroz, KN: Kemik nekrozu, BY: Bacak yaraları, HK: Hidroksiüre kullanımı, K: Kadın, E: Erkek

Tablo 3.3. Çalışma sırasında ağırlı kriz gurubunda olan orak hücreli hastanın laboratuvar Özellikleri.

Hb:Hemoglobin, Hb S: Hemogloblin S konsantrasyonu, MNS: Mutlak n6trofil sayısı, Kr: Kreatinin, ALT; Alanin aminotransferaz,

* 6ncü endotelyal h6cre sayısı erken endotelyal h6creler ve geç endotelyal h6cre sayısının toplamı ile elde edilmiştir.

* Tabloda boş olarak g6sterilen alanlar, 6l6m yapılamayan değerleri yansıtılmaktadır.

Tablo 3.4. Çalışma sırasında stabil hasta grubunda olan orak h6creli hastanın laboratuvar 6zellikleri.

Hasta No	Yaş (Yıl)	Cins (K/E)	Hb (g/dL)	Hb S (%)	MNS (X 10 ⁹ /L)	Kr (mg/dL)	ALT (IU/L)
1	24	K	8,60	63,20	18,10	0,61	22,00
2	25	K	8,70	72,90	9,19	0,43	14,00
3	30	K	8,53	88,20	9,19	0,50	16,00
4	27	E	9,68	78,30	14,80	1,02	16,00
5	26	E	6,37	85,80	12,40	0,79	48,00
6	23	K	8,51	43,20	11,70	0,51	25,00
7	22	K	8,91	84,50	12,40	0,54	10,00
8	21	E	9,10	34,00	13,70		30,00
9	22	E	8,68	91,70	13,90	0,52	22,00
10	22	E	10,60		8,56	0,93	22,00
11	46	K	9,21		10,50	0,53	26,00
12	22	K	9,04	82,20	5,42	0,74	14,00
13	26	E	9,05		9,19	0,33	26,00
14	25	E	9,12	87,70	12,40	0,66	38,00
15	21	E	12,00	85,10	14,40	0,79	33,00
16	20	K	7,97	88,30	7,07	0,67	11,00
17	24	E	9,80	93,20	10,60		
18	23	E	6,12		16,00	1,32	
19	26	E	9,18	81,40	10,40		28,00
20	25	K	7,81		16,40	0,47	37,00
21	22	E	7,40	78,00	17,40	0,58	
22	20	K	8,13		9,27		
23	26	E	8,34		12,10	0,61	
24	24	E	7,17	89,80	16,20		32,00
25	28	E		84,50		0,34	11,00
26	21	E	8,41	89,40	12,80		63,00

Hb: Hemoglobin, Hb S: Hemoglobin S

konsantrasyonu, MNS: Mutlak nötrofil sayısı, Kr: Kreatinin, ALT; Alanın aminotransferaz,

* Öncü endotelial hücre sayısı erken endotelial hücreler ve geç endotelial hücre sayısının toplamı ile elde edilmiştir.

* Tabloda boş olarak gösterilen alanlar, ölçüm yapılamayan değerleri yansıtmaktadır.

Çalışmadan dışlama kriterleri: Hastaların ağırlı krizleri sırasında non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçlara, narkotik olmayan analjeziklere veya narkotik analjeziklere ihtiyacı oldu.

Aktif infeksiyonlar; çocuk yaş grubunda olan hastalar (16 yaş ve altı), akut koroner sendromlar; diabetes mellitus; sigara içme; çalışma sırasında mens durumu olması; statin kullanımı, estrogen kullanımı; ve belirgin kalp yetersizliği olmasıydı. Damar içi girişim yapılmış hastalar (stent, ya da santral ven kateteri konulmuş) da çalışmadan dışlandılar. Hastaların ağrılı krizleri sırasında non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçlara, narkotik olmayan analjeziklere veya narkotik analjeziklere ihtiyacı oldu.

Başkent Üniversitesi Yayın Kurulu araştırmayı onayladı. Çalışmaya katılan kişilerde gönüllü onay formu alındı.

3.3. Yöntem

3.3.1. Endotel hücrelerin immun tiplendirmesi

3.3.1.1. Antikorlar

Endotel hücrelerin tespit edebilmesi için bir monoklonal antikor paneli (anti-CD146, -CD144, -CD34, and -CD117) kullanıldı. Antikorlar fluorescein isothiocyanate (FITC-CD146, US Biological, Mass, USA), phycoerythrin (PE-CD144, Beckman Coulter, Marseille, France), Texas red (ECD-CD34, Beckman Coulter), ve cyanin-5 (PC-5-CD117, Beckman Coulter) ile konjuge edilmişti. Endotel hücrelerin monositlerden ayırt edilebilmesi için monosit yüzey belirleyicisi Texas red (ECD-CD14, Beckman Coulter) kullanıldı. Kemik iliği incelemesinde ilave olarak, phycoerythrin (PE-CD133, Biotec GmbH, Gladbach, Germany), cyanin-5 (PC-5-CD31, Beckman Coulter), fluorescein isothiocyanate (FITC-VEGFR-2, Pharmingen BD Biosciences, USA) monoklonal antikorları kullanıldı.. Akım sitometresinde endotel hücrelerin canlılığının test edilmesi amacı ile 7-aminoactinomycine D boyası (7-AAD, Beckman Coulter) kullanıldı.

3.3.1.2. Akım sitometresi,

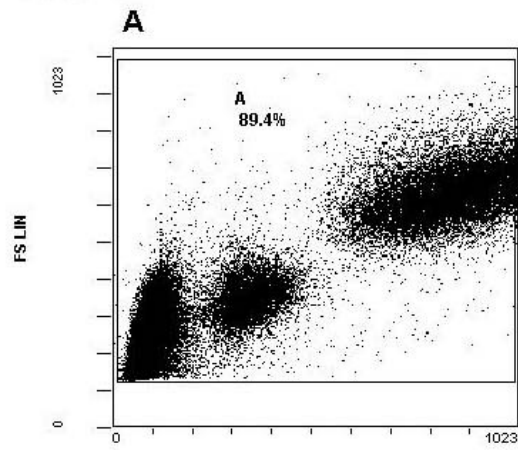
Periferden alınan tam kan örnekleri yıkamadan lizis etme (lyse-no-wash) işlemi ile hazırlandı ve akım sitometresinde değerlendirildi (Coulter Epics XL-MCL, Beckman Coulter, FL, USA). Endotel hücrelerin tanımlanması tespit edilmesi ve sayılabilmesi için çok basamaklı manuel teknik kullanıldı. Periferik kan örneğinde minimum 60,000 hücre sayılmasının değerlendirme için yeterli olabileceği düşünüldü. Endotel hücreler olduğu tespit edilen hücreler arasında CD146+CD144+CD34+CD117+ hücreler ‘erken öncü endotel

hücreler'' olarak tanımlandılar. Eğer hücreler CD146+CD144+CD34+CD117- ise ''geç öncü endotelyal hücreler'' olarak tanımlandılar. Son olarak, hücreler CD34-CD117-CD146+CD144+ ise ''olgun endotelyal hücreler'' olarak tanımlandılar. Akım sitometride veriler, EXPO 32 ADC software (Beckman Coulter, Miami, USA) ile analiz edildiler.

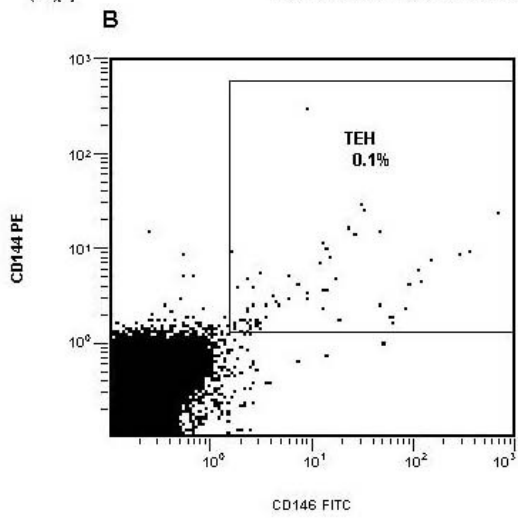
3.3.1.3. Kapılama ve endotelyal hücrelerin sayılması

Endotel hücrelerin sayımı için dört renkli akım sitometresi kullanıldı. Öncelikle tüm hücreler geniş bir kapılama ile FS/SS kapısında seçildiler, ve sonra CD146+144+ hücreler ikinci bir 2D grafik üzerinde gözlemlendiler. Parlak boyanma özelliği olan CD146+CD144+ hücrelerin bölgesi endotelyal hücreler olarak tanımlandı. Bir başka 2D grafik üzerinde iki öncü yüzey belirleyicisini tanımlamak için ilave kapılar alındı. Endotelyal hücreler önce CD34/SS (geç veya erken öncü endotelyal hücreler) tanıtıldılar, sonra CD117/SS' ye tanıtıldılar (erken progenitör hücreler) (86). Endotelyal hücrelerin büyüklük ve granülaritelerinin tanımlanması için bu hücreler aynı zamanda FS/SS grafiğinde incelendiler. Endotelyal hücrelerin yüzdesi hücre artıkları (debris) ve ölü hücreler dışlandıktan sonra grafikte işaret edilen tüm hücelere göre hesaplandı (86) (Şekil 3.1. A-G). Örnekte tespit edilen endotelyal hücrelerin mutlak sayısı; çekirdekli alyuvarları dışlamak için yapılan düzeltmeden sonra, endotelyal hücre yüzdesinin bir kan sayımı cihazı (Cell Dyne 3700, Abott Laboratories, Chicago, IL, USA) ile tespit edilen mutlak beyaz küre sayısı ile çarpımı sonucunda elde edildi.

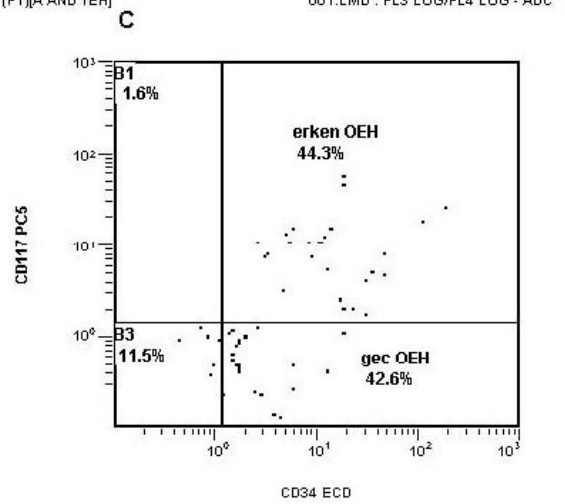
(F1)[Ungated] 001.LMD : SS LIN/FS LIN - ADC



(F1)[A] 001.LMD : FL1 LOG/FL2 LOG - ADC



SS LIN (F1)[A AND TEH] 001.LMD : FL3 LOG/FL4 LOG - ADC



Şekil 3.1. A-G. Akım sitometresinde endotelial hücrelerin tanınması için kapılama stratejisi. (A) Tüm hücreler geniş bir kapılama ile FS/SS kapısında seçildiler, ve sonra (B) izotopik kontroller kullanılarak CD146+144+ hücreler ikinci bir 2D grafik üzerinde gözlemlendiler (Endotelial hücreler). Bir başka 2D grafik üzerinde iki öncü yüzey belirleyicisini tanımlamak için ilave kapılar alındı. (C) Endotelial hücreler tekrar izotop kontroller kullanılarak CD34/SS (geç veya erken öncü endotelial hücreler) ve CD117/SS' ye tanıtıldılar (erken progenitor hücreler).

Kemik iliğini akım sitometride analiz ederken, tespit edilen endotelial hücrelerin ilkel yüzey belirleyicileri olan CD133, CD34, VEGFR-2, CD 117 (c-kit) moleküllerini ifade edip etmedikleri test edildi.

Periferik tam kandan yaptığımız analizlerde CD14+ hücrelerin CD144 ve CD146'yı taşıyıp taşımadıkları test edildi. Ayrıca CD34+ ve CD14- hücrelerde CD144 ve CD146 analiz edildi. Böylece endotelial hücre yüzey belirleyicisi taşıyan monosit ve makrofajlar ayırt edilmeye çalışıldı..Canlı olmayan hücreler, trombositler, debrisler, ve antikorlara yalancı bağlanmaları dışlamak için izotopik kontrol kullanıldı ve ardışık kapılamalar yapıldı. Canlı olmayan hücrelerin eş zamanlı anda tespit edilebilmeleri için her tüp içerisine 7-AAD konularak akım sitometresinde canlılık testi yapıldı.

3.3.2. Dolaşımdaki endotelial hücrelerin morfolojik karakteristikleri

Stabil durumda bulunan 20 orak hücre anemili olgudan elde edilen periferik kan örneklerinde CD34+ ve CD34- hücreler ayrıştırıldı. Ayırma işlemi bir MidiMACS (Miltenyi Biotec, GmbH, Bergisch gladbach, Germany) hücre ayırıcı sistemi cihaz kullanma talimatına uygun olarak gerçekleştirildi. Hücreler santrifüj edildikten sonra insan plasmasından elde edilen düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol, asetile-Dil kompleks (DilAc-LDL, Molecular Probes, Eugene, Ore, USA) ve *Ulex europaeus* den elde edilmiş lektin (EUA I, FITC labeled ulex-lectin, Sigma, St. Louis, Mo, USA) ile boyandı (1). Daha sonra hücreler bir immunofloresan mikroskop (Nikon Eclipse E 600, Tokyo, Japan) altında incelendi ve bir kamera (Nikon Coolpix 4500, Tokyo, Japan) aracılığı ile mikrofotografı çekildi. Pozitif boyanan hücreler endotelial hücreler olarak belirlendiler. Akım sitometresinde endotelial hücrelerin boyutları ve granülariteleri CD146/CD144 FS ve SS kapılarında analiz edilerek tespit edildi.

3.3.3. Endotelial hücre kültürü

Stabil durumda orak hücre hastalarının periferik kanlarından izole edilen CD34+ ve CD34- hücreler fibronektin (Horbor Bio-products, Norwood, USA) kaplı doku kültürü plaklarına (Horbor Bio-products, Norwood, USA) 37°C de 5% CO₂ ortamında EGM-2 kültür medyumuna içerisine ekildi. Hücreler 3-4 günde bir fibroblast kaynaklı doku faktörü, damar endoteli kaynaklı büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü, endotelyal kökenli büyüme faktörü, ve fetal bovin serumu içeren medyumlar ile beslendi. Ekildikten 14 gün sonra sitosantrifüj yapılarak hücreler endotel boyası ile boyandılar. Hücrelerin akım sitometresinde SS deki dağılımı gözlemlendi. Aynı zamanda immun floresan mikroskopta incelendiler.

İlave olarak insan göbek kordon kanı endotelyal hücreleri (HUVEC) hücre dizisinden (ECV304, American Type Culture Collection, Rockville, MD) elde edilen hücreler kültüre edildiler (16). Daha sonra akım sitometresinde ve immun floresan mikroskopta benzer şekilde incelendi.

3.3.4. Safen ven endotelyal hücre analizi

Orak hücre hastalığı olan hastaların periferik kan örneklerinde tespit edilen olgun endotelyal hücrelerin immun fenotipik özellikleri ile morfolojik özelliklerini safen venden elde edilen olgun endotel hücreler ile karşılaştırılması amacı ile safen ven endotel hücreleri incelendi. Bu amaç için, safen ven içerisine % 0,25 tripsin, 200 U/mL. kollagenaz, ve 100 U/mL. heparin karışımı injekte edildi (87). İnsan safen ven endotelyal hücrelerinden dilasyonlar yapılarak hazırlanan örneklerde endotelyal hücreler akım sitometresi ile analiz edildi. Analiz için dolaşan endotelyal hücreler için seçilen antikor paneli ve boyalar kullanıldı. Venöz endotelyal hücrelerin morfolojisi floresan mikroskop altında DilAc-LDL and ulex-lectin boyası kullanılarak değerlendirildi.

3.3.5. Kemik iliği endotelyal hücre analizi

Kemik iliğindeki endotelyal hücrelerin immunofenotipik ve morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi, ve kemik iliğinde öncü endotelyal hücreler yanında olgun endotelyal hücrelerin bulunup bulunmadığının değerlendirilmesi amacı ile her iki krusta iliaca'dan toplanan kemik iliği örneğinde akım sitometresi ile yukarıda tanımlanan metod ile endotelyal

hücreler analiz edildi. Kemik iliği endotelial hücrelerin morfolojisi floresan mikroskop altında DilAc-LDL and ulex-lectin boyası kullanılarak değerlendirildi.

3.3.6. Tüp testi

Stabil durumda olan orak hücre anemili olguların periferik kan örneklerinde akım sitometresi ile endotelial hücre analizleri yapıldı. Sonra her kan örneği 5-mL Falkon tüp içerisinde 37°C de ve 5% CO₂ ortamında 12 saat süre ile inkübe edildi, ve endotelial hücreler 12 saatlik inkübasyondan sonra yeniden analiz edildiler.

3.3.7. Dolaşımdaki endotelial hücre boyutu

Akım sitometrede tespit edilen endotelial hücrelerin boyutu, çapı 10 mikrometre olan bir standart solusyon kullanılarak analiz edildi. Melanoma hücre adhezyon molekülü (anti CD-144) bağlanma indeksi hesaplandı (CD144+ endotelial hücrelerin yüzdesi ile CD144+ endotelial hücrelerin ortalama floresan şiddeti'nin çarpımı ile elde edilmiştir). Çalışma gruplarının SS ve FS de X-median değerleri karşılaştırması yapıldı.

3.3.8. İstatistiksel analiz

Elde edilen değerlerin ortalama standart sapmaları ve genişlikleri hesaplandı. Klinik parametreler ile dolaşımdaki endotelial hücreler arasındaki ilişki multiple regresyon analizi ile, laboratuvar değerleri ile endotelial hücreler arasındaki ilişki ise Pearson korelasyon testi ile araştırıldı (1 değerinde bir korelasyon olması mükemmel korelasyonu gösterirken, 0 değeri zayıf bir ilişkiyi, negatif değerler ise kötü bir ilişkiyi göstermektedir).

Çalışma grupları arasında dolaşımdaki endotelial hücre sayıları arasındaki farklılığı analiz etmek için Mann-Whitney *U* testi kullanıldı. Hesaplamalar SPSS software (Statistical Package for the Social Sciences, version 11.5, SSPS Inc, Chicago, IL) ile yapıldı.

P değerinin < 0.05 olması istatistiksel yönden önemli olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Akım sitometri ve immün floresan mikroskopi inceleme sonuçları

Orak hücre hastalığı olan hastaların her iki grubunda (ağrılı kriz ve stabil dönem) akım sitometri ile tespit edilen dolaşımdaki toplam endotelial hücreler ve öncü endotelial hücreler (erken öncü endotelial hücreler, ve geç öncü endotelial hücreler) kontrol olgularına göre belirgin artmış olarak bulundu (P < 0.05, bütün karşılaştırmalar için). Ağrılı krizde olan hastaların dolaşımdaki toplam endotelial hücreleri ve öncü endotelial hücreler (erken öncü

endotelial hücreler, ve geç öncü endotelial hücreler) stabil dönemde olanlara göre belirgin artmış olarak bulundu ($P < 0.05$, bütün karşılaştırmalar için) (Tablo 4.1. ve Şekil 4.1). Ayrıca Periferik kandan izole edilen CD14+ hücrelerin CD144'ü hiç ifade etmediğini gördük.

Tablo 4.1. Dolaşımdaki endotelial hücrelerin sayılması

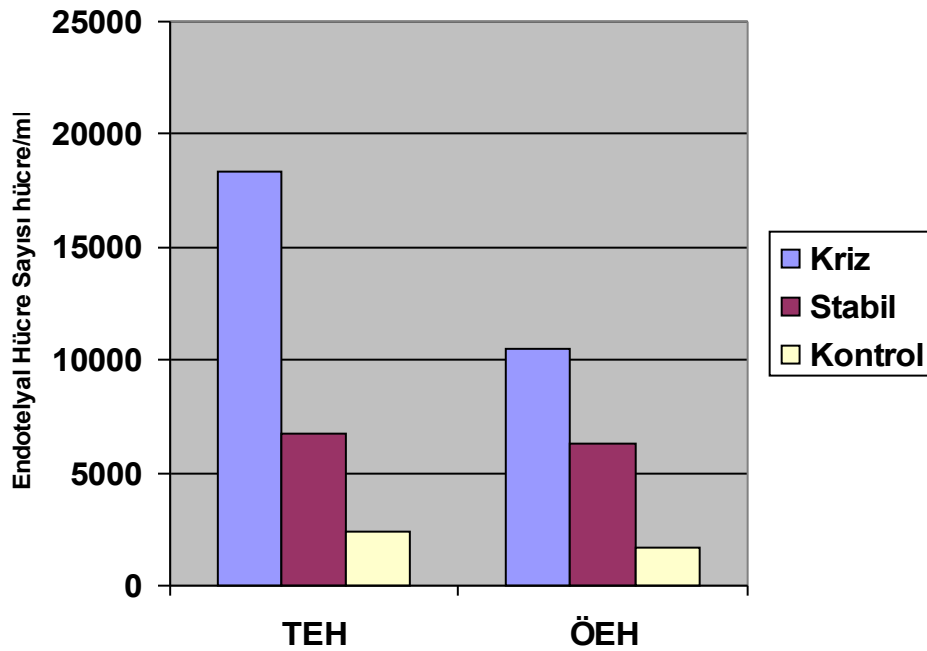
Hücre tipleri	Ağrılı kriz	Stabil durum	Kontrol
	Ortalama \pm SS (hücre/mL) (n=18)	Ortalama \pm SS (hücre/mL) (n=26)	Ortalama \pm SS (hücre/mL) (n=20)
TEH	18393.6 \pm 4642.7 ^a	6766.0 \pm 1077 ^b	2396.5 \pm 658.3 ^c
ÖEH	10470.3 \pm 2638.4 ^a	6320.2 \pm 1703.8 ^b	1663.2 \pm 1096.3 ^c

TEH: Toplam endotelial hücreler; ÖEH: Öncü endotelial hücreler, SS, standart sapma.

a; $P < 0.05$ ağrılı kriz grubundakiler ile stabil durumda olan hastalar arasında,

b; $P < 0.05$ stabil durumdaki hastalar ile kontroller arasında,

c; $P < 0.05$ ağrılı kriz grubundakiler ile kontroller arasında karşılaştırmayı ifade etmektedir.

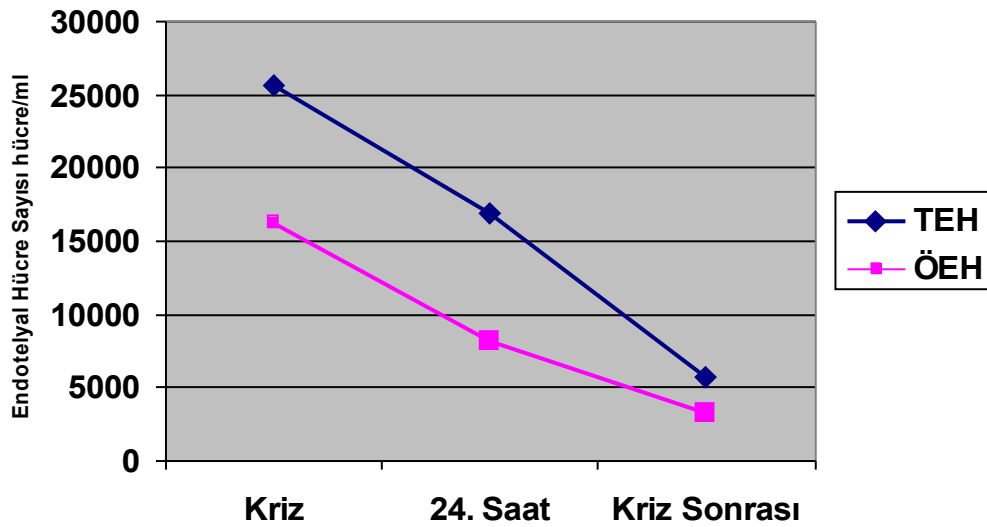


TEH: Toplam endotelial hücreler, ÖEH: Öncü endotelial hücreler

	TEH	ÖEH
Kriz Grubu	18393 (\pm4642)	10470 (\pm2638)
Stabil Grubu	6766 (\pm1077)	6320 (\pm1703)
Kontrol	2396 (\pm658)	1663 (\pm1096)

Şekil 4.1. Kriz döneminde ve stabil dönemde bulunan orak hücre hastalığında dolaşımdaki toplam endotelial hücreler ve öncü endotelial hücreler

Kriz döneminde bulunan orak hücre hastalarında başlangıç, 24 saat sonra ve krizleri sonlandıktan sonraki endotelial hücre analizleri sonucunda hastaların kliniği stabilleştikçe dolaşımdaki endotelial hücre sayılarında düşme olduğu saptandı (Şekil 4.2.).

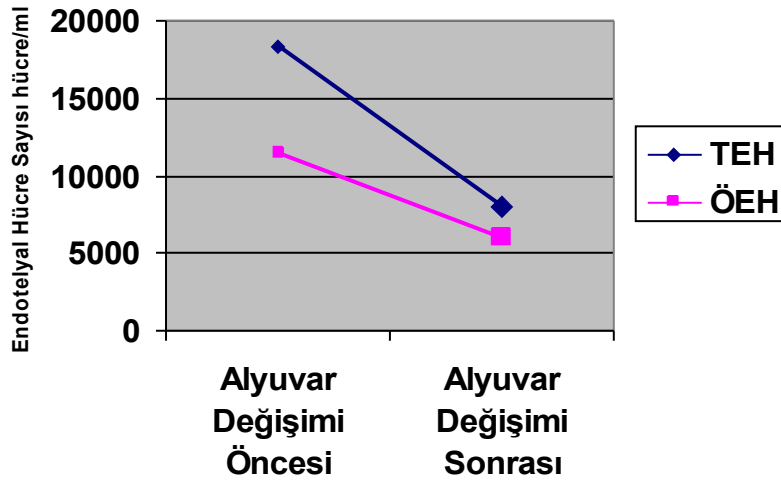


TEH: Toplam endotelial hücreler, ÖEH: Öncü endotelial hücreler

	TEH	ÖEH
Kriz Grubu	25609 (±7517)	16223 (±5143)
Kriz 24. Saat	16946 (±11836)	8230 (±5255)
Kriz Sonrası	5690 (±2479)	3310 (±2555)

Şekil 4.2. Kriz döneminde bulunan hastalarda dolaşımdaki endotelial hücre sayısının seyri. Hastaların kliniğinin stabilleşmesi ile dolaşımdaki endotelial hücre sayısında azalma eğilimi olduğu görülmektedir.

Krizleri otomatik alyuvar değişimi ile sonlandırılan hastalarda, kriz dönemindeki değerlere göre hastalar stabilleştikten sonra dolaşımdaki endotelial hücre sayısında azalma eğilimi olduğu görülmektedir (Şekil 4.3.).



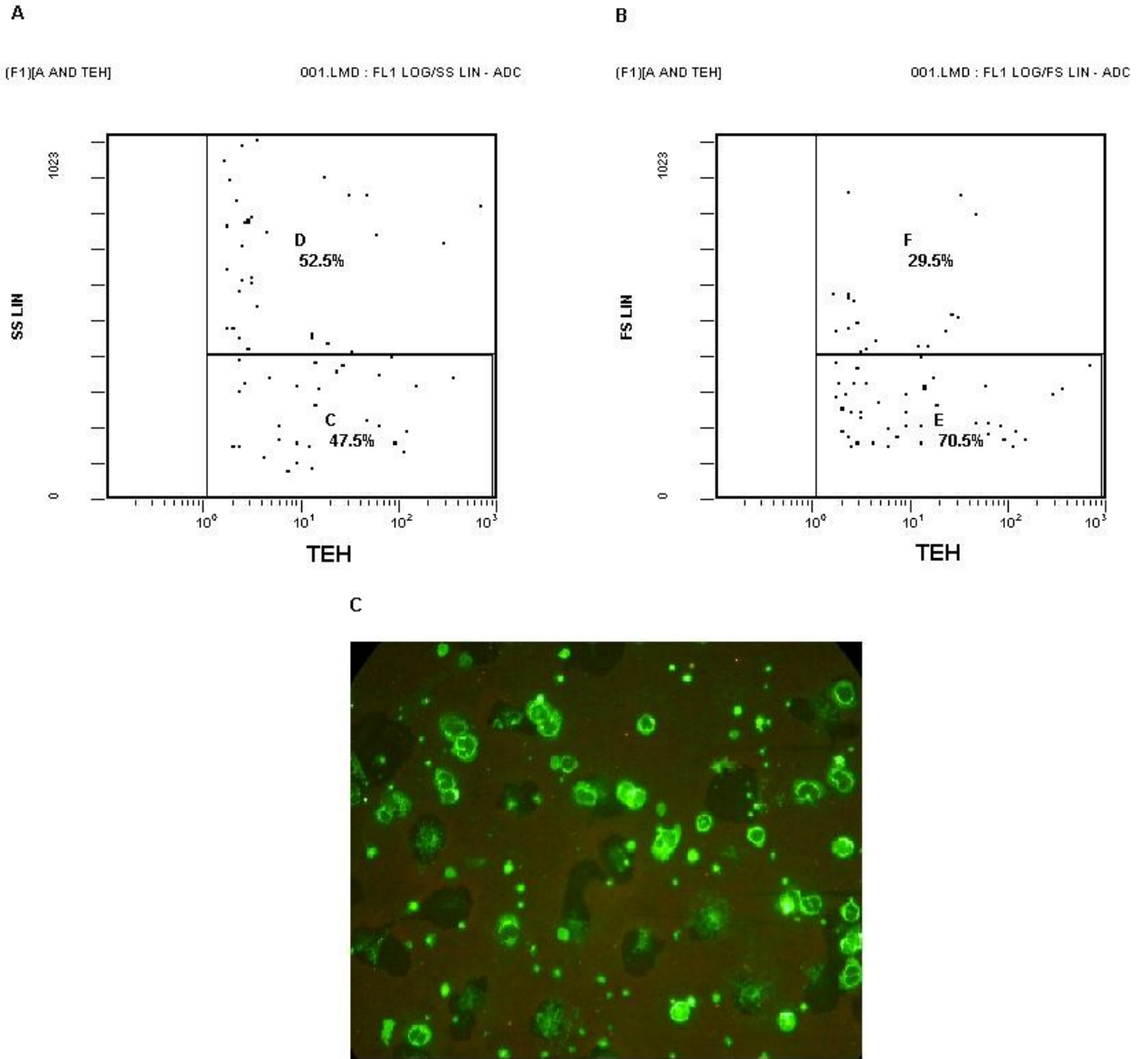
TEH: Toplam endotelial hücreler, ÖEH: Öncü endotelial hücreler

	TEH	ÖEH
Kriz Grubu	18393 (±4642)	10470 (±2638)
Stabil Grubu	6766 (±1077)	6320 (±1703)
Kontrol	2396 (±658)	1663 (±1096)

Şekil 4.3. Kriz dönemi otomatik alyuvar değişimi ile sonlandırılan hastaların kriz öncesi ve kriz sonrası dolaşımdaki endotelial hücre sayıları. Kriz dönemine göre endotelial hücre sayılarında azalma eğilimi olduğu görülmektedir.

Akım sitometresinde bazı endotelial hücrelerin diğerlerinden daha güçlü bağlandığı, daha granüllü ve büyük hücreler olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4. A -B). Stabil durumda olan orak hücre hastalarından alınan periferik kan örneklerinden manyetik tanecikler kullanılarak CD34+ hücreler izole edildi. Endotele özel Dil-acLDL ve ulex-Lectin ile ardışık olarak boyandı. Endotele özel boyalar ile tipik olarak boyanmış hücrelerin immunfloresan mikroskopik incelemesinde endotelial hücrelerin morfolojik yapılarının heterojen görünümde olduğu görüldü. Bir kısım hücrelerin dar stoplazmalı lenfosit benzer hücreler olmasının yanı

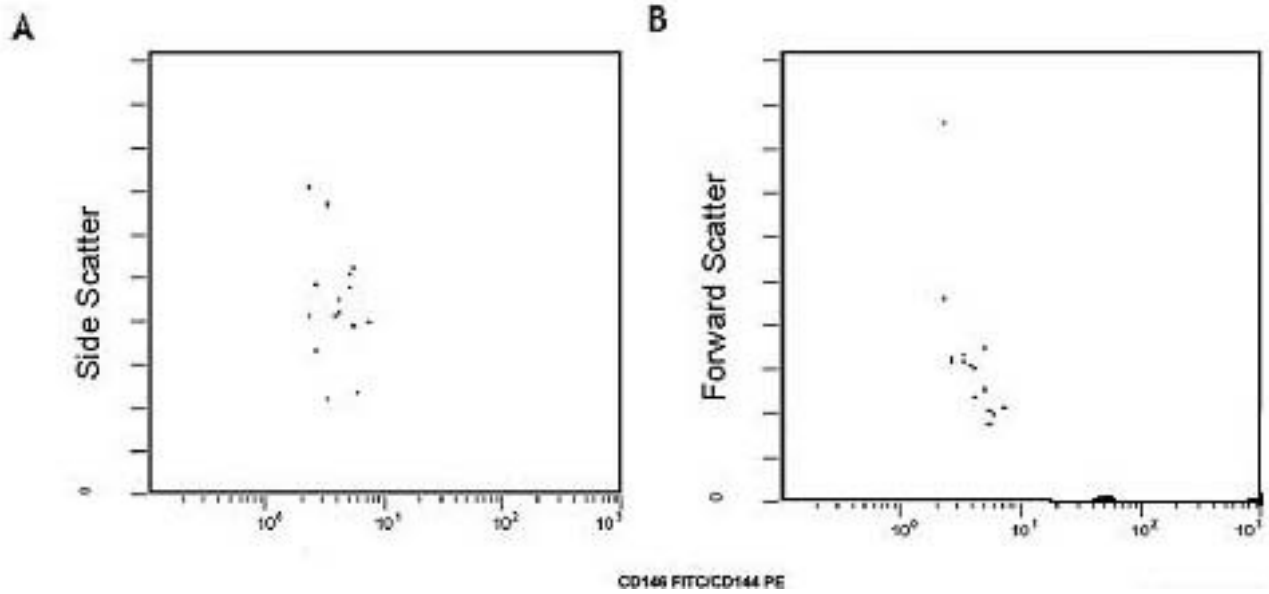
sıra, geniş stoplazmalı, büyük çekirdekli ve granüllü endotel hücrelerin varlığı tespit edildi (Şekil 4.4. C).



Şekil 4.4. A-C. Stabil durumda olan orak hücre hastalığında dolaşımdaki endotel hücrelerin morfolojik özellikleri: CD34+ hücreler manyetik tanecikler ve CD34 monoklonal antikorları kullanılarak hastaların periferik kanındaki diğer hücrelerden ayrılmıştır. (A ve B) Seçilen hücreler akım sitometresinde CD146/CD144 FS ve SS kapılarında boyut ve granülarite bakımından belirgin heterojen dağılım göstermektedir. İmmun floresan mikroskopi (C, orijinal büyütme $\times 400$; E, orijinal büyütme $\times 200$) Dil-AcLDL ve ulex-lectin ile boyanan hücrelerin değişik boyut ve granülaritede olduklarını göstermektedir.

Orak hücre hastalarında dolaşımdaki endotel hücrelerinin daha az sayıda da olsa CD34+ hücrelerin yanı sıra CD34- olan fakat endotele özel yüzey belirleyicileri ifade eden (CD144+CD146+) hücrelerin de varlığı saptandı. Ayrıca periferik kan örneğinden manyetik

tanecikler kullanılarak seçilen CD34- hücrelerin endotel hücreye özel boyamaları sonucunda, endotelyal hücrelerin varlığı immun floresan mikroskopta da saptandı (Şekil 4.5. A-B).

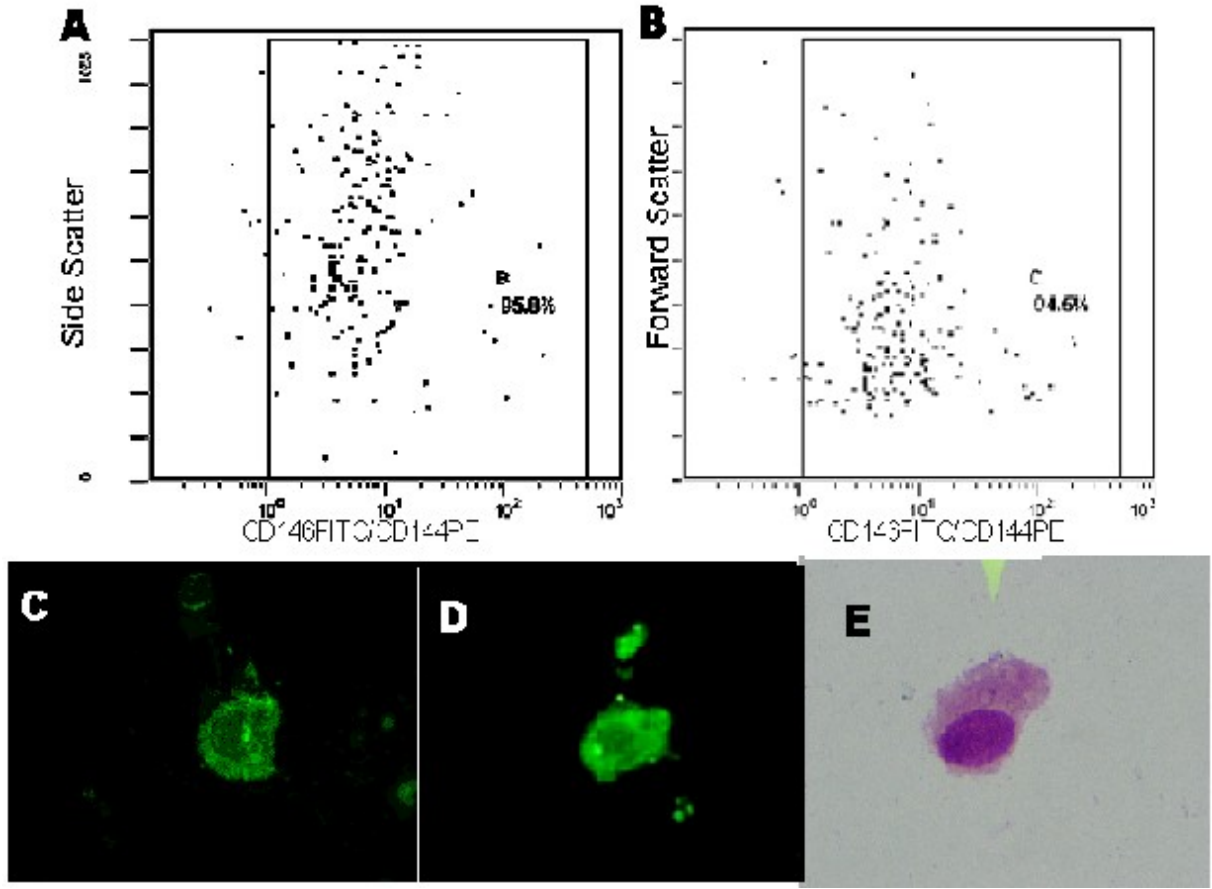


Şekil 4.5. A-B. Orak hücre hastalığı olan hastaların periferik kanında CD34- endotelyal hücrelerin tespit edilmesi. (A ve B) Birkaç CD34- hücrenin endotelyal hücrelere özel yüzey belirleyicilerini (CD146, CD144) ifade ettikleri saptandı.

Akım sitometresinde bazı endotelyal hücrelerin diğerlerinden daha güçlü bağlandığı, daha granüllü ve büyük hücreler olduğu gözlemlendi. Dolaşımdaki endotel progenitor hücrelerin geniş kapılama tekniği ile değerlendirilmesi sonucunda SS/CD144 kapısında boyut olarak daha büyük ve granüllü hücrelerin CD133, CD117 gibi ilkel yüzey belirleyicilerini taşıyabildiği tespit edildi.

4.2. Safen ven endotelyal hücre çalışması

Safen venden hazırlanan ve olgun endotel hücreleri olarak düşünülen hücrelerin akım sitometri incelemelerinde, hücrelerin SS/CD144 kapısında boyut ve granülarite olarak lenfositlerden daha büyük monosit bölgesinden granülosit bölgesine ulaşan geniş bir dağılım gösterdiği, ve immunflorosan mikroskobik incelenmesinde de, bu hücrelerin heterojen morfolojik yapıda büyük ve granüllü hücreler olduğu saptandı (Şekil 4.6. A-E).

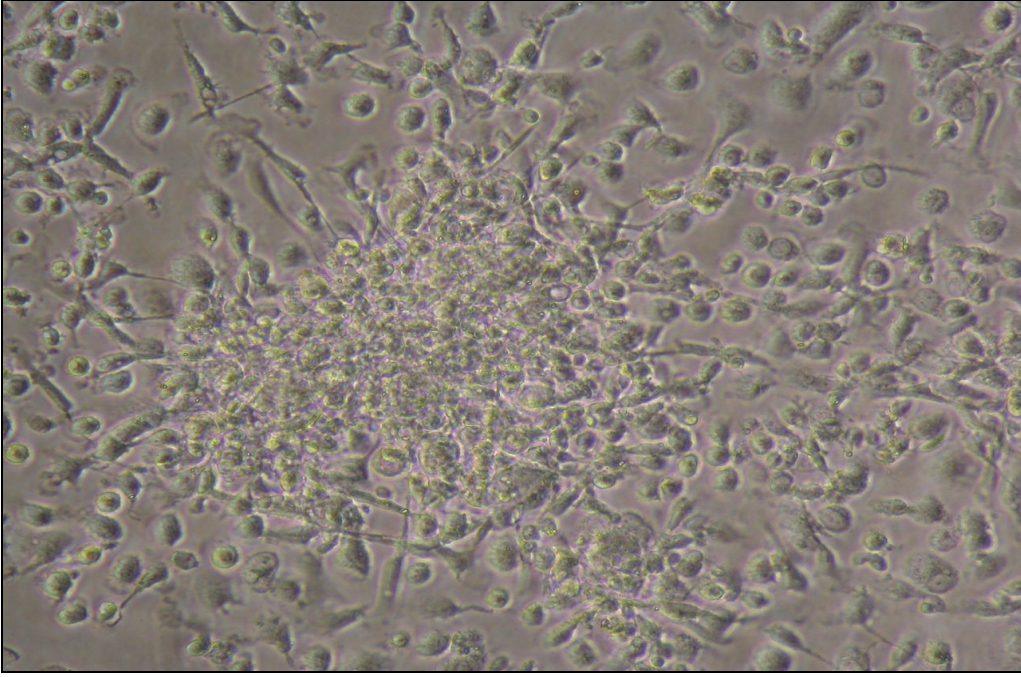


Şekil 4.6. A-E. İnsan safen ven örneğinden izole edilen endotel hücrelerin morfolojik özellikleri. (A and B) CD146+/CD144+ Endotel hücreler CD146/CD144 FS ve SS kapılarında hücre boyutu ve granülarite bakımından heterojenite heterojen dağılım göstermektedir. (C ve D) Endotel hücrelerin Dil-AcLDL ve ulex lectin ile boyandıktan sonra yapılan immune floresan mikroskopik incelenmesi (orijinal büyütme $\times 400$). (E) Hücrelerin May-Grünwald Giemsa ile boyanmalarından sonra ışık mikroskopisindeki görünüşleri (orijinal büyütme $\times 1000$).

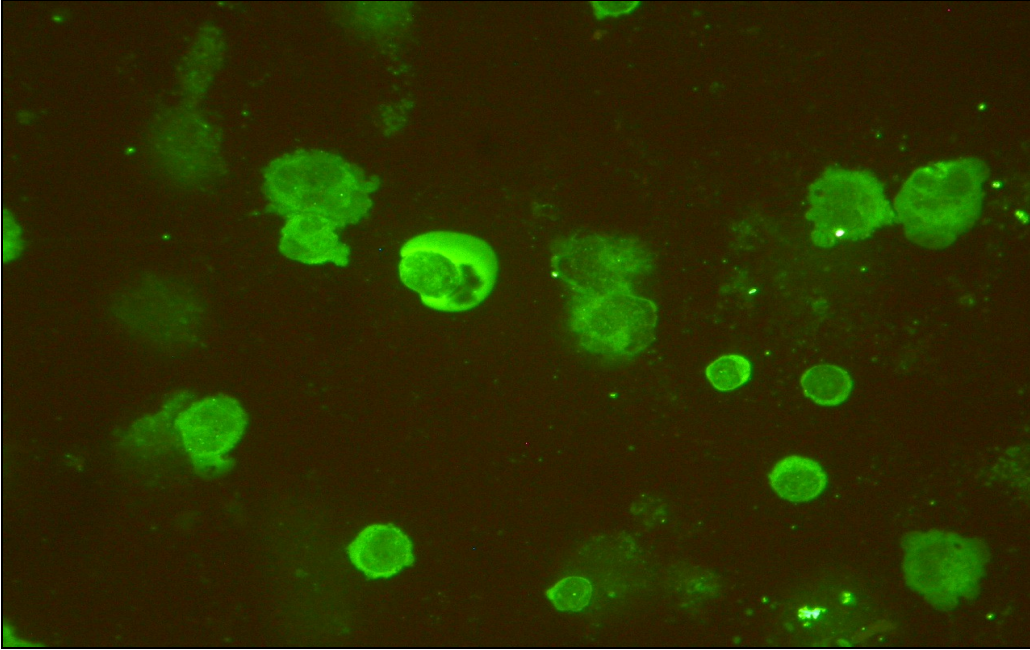
Orak hücre hastalığı olan hastaların periferik kandan yapılan endotel analizleri sırasında yapılan canlılık testi ile hücrelerin %99'unun canlı olduğu gözlemlendi.

4.3. Kültüre edilmiş endotel hücrelerden elde edilen sonuçlar

HUVEC kültürü sonucunda elde edilen endotel hücrelerin akım sitometri incelemelerinde insan safen ven örneklerine benzer şekilde, hücrelerin SS/CD144 kapısında boyut ve granülarite olarak lenfositlerden daha büyük ve granüllü bir yapı gösterdiği, ve immunflorosan mikroskopik incelenmesinde de, bu hücrelerin heterojen morfolojik yapıda granüllü hücreler olduğu saptandı (Şekil 4.7. A ve B).



A

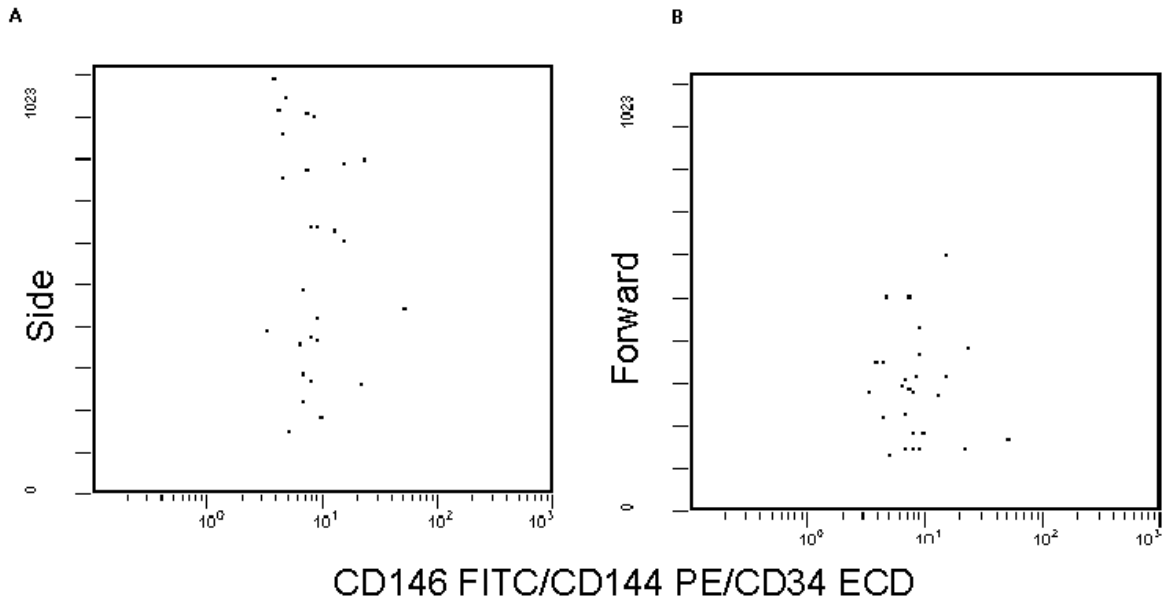


B

Şekil 4.7. A ve B. İnsan göbük kordonu endotelyal hücre kültürü. Endotelyal hücre kolonisi (A) ve hücre boyutu ve granülaritesi bakımından heterojen yapı gözlenmektedir (B).

4.4. Kemik iliği örneğinde endotelyal hücre izolasyonu

Kemik iliği örneğinde yapılan değerlendirmede ise erken veya geç endotelial öncü hücre yüzey belirleyicileri yanında, olgun endotel hücre belirleyicilerin taşıyan hücreler olduğu tespit edildi. Normal kemik iliği örneklerinin benzer analizinde de şaşırtıcı olarak CD34+ hücrelerde endotelial hücrelere özgü yüzey belirleyicilerinin, ve CD144 (VE-cadherin), CD31 (TECAM-1) bulunduğu, bunun yanı sıra, CD34- ama yine endotelial hücrelere özgü yüzey antijenlerinin bulunduğu, yüksek granüllü olan veya olmayan hücrelerin de varlığını görüldü (Şekil 4.8. A ve B).

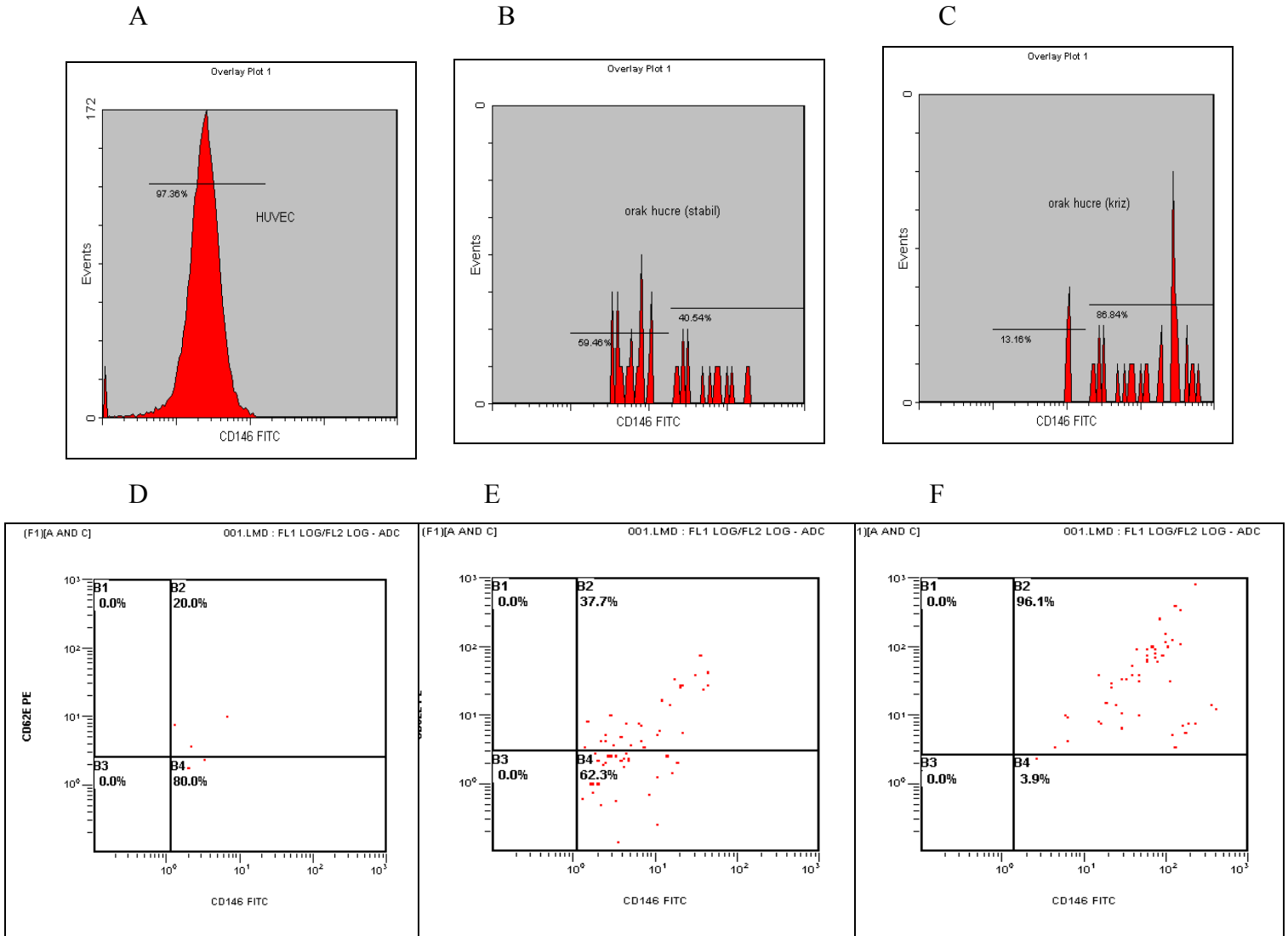


Şekil 4.8. A ve B. Kemik iliğinde endotelial hücrelerin tespit edilmesi. Akım sitometri verileri, hücre tedavisi uygulanacak bir kardiyomyoplasti olgusundan alınmıştır. Endotelial hücrelere özel yüzey belirleyicileri taşıyan bir kısım CD34+ kemik iliği hücresinin granüllerin sayısında (A) ve SS ve FS panellerinde hücre boyutu (B) yönünden heterojen bir dağılımı olduğu dikkati çekmektedir.

4.5. Endotelial hücre boyutu ve granülaritesinin anlamı

Melanoma hücre adhezyon molekülü (CD146) bağlanma indeksi, kriz sırasında en fazla olmak üzere orak hücre hastalarında kontrollere göre artmış olarak bulundu (ağırlı kriz durumunda, $P = 0.001$; stabil durumda, $P = 0.003$). Endotel hücrelerin çapının 10 mikrometreden küçük olduğu tespit edildi. SS da X-median değerleri yönünden hem ağırlı kriz grubunda hem de stabil durumda kontrollere göre anlamlı artış saptandı. Ancak FS de X-median değerlerindeki artış kontrole göre önemli bulunmadı. Her üç çalışma grubunda FS ve

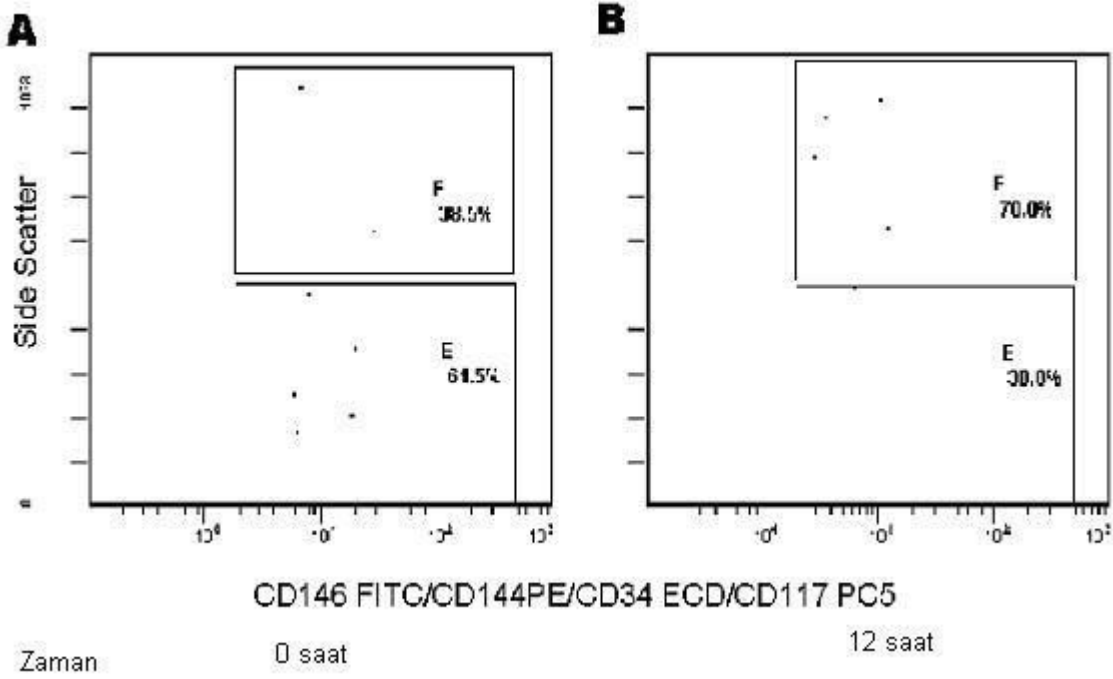
SS görünümündeki X-median değerleri ile melanoma hücresi adhezyon molekülü bağlanma indeksleri arasında iyi bir korelasyon saptanamadı (Şekil 4.9. A-F).



Şekil 4.9. A-F. Endotelial hücre boyutu ve granülaritesi ile melanoma hücresi adhezyon molekülü bağlanması arasındaki ilişki. Tekli histogram grafiklerinde y ekseninde CD146'ya bağlanan endotelial hücre sayıları (A,B,C) ile endotelial hücre boyut ve granülaritesini gösteren (D,E,F) karşılaştırılmıştır. Endotelial hücre boyut ve granülaritesi ile CD146 bağlanma indeksi arasında ilişki bulunamamıştır.

4.6. Endotelial hücre morfolojisi zaman ilişkisi

Tüp testinde tespit periferik kan içerisinde tespit edilen endotelial hücrelerin 12 saat süre ile 37°C'de, %5 CO² ile inkübe edilmesi neticesinde endotelial hücre yüzey belirleyicilerinin SS/CD144 kapısında daha güçlü bağlanma alanına (daha granüllü hücrelerin bulunduğu alana) doğru yer değiştirdikleri izlenmiştir (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. A ve B. Tüp testi sonuçları: Orak hücre hastalığı olan hastaların periferik kan örneğinde endotelial hücrelerin CD146 FITC/CD144 PE/CD34 ECD/CD117 PC5 monoklonal antikorları kullanılarak analiz edilmesinden sonra, örneğin 5% CO₂ ortamında 37°C de 12 saat enkübe edilmesi sonucunda endotelial hücre granülaritesinin arttığı gözlenmiştir (A ve B).

4.7 Endotelial hücre sayısının orak hücre hastalığı klinik ve laboratuvar parametreleri ile ilişkisi

Kriz ve stabil grupta yer alan hastalardan hidroksiüre kullanan ve kullanmayan hastalar arasında yıllık ortalama kriz sayıları bakımından önemli fark bulunamadı (Kriz grubunda hidroksiüre kullanan hastalar arasında ortalama yıllık kriz sayısı 3±0.8, kullanmayanlarda 3.5±1.0; stabil grupta hidroksiüre kullananlarda 3±0.6 kullanmayan 3.2±0.9; hepsi için P> 0.05). Multiple regresyon analizi sonucunda, kriz dönemindeki orak hücre hastalığı olan

olgulardan elde edilen dolaşımdaki toplam endotelyal hücre ve öncü endotelyal hücreler ile test edilen hiçbir klinik parametre arasında önemli ilişki bulunamadı. Stabil dönemdeki orak hücre hastalığı olan olgulardan elde edilen dolaşımdaki toplam endotelyal hücre ve öncü endotelyal hücreler ile test edilen hiçbir klinik parametre arasında da önemli ilişki bulunamadı (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. Dolaşımdaki toplam endotelyal hücre sayısı ile orak hücre hastalığına ait klinik parametreler arasındaki ilişki.

	Kriz grubu	Stabil grup
Yaş	-0.103	-0.286
Cinsiyet	-0.110	-0.146
KOS	-0.513	0.276
ANO	-0.040	-0.338
HN	0.422	0.048
KN	0.016	-0.047
BY	-0.047	-0.138
HK	0.079	0.216
R²	0.459	0.257

Tüm veriler β değeridir Bütün Değerler İstatistiksel Olarak Anlamsızdır ($p>0.05$)

KOS: Ortalama yıllık kriz sayısı, HN: Hepatik nekroz, ANO: Akut nörolojik olay, KN: Kemik nekrozu, BY: Bacak yaraları, HK: Hidroksiüre kullanımı.,

Kriz grubunda yer alan hastalardan olgu 5 ve 15, stabil grupta ise olgu 8 de hemoglobin S konsantrasyonu %50'nin altında bulundu. Bu olgular hastaneye başvurmadan önce buldukları merkezde transfüzyon yapılmış olan hastalardı. Kriz grubunda mutlak nötrofil sayısı $20 \times 10^9/L$ üzerinde olan hastalar mevcuttu (Olgu 2,9,10,12,16, ve 18). Dolaşımda bulunan toplam endotelyal hücre sayısı ile orak hücre anemili hastalara ait laboratuvar testlerinden sadece hemoglobin arasında iyi bir korelasyon olduğu anlaşıldı (Kriz grubundaki hastalar için $P = 0.006$; stabil grup için $P = 0.009$). Öncü endotelyal hücrelerin sayısı ile hemoglobin arasında ise, sadece kriz grubunda belirgin olmayan bir korelasyon

saptandı, ancak stabil grupta belirgin ilişki saptanamadı (Kriz grubundaki hastalar için $P = 0.02$; stabil grupta $P > 0.05$).

5. TARTIŞMA

Dolaşımdaki endotel hücrelerin araştırılması güncel bir konudur. Günümüzde değişik fizyolojik ve patolojik durumlar sırasında sayılarında önemli değişiklikler olması, ve çeşitli hastalıkların patofizyolojisine katılmaları klinikte giderek artan bir ilgi ile değerlendirilmeye çalışılmaktadır. Bunun bir sonucu olarak dolaşımdaki sayılarındaki

değişiklikler kalp damar sistemi hastalıkları gibi bazı klinik durumlarda bir prognoz kriteri olarak kabul edilmeye başlanmıştır (24,41,87,88). Dolaşımdaki endotel hücre ölçümleri endotel zararlanmalarının direkt bir göstergesidir ve endotel ile ilişkili birçok fizyolojik ve patolojik durumun değerlendirilmesinin basit ve invazif olmayan bir yoludur (89,90).

Bununla birlikte dolaşımdaki endotel hücrelerin tanınması ve ölçülmesi ile ilgili olarak standardize edilmiş bir yöntem henüz geliştirilememiştir. Normal ve hasta kişilerde biyolojik yaşam süreleri ve olgunlaşma süreçleri ile ilgili de yeterli bilgi yoktur. Bu nedenle, endotel hücrelerin tanı, prognoz ve tedavi açısından yararlı bir araç olarak kullanılabileceği düşüncesi hipotetik olarak kalmaktadır.

Çalışmalarımızı planlarken endotel hücre aktivitesinin ve döngüsünün yüksek olduğu, vasküler hasarın ve doku iskemisinin oldukça yoğun olduğu orak hücre hastalığı grubunu çalışma grubu olarak seçtik (27,82,91,92). Bu şekilde, dolaşımdaki endotel hücrelerin immun fenotipik özelliklerini iyi tanımayı, endotel hücre yüzeylerinde olabilecek hızlı değişiklikleri farketmeyi, ve olgunlaşma süreci hakkında bilgi edinmeyi yaşayan bir insanda test etmeyi amaçladık. Bu güne kadar konu ile ilgili yapılmış çalışmalar daha çok kültür ve patolojik örneklerde yapılmış çalışmalardır.

Endotel hücrelerin tanınması ve sayılması için akım sitometresinde yapılan analiz yöntemini kullandık. Çünkü akım sitometri analizleri, birçok hücre yüzey belirleyicilerinin birlikte kullanılması ile dolaşımdaki az sayıdaki hücre popülasyonunu tanımlanmasına ve hücre dinamiği hakkında bilgi edinilmesine olanak sağlamaktadır (75,86,89,90). Bu amaç için son zamanlarda örneklerin hazırlanma ve akım sitometresinde analiz aşamalarında yeni

geliştirdiğimiz yöntemi kullandık. Bu yöntemin diğer yöntemlerinden farkı, yöntem ile ilgili yeterli tekrarlanabilirlik, ve güvenilebilirlik çalışmalarını içermesidir (86).

Bu güne kadar olan çalışmalarda akım sitometresinde dolaşımdaki endotel hücrelerin analizlerinde genellikle izlenen yollar ve muhtemel hataların şunlar olduğu ileri sürülmüştür. Birincisi, endotel hücrelerin mononükleer hücrelerin bir alt grubu olduğu düşünülmüş bu nedenle mononükleer hücre izolasyonu yapılarak analizler bu hücrelerde yapılmıştır (9,49). Oysa mononükleer hücre izolasyonu sırasında santrifüj ve yıkama işlemleri fiziksel hasarlara hücre kayıplarına yol açabilir Ayrıca daha büyük ve granüllü endotel hücrelerin dışlanması anlamına gelebilir. Biz bu problemin üstesinden gelebilmek için, hastaların periferik tam kanlarında ve yıkama yapmadan hazırlanmış örneklerde önerildiği gibi analizler yaptık (86). Sadece ortamda bulunan eritroid hücrelerin uzaklaştırılması amacı ile lizis solusyonu kullandık (lyse-no wash). İkincisi, izole edilen mononükleer hücreler sık olarak kültüre edildikten sonra analiz edilmektedir. Ancak in vivo ve in vitro olgunlaşma süreçlerinin aynı olduğu bilinmemektedir (1). Üçüncüsü, CD34+ hücrelerin manyetik tanecikler ile ayrılma işlemi sırasında az da olsa hücre kaybı gerçekleşebilir (9,60). Ayrıca CD34- olması muhtemel endotel hücrelerin dışlanması olasıdır. Dördüncüsü, yalnızca CD45- hücrelerin analize alınması CD45+ olması muhtemel hücrelerin dışlanması anlamına gelebilir. Ayrıca endotel hücrelerin boyutu ve granülaritesi ve olgunlaşma süreci ile ilgili bilgilerin kısıtlı olması nedeni ile bu hücrelerin çoğu zaman lenfositlere benzeyen progenitor hücreler şeklinde değerlendirilmelerine yol açmıştır (25,93). Bu nedenle akım sitometri analizlerinde FS ve SS grafiklerinde lenfosit bölgesindeki hücreler kapılanarak analiz edilmektedir. Böyle bir analiz, farklı morfolojide olması muhtemel endotel hücrelerin dışlanması anlamına gelebilir. Kullandığımız analiz tekniği ile sadece lenfosit bölgesinde değil monosit ve granülosit bölgelerini de içeren geniş bir kapılama yapıldı. Son olarak, aynı hücre yüzeyinde hücreye özel çoklu yüzey belirleyicisi kullanılarak yapılmış çalışmalar sınırlıdır. Endotel hücrelere özgü yüzey belirleyicilerinin sınırlı olması ve olgunlaşma süreçlerinin iyi bilinmemesi değişik monoklonal antikör kombinasyonlarının kullanımını gerektirir. Endotel hücre analizi için sıklıkla kullanılan CD146, aktif T lenfositlerin yüzeyinde de ifade edilir (89,94). Endotel hücre yüzey belirleyicisi, CD144 (VE-cadherin), hem endotel hücre yüzeyinde hem de fetal hematopoietik kök hücrelerin yüzeyinde ifade edilebilir (19,52,59). Bu yüzden çalışmamızda endotel hücre analizi için CD146/CD144 yüzey belirleyicileri birlikte kullanılmıştır.

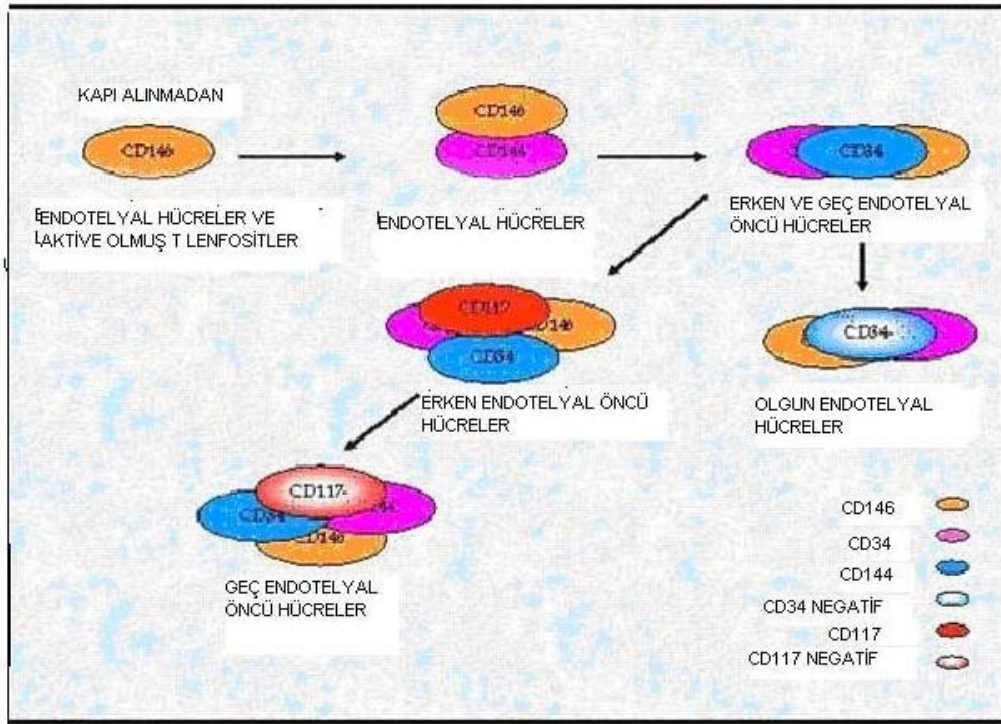
Farklı hastalık gruplarında yapılan çalışmalarda periferik kandaki mililitredeki endotel sayısının 0 ile 1500 arasında değişebileceği bildirilmiştir (84,95). Çalışmamızda kontrol ve orak hücre hasta örneklerinde literatürde sağlıklı ve orak hücre hastaları için verilen değerlerden çok daha yüksek endotelyal hücre değerleri bulduk (84). Bu farklılık ölçüm için örneklerin hazırlanma ve analiz yöntemlerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Dolaşımda bulunan endotelyal hücrelerin akım sitometresinde değerlendirildiği çalışmalarda, metod ile ilgili olarak, literatürde tekrarlanabilirliği, ve güvenilirliği test eden performans çalışmalarına rastlanılmamıştır. Bizim çalışmamızda endotelyal hücre analizi için kullanılan metodun tekrarlanabilir ve literatürde sıkça kullanılan bir yöntemeye göre daha güvenilir olduğu test edilmiştir (86). Çalışmamızda, hastalarda kriz durumunda ölçülen olgun endotelyal hücrelerin stabil duruma göre beklendiği kadar yüksek bulunmaması, kriz durumunda bu hücrelerin apoptozis'e yönlendirilmiş olabileceği fikrini oluşturabilir (27). Dolaşımdaki endotelyal hücre apoptozisi konusunda ileri çalışmalar gereklidir.

Çalışmamızda, tüm hücreleri analiz ettiğimizde lenfosit büyüklüğünden daha büyük ve granüllü endotelyal hücrelerin varlığını ve bu hücrelerin endotele özel yüzey belirleyicileri ile birlikte ilkel belirleyicileri (CD34, CD117, CD133, CD144, CD146) taşıdığını tespit ettik. Dignat-George F ve arkadaşlarının geniş derlemelerinde dolaşımdaki endotelyal hücrelerin değişik patolojik durumlarda şekil ve büyüklük bakımından polimorfizm gösterdiği, ancak bunun nedeninin bilinmediği, bunun nedeninin endotel hücrelerin farklı damar yatağı kaynaklı olmalarına bağlı olabileceği veya farklı patolojik uyarılara endotelin cevabını gösterebileceği yazılmıştır (64).

Çalışmamızda, benzer boyut ve granülarite farklılığını insan safen ven ve insan göbek kordonu endotel hücrelerinde de tespit ettik. Bu yönden değerlendirildiğinde dolaşımdaki endotelyal hücrelerin akım sitometri analizinde SS/CD34 grafiğinde en üst sınır alanına düşen hücrelerin de değerlendirme içine alınması gerektiği düşüncesindeyiz. Akım sitometresinde heterojen dağılılı dolaşan endotelyal hücrelerin boyut ve granülarite farklılığı gösterdiğinin bir delilidir. Bu nedenle endotele özgü çoklu monoklonal antikor kullanıldığında akım sitometride analiz edilirken geniş alandaki tüm hücrelerin değerlendirilmesini gerektirir. Prisca Zammaretti ve arkadaşlarının makalesinde ise dolaşımdaki endotelyal hücrelerin ilkel yüzey belirleyicileri taşıyabildiğini bildirmişlerdir (96). Çalışmamızda, ilave olarak kemik iliği hücreleri arasında endotelyal öncü hücre yüzey belirleyicilerini taşıyan hücreler yanında, olgun endotelyal hücre yüzey belirleyicilerini taşıyan hücreler olduğunu tespit ettik. Bu

durum söz edilen ilkel yüzey belirleyicilerinin sadece olgunlaşma ile değil değişik fizyolojik veya patolojik sinyallere hücrenin verdiği bir cevap olabileceği, ya da orak hücre anemisinde ortaya çıkan hızlı matürasyon süreci ile ilgili olabileceği şeklinde değerlendirilebilir (Şekil 5.1.). Ayrıca endotelial hücre yüzey belirleyicilerinin sadece hücrelerin tanınmasına yarayan moleküller olmayabileceği, fonksiyonel özellikleri olabileceği de hatırlanmalıdır. Bununla birlikte CD144 molekülünün sadece endotel hücrelerinin tanınmasına yarayan bir belirleyici olmadığı, endotelin-1 gibi sitokinlerin transkripsiyon düzeyinde upregüle olarak bu molekülün ekspresyonlarını kuvvetli bir şekilde arttırdığı bildirilmiştir (97). Ayrıca bu moleküle karşı kullanılan antikorlar ile de endotel hücre proliferasyonu ve diğer fonksiyonların inhibe edildiği not edilmiştir (98). Çalışmamız, orak hücre hastalığı gruplarında, endotel öncü hücre sayılarının ve CD144 molekülünün bağlanma indeks değerlerinin klinik durum ile uyumlu olduğu, buna karşılık olgun endotel hücresi sayısı ve endotel hücre boyutu ve granülaritesi'nin ise klinik durum ile uyumlu olmadığı anlaşılmıştır.

Bu gözlemler, endotel hücre boyutu ve granülaritesinin endotelial hücre aktivitesi ile ilişkili olabileceği fikrini desteklemektedir.



Şekil 5.1. Endotelial hücre farklılaşma akış şeması.

Literatürde kültür ortamında oluşturulan endotelial hücrelerin geçici olarak monosit yüzey belirleyicilerini taşıyabileceği ifade edilmektedir (60,99). Çalışmamızda, aynı zamanda dolaşan endotelial hücrelerin monosit yüzey belirleyicilerini taşımadığını gördük. Bulgular arasındaki farklılık kültür ortamı ve *in vivo* şartların farklı olmasından kaynaklanmaktadır (87,100).

Periferik tam kandan yapılan akım sitometri analizlerinde, kullanılan monoklonal antikörlerin debris, trombosit, eritroblastlar ve sickling olmuş hücrelere yalancı bağlanıp bağlanmadığı tartışılması gereken en önemli noktalardan birisidir. Çalışmamızı 4 renkli immün boyanma olacak şekilde düzenledik ve ardışık kapılama metodunu kullanarak CD34+ ve CD14- tüm hücrelerin CD144/CD146 taşıyıp taşımadıklarını gözledik. Bu şekilde makrofaj ve monositler dışlandı. Ardışık kapılamalar ile de diğer yalancı bağlanmalar dışlandı. Debris, eritroblast veya trombositlerin aynı anda CD34/CD144/CD146+ ve CD14- olması pek mümkün gözükmemektedir. Böyle yalancı bir bağlanma olsaydı geriye kalan CD34- çok sayıdaki hücrede çok sayıda daha fazla yalancı bağlanma olması gerekirdi. Diğer önemli bir nokta ise debris, trombosit ve eritroblastların FS-SS grafiğinde en alt bölümde yer alması buna karşılık pozitif olarak değerlendirdiğimiz hücrelerin bu hücrelerden çok farklı bir bölgede yer almasıdır.

Monositlerden bir kısmının endotel yüzey belirleyicilerini taşıyabileceğini bildiren çalışmalar olmasına karşın periferik tam kandan yaptığımız analizlerde CD14+ hücrelerin CD144'ü hiç ifade etmediğini gördük. Bu nedenle endotel çalışmaları için CD144 monoklonal antikörünün uygun bir endotelial hücre yüzey belirleyicisi olabileceğini düşünebiliriz.

Olgunlaşmanın değerlendirilmesi çalışmasında; alınan hasta örnekleri plazmada bulunan doğal faktörler korunarak kısa süre korbondiyoksit inkübatöründe bekletildi. Yüzey belirleyicilerindeki değişiklikleri değerlendirilme analizleri yapıldı. Orak hücre hastalığı olan hastalarda hızlı endotelial hücre döngüsünün ve yüksek sitokin düzeylerinin olması olgunlaşmanın kısa sürede doğal ortama yakın *in vitro* bir modelde incelenebilmesine fırsat yarattığı düşünüldü (9,31,36). Böylece endotelial hücre olgunlaşmasının önceden bilinenden

çok daha hızlı olabileceği ve bu sürecin saatler içerisinde gerçekleşebileceğine işaret eden gözlemler elde edildi.

Endotelyal hücreleri damar hasarlanmasına cevap olarak hasarlanan bölgenin onarımına veya yeni damar oluşumu işlemine katıldıkları yaşamsal rol oynarlar (93,95). Bu nedenle damar hastalıklarında dolaşımdaki endotelyal hücre sayısının düşük olmasının kalp damar sistemi hastalıkları yönünden risk olarak değerlendirilebileceği rapor edilmektedir (93). Bunun yanında organlara yönelik hasarlar ile dolaşımdaki endotelyal hücreler arasında ilişki olabileceği rapor edilmiştir (76,77,78,79). Örneğin kronik böbrek yetersizliğinde endotelyal hücre sayıları kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur (76). Farelerde akut akciğer zararlanmalarında endotelyal progenitör hücrelerin kemik iliğinden dolaşıma geçtikleri bildirilmiştir (101). Buna karşılık, iltahaplı barsak hastalığında kontrol grubuna göre dolaşımdaki endotelyal hücre sayıları bakımından bir fark bulunmadığı rapor edilmiştir (75). Biz çalışmamızda orak hücre hastalığının seyri sırasında gelişen ağırlı atakların sayısı, akut nörolojik olaylar, hepatik nekroz, kemik nekrozları, bacak ülserleri, ve hidroksiüre kullanımı ile dolaşımdaki endotelyal hücre sayıları arasında ilişki bulamadık. Oysa hem stabil durumdaki hastalarda, hem de kriz durumunda olanlarda kontrol grubuna göre belirgin derecede yüksek dolaşımdaki endotelyal hücre sayıları olduğunu tespit ettik. Bu gözlem, dolaşımdaki endotelyal hücre sayısının en azından orak hücre hastalığında organlara özel hasarlanmaları yansıtmasından çok hastalıkların oluş mekanizmaları konusunda daha yararlı bilgiler verebileceğini düşündürebilir. Laboratuvar değerlerinden ise sadece hemoglobin değerleri ile endotelyal hücre sayıları arasında korelasyon olduğunu tespit ettik. Diğer kök hücreler gibi endotelyal öncü hücrelerin de kökeni'nin kemik iliği hücreleri (hemanjioblast) olduğu düşünülmektedir (21,22). Orak hücre hastalığında stabil durumda kemik iliğinde yapılan eritroid hücreler ile periferik kanda yıkılan hücreler arasındaki denge, sabit durum (steady state) hemoglobin değerine yansımaktadır. Bu dengenin kemik iliğinde eritroid hücreler ile ortak ana hücreden köken aldığı düşünülen endotelyal hücre döngüsü ile ilişkili bulunması sürpriz olmamalıdır. Vasküler hasarın orak hücre hastalığı kadar belirgin olmadığı talasemi hastalarında da dolaşımda yüksek endotelyal hücre sayılarının bulunması bu görüşü destekleyebilir (102). Kriz dönemindeki hastaların bazılarında (örneğin 2, 10, 16, 18 no'lu hastalar) mutlak nötrofil sayısının $20 \times 10^9/L$ ' nin üzerinde olduğu anlaşılmaktadır. Bu hastalarda klinik olarak aktif infeksiyon belirti ve bulguları (ateş, hipotansiyon, negatif kan kültürü) saptanamadığı için çalışmadan dışlanmadılar. Kriz dönemindeki hastalarda endotelyal hücre aktivasyonu ile ilişkili olarak periferik kanda inflamasyon ilişkili sitokinlerin

ve kemokinlerin etkisi ile n6trofil sayısının y6kselebileceği bildirilmiştir (27), Aynı zamanda, krizin sıklığı ve şiddeti ile n6trofil sayıları arasında ilişki olabileceği de rapor edilmiştir (69,82,83). Hastaların periferik kanında tespit edilen y6ksek n6trofil sayılarının kriz sırasında oluşabilecek patofizyolojik değişiklikleri yansıttığı d6ř6n6lebilir. Literat6rde, globulin dışı genlerdeki yapısai farklılık nedeni ile orak h6cre hastalarının heterojen fenotipik 6zellikler g6sterebilecekleri belirtilmektedir (27). Bu bulgu, kriz ve stabil grupta hidroksi6re kullanan ve kullanmayan hastaların yıllık ortalama kriz sayıları arasında 6nemli fark bulunamamasının nedenini kısmen a6ıklayabilir

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- A.** Periferik kandan ayırma, yıkama, ve akım sitometresinde analiz tekniklerinden kaynaklanan problemler nedeni ile endotelyal hücre değerlerinin izolasyon, tanınma ve sayımları konusunda tam bir görüş birliği sağlanamamıştır.
- B.** Endotelyal hücrelerin akım sitometresi analizleri ile ilgili olarak, yeni bir protokol kullanılması sonucunda orak hücre hastalığında fizyopatolojiye uygun dolaşımda endotelyal hücre değerleri elde edilebilmiştir.
- C.** Dolaşımdaki endotelyal hücre sayısı, orak hücre hastalığında kriz takibinde bir parametre olabilir.
- D.** Orak hücre hastalığı ve muhtemelen diğer damar hastalıklarında endotelyal hücrelerde bilinenden daha hızlı bir olgunlaşma süreci olabileceği gözlenmiştir.
- E.** Endotelyal hücre boyutu ve granülaritesinin hem olgunlaşma süreci ile hem de aktivasyonla ilgili olabileceği tespit edilmiştir.
- F.** Endotelyal hücre yüzey belirleyicilerinin yalnızca olgunlaşma sürecini yansıtmadığı aynı zamanda çeşitli fizyolojik ve fizyopatolojik uyarılara hücrenin verdiği bir cevabı işaret ettiği anlaşılmıştır.
- G.** Dolaşımdaki endotelyal hücre sayılarının, orak hücre hastalığında gelişen organ hasarlarını belirlemede yetersiz kaldığı saptanmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967, 1997.
2. Gehling UM, Ergun S, Schumacher , Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from CD133-positive progenitor cells. *Blood* 95: 3106-3112, 2000.
3. Hristov M , Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance, *J Cell Mol Med* 8 (4): 498-508, 2004.
4. Piechev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane Moore WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95: 952-958, 2000.
5. Rafii S. Circulating endothelial precursors : mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* 105: 17-9, 2000.
6. Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC. Differentiation of endothelial cells: Analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays* 16: 901, 1994.
7. By Douglas B. Cines, Eleanor S. Pollak, Clayton A. Buck, Joseph Lascenzo, Guy A. Zimmerman, Rodger P. McEVER, Jordan S. Pober, Timothy M. Wick, Barbara A. Konkle, Bradford S. Schwartz, Elliot S. Barnathan, Keith R. McCrae, Bryce A. Hug, Ann-Marie Schmidt, and David M. Stem.Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood* 91(10): 3527-3561, 1998.
8. Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, Hartley RS, Schatteman GC. CD34 blood –derived human endothelial cell progenitors. *Stem Cells* 19: 304-312, 2001.
9. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/ macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 107:1164-1169, 2003.
10. Zhao Y, Glesne D, Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 100:2426-2431, 2003.

11. Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, Simari D. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res* 28;93(11): 1023-1025, 2003.
12. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circulation Research* 89(1): 1-7, 2001.
13. Schmeisser A, Garlich CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, Strasser RH, Daniel WG. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res* 49: 671-680, 2001.
14. Schmeisser A, Graffy C, Daniel WG, Strasser RH. Phenotypic overlap between monocytes and vascular endothelial cells. *Adv Exp Med Biol* 522: 59-74, 2003.
15. Schatteman GC, Hanlon HD, Jiao C, Dodds SG, Christy BA. Blood-derived angioblasts accelerate blood flow restoration in diabetic mice. *J Clin Invest* 106:571-578, 2000.
16. Ingram AD, Mead LE, Tanaka H, Neade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 104:2752-2760, 2004.
17. Pickl WF, Majdic O, Fisher GF, Petzelbauer P, Faé I, Waclavicek M, Stöckl J, Scheinecker C, Vidicki T, Aschauer H, Johnson JP, Knapp W. MUC18/MCAM(CD146), an activation antigen of human T lymphocytes. *The Journal of Immunology* 158:2107-2115, 1997.
18. Yan X, Lin Y, Yang D, Shen Y, Yuan M, Zhang Z, Li P, Xia H, Li L, Luo D, Liu O, Nann K, Bader BL. A novel anti-CD146 monoclonal antibody, AA98, inhibits angiogenesis and tumor growth. *Blood* 102:184-191, 2003.
19. Kim I, Yilmaz OH, Morrison SJ. CD144 (VE-cadherin) is transiently expressed by fetal liver hematopoietic stem cells. *Blood* 106:903-905, 2005.
20. Finney MR, Greco NJ, Haynesworth SE, Martin JM, Hedrick DP, Swan JZ, Winter DG, Kadereit S, Joseph ME, Fu P, Pompeii VJ, Laughlin MJ. *Biol Blood Transplant* 12(5):585-593, 2006.
21. Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, Nickenig G. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointima formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibition. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 22:1567-1572, 2002.
22. Shi Q, Raflii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92:362-367, 1998.

23. Burnham KL , Tayler WR, Ouyyumi AA, Rojas M, Bringham KL, Moss M. Increased circulating endothelial progenitor cells are associated with survival in acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit Care Med* 172(7): 854-860, 2005.
24. Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Giraradi L, Yurt R, Himel H, Raffi S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133 endothelial precursor cell. *Circ Res* 88: 167-174, 2001.
25. Rehman J, Li O, Parvathaneni L, Karlsson G, Panchal VR, Temm CJ, Mahenthiran J, March KL. Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte-/macrophage-derived angiogenic cells. *J Am Coll Cardiol* 43(12): 2314-2318, 2004.
26. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 105:71-77, 2000.
27. Makis AC, Hatzimichael EC, Bourantas KL. The role of cytokines in sickle cell disease. *Annals of Hematology* 79, 407-413, 2000.
28. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shirmada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 103: 2776-2779, 2001.
29. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109: 625-637, 2002 .
30. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 103(24); 2885-2890, 2001.
31. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rütten H, Fichtlscherer S, Martin H, Andreas M. Zeiher AM. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway . *J Clin Invest* 108(3): 391-397, 2001.
32. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Ria R, Dammacco F. Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathways. *Curr Mol Med* 2:5 37-543, 2002.
33. Freshney RI, Culture of animal cells. Fourth edition. A John Wiley and sons, Inc., Publications, Newyork, Toronto, Singapore 2000, 372-373.
34. Nishiwaka SI. Complex linkage in the developmental pathway of endothelial and hematopoietic cells. *Curr Opin Cell Biol* 13: 673-678, 2001.
35. Samena S. Khan, Michael . Solomon, and J. Philip McCoy, Jr. Detection of Circulating Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells by Flow Cytometry. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 64: 1-8, 2005.

36. Sbarbati R, DE Boer M, Scarlattini M, Rossi G, Van Mourik JA. Immunologic detection of endothelial cells in human whole blood. *Blood* 77: 764-780, 1991.
37. Kelliher AS, Parent DW, Anderson DC, Dorn ME, Hahn JL, Eapen S, Preffer FI. Novel use of the BD FACS SPA to automate custom monoclonal antibody panel preparations for immunophenotyping. *Cytometry B Clin Cytom* 66: 40-45, 2005.
38. George F, Poncelet P, Laurent JC, Massot O, Arnoux D, Lequeux N, Ambrosi P, Chicheportivhe C, Sampol J. Cytofluorometric detection of human endothelial cells in whole blood using S-Endo 1 monoclonal antibody. *J Immunol Methods* 139: 65-75, 1991.
39. Xu OB, Endothelial progenitor cells in angiogenesis. *Acta Phys Sin* 57 (1): 1, 2005.
40. Zamaretti P, Zisch AH. Adult 'endothelial progenitor cells'. Renewing vasculature. *Int J Biochem Cell Biol* 37(3): 493-503, 2005.
41. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *New England Journal of Medicine* 348(7): 593-600, 2003.
42. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 104: 2761-2766, 2004.
43. Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Della Porta M, Soukhomovskaia O, Malagutti P, Bugli AM, Bragotti LZ, Francolini G, Mauro E, Castoldi G, Ferrari R. CD 34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 110: 1209-1212, 2004.
44. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC, . Human endothelial progenitor cells from type II diabetic exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* 106(22): 2781-2786, 2002.
45. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of Infarcted Myocardium by Autologous Intracoronary Mononuclear Bone Marrow Cell Transplantation in Humans. *Circulation* 106:1913-1918, 2002.
46. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361: 45-46, 2003.
47. Mutin M, Canavy I, Blann A, Borny M, Sampol J. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood* 9: 2951-2953, 1999.

48. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 105: 1527-1536, 2000.
49. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka- Moll WM, Silver M, Keraney M, Li T, Isner JM, Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3422-3427, 2000.
50. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Mjesky MW, Entman ML, Micheal LH, Hirschi KK, Goodel MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107: 1395-1402, 2001.
51. George J, Herz I., Goldstein E, Abashidze S, Deutch V, Fimkelstein A, Michowitz Y, Miller H, Keren G. Number and adhesive properties of circulating endothelial progenitor cells in patients with in-stent restenosis, *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 23: 57-60, 2003.
52. Breier G, Breviario F, Caveda L, Berthier R, Schnurch H, Gotsch U, Vestweber D, Risau W, Dejana E. Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood* 87: 630-641, 1996.
53. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoeizer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 106(24): 3009-17, 2002.
54. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7: 430-436, 2001.
55. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *The Lancet* 360; 9331: 427-435, 2002.
56. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 103:634-637, 2001.
57. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Bischoff J, Mayer JE Jr. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med* 2001;7:1035-1040.

58. Kang H, Kim H, Zhang S, Park K, Cho H, Koo B, Kim Y, Lee D, Sohn D, Han K. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 363(9411):751-6, 2004.
59. Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel K, Brockhaus M Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, McDonald DM. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9815-9820, 1999.
60. Fujiyama S, Amano K, Uchira K, Yoshida M, Nishiwaki Y, Nozawa Y, Jin D, Takai S, Miyakazi M, Egashira K, Imasa T, Iwasaka T, Matsubara H. Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res* 93:980-989, 2003.
61. Percivalle E, Revello MG, Vago L, Morini F, Gerna G. Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infections with organ involvement. *J Clin Invest* 92:663-670,1993.
62. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem cell and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nature Medicine* 9 (6):702-712, 2003.
63. Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Romaswami F, Phippen AM, Annex BH, Dong C, Taylor DA. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation* 108:457-63, 2003.
64. Dignat-George F, Sampol J. Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept. *Eur J Haematol* 65: 216-220, 2000.
65. Heiss C, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Kalka C, Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 45:(9), 1441-8, 2005.
66. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, Walsh K, Isner JM, Asahara T. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 108:399-405,2001.
67. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Horning B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364:141-148,2004.
68. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner JM, Asahara T. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation* 105(6):732-8, 2002.

69. Sauntharajah Y, Vichinsky PE, Embury HS. (2005) Sickle cell disease. In: Hematology: Basic Principles and Practice (ed. by R. Hoffman, J.E. Benz Jr, J.S. Shattil, B.Furie, J.H. Cohen, E.L. Silberstein, P McGlave), pp. 605-644. Elsevier, Inc, Philadelphia.
70. Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Eng J Med* 337:1584-1590, 1997.
71. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 105:3017-3024, 2002.
72. Rookmaaker MB, Tolboom H, Goldschmeding R, Zwaginga JJ, Rabelink TJ, Verhaar MC. Bone-marrow-derived cells contribute to endothelial repair after thrombotic microangiopathy. *Blood* 99:1095, 2002.
73. Adams V, Lenk K, Linke A, Lenz D, Erbs S, Emmrich F, Schuler G, Hambrecht R. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arterioscler Thomp Vasc* 24:684-690, 2004.
74. George F, Brouqui PH, Boffa MC, Mutin M, Drancourt M, Brisson C, Raoult D, Sampol J. Demonstration of Rickettsia conorii-induced endothelial injury in vivo by measuring circulating cells, thrombomodulin, and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever. *Blood* 82:2109-2116, 1993.
75. Dulic –Sills A, Blunden MJ, Mawdsley J, Bastin AJ, McAuley BD, Griffiths M, Rampton DS, Yagoob MM, Macey MG, Agrawal SG. New flow cytometric technique for the evaluation of circulating endothelial progenitor cell levels in various disease groups. *Journal of Immunological Methods* 20;316(1-2):107-15, 2006.
76. Choi JH, Kim KL, Huh W, Kim B, Byun J, Suh W, Sung J, Jeon ES, Oh HY, Kim DK. Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure, *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 24(7), 1246, 2004.
77. Artigas A. Epidemiology and prognosis of acute respiratory distress syndrome. In: T.W. Evans, M.J.D. Griffiths and B. Keogh, Editors, European Respiratory Monograph: ARDS (20 ed.), Maney
78. Bull TM, Golpon H, Hebbel RP, Solovey A, Cool CD, Tuder RM, Geraci MW, Voelkel NF. Circulating endothelial cells in pulmonary hypertension. *Thromb Haemost* 90:698-703, 2003.
79. Burnham EL, Taylor WR, Ouyyumi AR, Rojas M, Bringham KL, Moss M. Increased circulating endothelial progenitor cells are associated with survival in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 854, 2005.

80. Özdoğu H, Boğa C, Kozanoğlu I, Maytalman E. Orak Hücre Anemi Hastalığında Tedaviye Cevap Vermeyen İskemik Bacak Yaralarının Tedavisinde Kök Hücre Naklinin Etkinliği. 2. Ulusal Kök Hücre Kongresi , 6-9 Eylül 2006 Trabzon, Türkiye.
81. Ozdogu H, Kozanoglu I, Boga C, Sukan A, Maytalman E, Sozer O. Therapeutic angiogenesis in a patient with sickle cell disease. *Cytotherapy* 7(suppl.1)p-68, 2005.
82. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet* 364:1343-60, 2004.
83. Sowemimo-Coker SO, Meiselman HJ, Francis RB jr. Increased circulating endothelial cells in sickle cell crisis. *Am J Hematol* 31:263-5, 1989.
84. Solevay A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel R. Circulating activated endothelial cells in sickle anemia. *N Engl J Med* 337:1584, 1997.
85. Sacco RL, Adams R, Albers G, Alberts MJ, Benavente O, Furie K, Goldstein LB, Gorelick P, Halperin J, Harbaugh R, Johnston SC, Katzan I, Kelly-Hayes M, Kenton EJ, Marks M, Schwamm LH, Tomsick T. American Heart Association/American Stroke Association Council on Stroke; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; American Academy of Neurology. Guidelines for prevention of stroke in patients with ischemic stroke or transient ischemic attack: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Council on Stroke: co-sponsored by the Council on Cardiovascular Radiology and Intervention: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline. *Circulation* 113:409-49, 2006.
86. Ozdogu H, Sozer O, Boga C, Kozanoglu I, Maytalman E, Guzey M. Flow Cytometric Evaluation of Circulating Endothelial Cells: A New Protocol for Identifying Endothelial Cells at Several Stages of Differentiation. *American Journal of Hematology* 2007. (in press)
87. Hebbel RP, Osarogiagbon R, Kaul D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. *Microcirculation* 11:129-151, 2004.
88. Stefanec T, How the endothelium and its bone marrow-derived progenitors influence development of disease. *Med. Hypotheses* 62(2); 247, 2004.
89. Khan SS, Solomon MA, McCoy JP Jr. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 64:1-8, 2005.
90. Goon PK, Boos CI, Stonelake PS, Blann AD, Lip GY. Detection and quantification of mature circulating endothelial cells using flow cytometry and immunomagnetic beads: a methodological comparison. *Thromb Haemost* 96(1):45-52, 2006.
91. Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 82:2109-2116, 1997.

92. Solovey A, Gui L, Key NS, Hebbel RP. Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia. *J Clin Invest* 1899-1904, 1998.
93. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S.(2001). Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 103(24);2885-2890. 2001,
94. Bardin N, George F, Mutin M, Brisson C, Horschowski N, Frances V, Lesaule G, Sampol J. S-Endo 1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen. *Tissue Antigens* 48:531-539, 1996.
95. Del Papa N, Colombo G, Francchiolla N, Moronetti M, Ingegnoli F, Maglione W, Camina DP, Vitali C, Fantini F, Cortelezzi A. Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 50:1296-1304, 2004.
96. Zammaretti P, Zisch AH. Adult 'endothelial progenitor cells'. Renewing vasculature. *Int J Biochem* 37;493-503, 2005.
97. Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR. Identification and Isolation of Endothelial Cells Based on Their Increased Uptake of Acetylated-Low density Lipoprotein. *J Cell Biol* 99:2034-2040, 1984.
98. Mangahas CR, dela Cruz VG, Schneider R, Jamal S. Endothelin-1 upregulates MCAM in melanocytes. *J Invest Dermatol* 123:1135-1139, 2004.
99. Conran N, Saad ST, Costa FF, Ikuta T. Leukocyte numbers correlate with plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in sickle cell disease. *Ann Hematol* 86(4): 255-61, 2007.
100. George F, Toulon P, Sampol J, Sultan Y. Detection of high levels of circulating endothelial cells in patients with sickle cell crisis. *Blood* 80:12a (abstr, suppl 1), 1992.
101. Ishizava K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Suzuki T, Mizumo S, Nakamura T, Sasaki H. Hepatocyte growth factor induces angiogenesis in injured lung through mobilizing endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 324 (1);276:2004.
102. Butthep P, Rummavas S, Wisedpanichkij R, Jindadamrongwech S, Fucharaen S, Bunyaratvej A. Increased circulating activated endothelial cells, vascular endothelial growth factor, and tumor necrosis factor in thalassemia. *Am J Hematol* 70(2);103-6:2002.

