

# Eritrosit Endotel Hücre Etkileşimlerinde CD38 ve CD31'in Rolü

## The Role of CD38 and CD31 in Red Cell Interaction with Endothelial Cells

Özlem COŞKUN,<sup>a</sup>  
Başak VAROL,<sup>b</sup>  
Rüstem NURTEN<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Biyofizik AD,  
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi  
Tıp Fakültesi, Çanakkale

<sup>b</sup>Biyofizik AD,  
İstanbul Üniversitesi  
İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul

Geliş Tarihi/Received: 24.03.2011  
Kabul Tarihi/Accepted: 10.07.2011

Bu çalışma, 22. Ulusal Biyofizik Kongresi  
(28 Eylül-1 Ekim 2010, Aydın)'nde  
poster olarak sunulmuştur.

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Özlem COŞKUN  
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi  
Tıp Fakültesi, Biyofizik AD,  
Çanakkale, TÜRKİYE/TURKEY  
ozlemcd38@hotmail.com

**ÖZET Amaç:** Endotel hücre yapısı ve fonksiyonundaki anormallikler tromboz (damar tıkanıklığı), ateroskleroz (damar sertliği) ve vaskülit (damar iltihabı) gibi kan hücre duvarı rahatsızlıklarına işaret edebilir. Bu önemli biyolojik olaylarda endotel hücrelerin rolü in vitro olarak izole edilip kültüre edilmeleriyle daha iyi anlaşılabilir. Çalışmanın temel amacı, bir ekto enzim olan CD38'in hücre yüzey reseptörleri ile etkileşerek hücre fonksiyonlarını düzenlemesinden yola çıkarak tromboz oluşum sürecindeki patolojik rolünü ortaya koymak ve sCD38'in de bu etkileşimdeki temel rolünü belirleyerek bir model sistem oluşturmaktır. **Gereç ve Yöntemler:** Radyoaktif olarak işaretlenen eritrositlerle "Human Umbilical Erythrocyte Vein Cells (HUVEC)" etkileşimine bakıldı. Western emdirim analizi ile HUVEC-eritrosit etkileşimi immünolojik olarak belirlendi. Floresan teknikler kullanılarak yapılan deneylerde eritrosit CD38'in CD31 ligandı aracılığıyla HUVEC ile etkileşimine bakıldı. Giemsa eritrosit boyası kullanılarak yapılan deneylerde HUVEC-eritrosit etkileşimi sağlıklı bireylerle aterosklerozlu ve kanserli bireyler kıyaslanarak faz kontrast mikroskopunda incelenerek belirlendi. **Bulgular:** Bu çalışmada, normal bireylere kıyasla aterosklerozlu ve kanserli bireylerde HUVEC-eritrosit etkileşiminin artış gösterdiği floresan ve faz kontrast mikroskobu ile gösterilmiş olup, ayrıca bu bulgular immünolojik bir yöntem olan bağışık emdirim yöntemiyle de desteklenmiştir. **Sonuç:** Yapılan bu çalışmaların ileride planlanan klinik destekli çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antijenler, CD31; eritrositler; CD38 antijenleri; endotel hücreler

**ABSTRACT Objective:** Abnormalities in endothelial cell structure and function may indicate the diseases such as thrombosis, atherosclerosis and vasculitis in the blood cell wall. The role of endothelial cells in these biological events was understood better with culturing. The aim of this study is to determine the pathological role of sCD38 in the process of thrombosis formation and to create a model system. **Material and Methods:** Human Umbilical Erythrocyte Vein Cells (HUVEC) interaction was observed with radioactive labelled erythrocytes. HUVEC-erythrocyte interaction was determined with Western Blot analysis and with HUVEC through CD31 ligand was showed with fluorescence microscopy technique. Moreover, this interaction was observed with phase contrast microscopy using Giemsa erythrocyte dye comparing the healthy individuals to atherosclerosis and cancer patients. **Results:** In this present study it was concluded that HUVEC-erythrocyte interaction was shown a significant enhancement in atherosclerosis and cancer patients comparing to healthy individuals by using fluorescence and phase contrast microscopy techniques. These findings were also supported with Western-Blot analysis. **Conclusion:** It is believed that our study will enlighten future planned clinical studies about cancer.

**Key Words:** Antigens, CD31; erythrocytes; antigens, CD38; endothelial cells

Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci 2011;23(3):212-20

**N**AD<sup>+</sup> glikohidrolaz, NAD<sup>+</sup>'nin nikotinamit ve ADP-riboza hidrolizini katalizleyen bir enzimdir.<sup>1</sup> Ökaryotlarda NAD<sup>+</sup> glikohidrolaz enzim sınıfının çoğu temsilcisinin membrana bağlı olarak hücre membranının dış yüzeyinde yer aldığı görülür.<sup>2</sup> Bu tür ekto-NAD<sup>+</sup> gli-

hidrolaz enzimleri arasından öne çıkan CD38, uzun yıllar insan lenfosit yüzey antijenlerinin bir temsilcisi olarak tanınmıştır. Ancak, 1990'lı yıllarda *Aplysia californica* (deniz tavşanı) siklik ADP-riboz (cADP-riboz) sentetaz enzimi ile CD38 yüzey antijeninin birincil yapıları arasında saptanan büyük benzerlik üzerine başlatılan çalışmalar, CD38'in de cADP-riboz sentetaz, ayrıca cADP-riboz hidrolaz ve NAD<sup>+</sup> glikohidrolaz etkinliklerine sahip olduğunu ortaya koymuştur.<sup>3</sup> CD38, bunun ötesinde, memelilerdeki başlıca NAD<sup>+</sup> glikohidrolaz olarak belirlenmiş ve değişik dokulardaki NAD<sup>+</sup> glikohidrolaz etkinliğinin başlıca sorumlusu olduğu gösterilmiştir.<sup>4</sup> Bununla birlikte, CD38'in özellikle kan hücrelerinin, kemik iliğindeki öncüllerinden olgun biçimlerine dönüşme sürecinde eksprese olan, hücre farklılaşması ve gelişmesinde önemli rol oynayan, bu sürecin belirli aşamalarının belirteci niteliğinde bir protein olduğu düşünülmektedir.<sup>5</sup>

Ekto enzim ailesinden olan CD38, hücre yüzey reseptörleri ile etkileşerek önemli hücre fonksiyonlarını düzenler. Daha çok, CD38'in fizyolojik uyarı durumundaki modülasyonu ve patolojik durumlardaki ekspresyonu üzerine çalışmalar yapılmıştır. CD38'in lenfosit alt birimlerindeki ekspresyonu adezyon özelliğiyle ilgilidir. CD38 özellikle integrin aracılı bağlanmada CD38<sup>+</sup> lenfositleri ve "human endothelial cell (HEC)" arasında oluşan selektin benzeri adezyonda rol oynar.<sup>6,7</sup>

CD38 ligandı olarak tanımlanan Moon-1; "human endothelial cell (HEC)" yüzeyindeki CD38 aracılı adezyonu bloke eder. Moon-1; 130 kDa molekül ağırlığında ve tek zincir olarak bulunur ve HEC, T-hücreleri, doğal öldürücü [natural killer (NK)] hücreleri, monositler ve plateletler tarafından eksprese edilirler. Molekül CD31 olarak da tanımlanmıştır.<sup>8,9</sup> CD31(PECAM-1) immünglobulin (Ig) süper ailesinin bir üyesi olarak bilinir ve HEC/lenfosit adezyon işlemine katılır.<sup>10</sup> CD31/CD38 etkileşimi moleküllerin saflaştırılmış rekombinant çözünür formları kullanılarak biyokimyasal düzeyde analiz edilmiştir.<sup>11</sup>

Endotel hücreleri, insan vücudundaki kan damarlarını kaplayan hücrelerdir. Lökosit adezyonu ve inflamasyonunun kontrolü ve denetiminden, tromboz ve fibrinolizis arasındaki dengenin de-

vamından sorumlu hücrelerdir. Endotel hücre; fizyolojik akardengede, kan damarı geçirgenliği, fizyolojik ve patolojik uyarılara kan damarının yanıtında önemli rol oynar.<sup>12</sup>

Endotel hücre yapısı ve işlevlerindeki anormallikler, tromboz (damarın pıhtı oluşturarak tıkanması), ateroskleroz (damar sertliği) ve vaskülit (damar iltihabı) gibi kan hücre duvarı rahatsızlıklarına işaret edebilir. Bu önemli biyolojik olaylarda endotel hücrelerin rolü in vitro olarak izole edilip kültüre edilmeleriyle daha iyi anlaşılır.<sup>13</sup>

Endotel hücre işlevlerini araştırmada bir model sistem oluşturduğu belirtilen kordon damarı endotel hücreleri, insan göbek kordonundan [human umbilical vein endothelial cell culture (HUVEC)] kollajenaz sindirimi sonrası elde edilir. Hücre büyüme siklusunda hücrelerin büyümesi için gerekli süre 92 saattir. Transmisyon elektron mikroskopunda, kültürde çoğaltılan endotel hücrelerinin in situ endotel hücrelerinin sitoplazmik özelliklerini içerdikleri görülmüştür. Bu özellikler aynı zamanda göbek kordonundan elde edilen endotel hücrelerinde de gözlenmiştir. Düz kas hücreleri ve fibroblastlarda in situ veya kültür ortamında ise görülmemiştir. Kültür endotel hücreleri ABH antijenlerini içermektedir ki, bunlar düz kas hücreleri ve fibroblastlarda görülmez. Kültür endotel hücreleri yüksek miktarlarda düz kas aktomyozin içermektedir.<sup>14</sup>

Sonuç olarak, CD38 değişik kan popülasyonları ve HUVEC arasındaki selektin tipi adezyona aracılık eder. Endotel dokunun sentezlediği adezyon molekülleri olan selektinler reseptör-ligand etkileşimi sonrası lökositlerin iki endotel hücre arasından dokuya geçmesinde rol oynamaktadır. CD38'in de selektin gibi davrandığı gösterilmiştir. Bu konuda yapılan son çalışmalar, HUVEC'in de CD38 için iyi bir yüzey reseptörü olabileceğini ortaya koymuştur.<sup>15</sup>

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### HÜCRELERİN HAZIRLANMASI VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

Endotel hücreleri, insan göbek kordonu damarlarından elde edildi. Kordon, doğum sonrası (0.14 M NaCl; 0.004 M KCl; 0.001 M fosfat tamponu pH 7.4; 0.011 M glukoz) içeren steril kordon tamponu içine

alındı ve işlem başlayana kadar +4 °C'de bekletildi. Kordonu saklama süresi literatürde ortalama bir saat olarak belirlenmiş. Üç saatten fazla bekletildiğinde bozulduğu belirtildi.<sup>12</sup> Göbek kordonu damarına 2 cm uzunluğundaki bir kelebek yardımı ile girilerek, damar 100 mL kordon tamponu ile yıkandı. Hücreler, %0,1 kollajenaz ile 10 dakika inkübasyon sonrası elde edildi. İnkübasyon sonrası, endotel hücrelerini içeren kollajenaz eriyiği kordondan 30 mL kordon tamponu ile toplandı. Hücreler, 50 mL'lik (Falcon) tüplerde %1 penisilin streptomisin, %20 FBS içeren 10 mL medyum 199'da 250 x g'da 10 dakika santrifüjlendi. Endotel hücreleri, %20 FCS, penisilin (200 U/mL) streptomisin (200 U/mL) ve L-glutamin (2 mM) içeren medyum 199'da kültüre alındı.<sup>12</sup>

### POLİAKRİLAMİD (SDS-PAGE) JEL ELEKTROFOREZİ

Eritrositlerle HUVEC'lerin etkileşimi; sağlıklı ve CEA değeri yüksek bireylerden alınan kan örneklerinden elde edilen lizatların denatürasyon (denatüre edici tampon ilave edilerek, sonrasında örnekler kaynatılarak) işlemi sonrası SDS-PAGE yöntemiyle görüntülenmesini takiben yapılan Western emdirim ile analiz edildi. Molekül ağırlığı standartları olarak (BSA) ( $M_r$  66 kDa), ovalbumin ( $M_r$  45 kDa) ve karbonik anhidraz ( $M_r$  29 kDa) kullanıldı. Elektroforez sonrası, proteinler Coomassie Parlak Mavis ile oda sıcaklığında 30 dakika süre ile boyandı.<sup>16</sup>

### WESTERN EMDİRİM YÖNTEMİ

HUVEC-eritrosit etkileşimi SDS-PAGE sonrası anti-CD31 varlığında ve yokluğunda normal ve kanserli hastalarda yapılan Western emdirim analizi ile belirlendi. Elektroforez işlemi sonrası bir jel örneği boyandı. Diğer boyanmamış jel; nitroselüloz membran ve 3 MM Whatman filtre kâğıtları arasına yerleştirildi. Oluşturulan sandviç düzeneğe aktarım tamponu ile doldurulmuş tankta (transblot) 16 volt gerilimde 16 saat süreyle aktarım işlemi uygulandı. Aktarımdan sonra nitroselüloz membran; özgül olmayan bağlanmaları önlemek için %0,5 BSA içeren Tris tamponlu tuz çözeltisi (TBST) ile oda sıcaklığında bir saat çalkalanarak doyuruldu. Membran; TBST çözeltisi ile iki kez yıkandıktan sonra anti-CD38 H1157 (birinci antikor) ve paralel olarak anti-CD31 (P2B1) ile oda sıcaklığında bir saat çalkalandı.

Membran TBST çözeltisi ile iki kez yıkandı. Alkalen fosfataza bağlı fare Ig-karşıtı Ig 1000 kez sulandırılarak ortama eklendikten sonra membran bir saat oda sıcaklığında çalkalanarak bekletildi. Tekrar TBST çözeltisi ile iki kez yıkandı. Alkalen fosfataz substratı BCIP (20 mg/mL) ve NBT (50 mg/mL) (%70 dimetil formamit içinde çözülerek) substrat tamponu içinde çözüldükten sonra membran bu ortama alınarak oda sıcaklığında, karanlıkta çalkalanarak bantların oluşması sağlandı. Membran, 20 mM Tris pH: 8,0; 5 mM EDTA pH: 8,0 içine alınarak tepkime durduruldu.<sup>12</sup>

### FLORESAN MİKROSKOBU İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

HUVEC (insan göbek kordonu endotel hücreleri-ATCC ECV 304 hücre soyu)'de CD38'in yerini belirlemek ve CD31 ile etkileşimini ortaya koymak amacıyla hücreler ( $1 \times 10^6$ ) 2 mL DMEM F-12 ortamında 6'lık kuyulardaki lameller üzerine bir gün önceden ekilerek yapışması sağlandı. PBS tamponu ile yıkama işlemi sonrası membran geçirgenliğini arttırmak amacı ile 30 dakika %0,1 Triton-X-100 PBS ortamında bekletildi. Tespit çözeltisi (%2 paraformaldehit-PBS) ile bir saat bekletmeden sonra hücreler CD38'e özgül 1. Antikor (Abcam) 1:500, FITC işaretli IgG 2. Antikor (Santa Cruz) 1:100 oranında seyreltilerek birer saat süre ile bekletildi. Aynı zamanda hücre çekirdeğinin belirlenmesi amacıyla 5 mg/mL DAPI ile boyandı (Macaristan PECS Üniversitesi-Biyofizik Anabilim Dalından alınmış protokol kullanıldı).

### ERİTROSİT-HUVEC ETKİLEŞİMİ

İstanbul Üniversitesi (İÜ) İstanbul Tıp Fakültesi Cerrahi Ana Bilim Dalından alınan CEA değeri yüksek olan kan örneği [daha önceki çalışmalarda CD38 (NAD glikohidrolaz) aktivitesi ile CEA değeri arasında ilişkiyi belirlemeye yönelik çalışmalardan elde edilen bulgulardan hareketle] seçildi. Ayrıca, İÜ İstanbul Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Ana Bilim Dalından aterosklerozda HUVEC-eritrosit etkileşimini belirlemek amacıyla ateroskleroz teşhisi konmuş hasta kan örneği ve gönüllü bireylerden normal kan örneği alındı. 2000 devir/dakika'da santrifüj sonrası palette toplanan eritrositler alındı. Eritrosit ve HUVEC etkileşimi [<sup>14</sup>C] NAD-adenozin ile işaretleme yapılarak rad-

yoaktif içeriği sıvı sentilasyon cihazında (TriCarb) sayıldı. 24'lük "plate"lere 500.000 HUVEC 1 mL DMEM F12 medyum içine bir gün önceden ekildi. Ertesi gün yapışkan olan hücelere CEA değeri yüksek ve normal kandan elde edilen eritrositler ( $1 \times 10^6$ ) ekildi. Bir saat  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübasyon sonrası bu hücelere 800 devir/dakika'da 30 saniye santrifüjlendi. 20 dakika  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilerek üst sıvıları sayıldı.

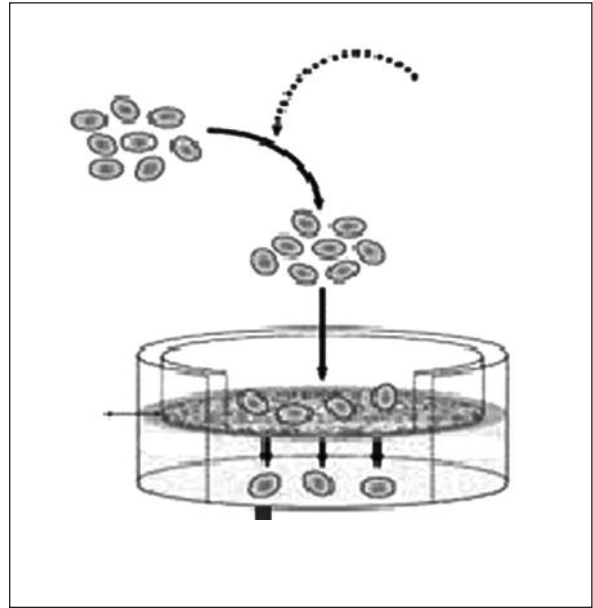
Endotel-HUVEC etkileşimi sonrası üst sıvı "transwell" adı verilen özel bir membran sisteminde geçirilerek süzüldü (Şekil 1).<sup>17</sup>

### FAZ KONTRAST MİKROSKOBU İLE YAPILAN ÇALIŞMALAR

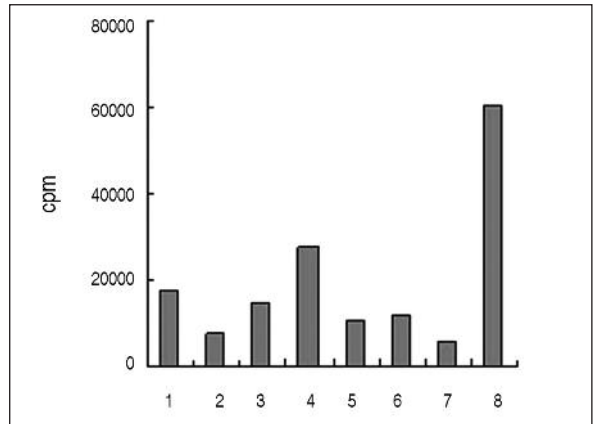
İstanbul Üniversitesi (İÜ) İstanbul Tıp Fakültesi Cerrahi Ana Bilim Dalından alınan CEA değeri yüksek olan kan örneği [daha önceki çalışmalarda CD38 (NAD glikohidrolaz) aktivitesi ile CEA değeri arasında ilişkiyi belirlemeye yönelik çalışmalardan elde edilen bulgulardan yola çıkılarak] alındı. Ayrıca, İÜ İstanbul Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Ana Bilim Dalından aterosklerozda HUVEC-eritrosit etkileşimini belirlemek amacıyla ateroskleroz teşhisi konmuş hasta kan örneği ve gönüllü bireylerden normal kan örneği alındı. 2000 devir/dakika'da santrifüj sonrası palette toplanan eritrositler alındı. HUVEC hücreleri ( $5 \times 10^5$ ) 1 ml Medium 199 içine 1 gün önceden ekilerek lamellerin üstüne yapışmaları sağlandı. Ertesi gün, eritrositler ( $1 \times 10^6$ ) Giemsa eritrosit boyası ile 5 mg/ml olacak şekilde oda sıcaklığında 20 dakika süre ile boyandı. Etkileşim Anabilim Dalımızda bulunan faz kontrast mikroskopu ile görüntülendi.

### BULGULAR

Yapılan çalışmada, yöntemlerde anlatıldığı şekilde radyoaktif olarak işaretlenen eritrositlerin ( $1 \times 10^6$ ) 1/3'ünün HUVEC (500.000 hücre) ile etkileştiği, bunun yanı sıra serumda bulunan serbest CD38'in yarışmalı olarak HUVEC eritrosit etkileşimini inhibe ettiği görülmüştür (Şekil 2). Çalışmada HUVEC ile eritrosit etkileşiminde ~18.000 devir/dakika olan radyoaktif sayım değerinin (Şekil 2-1. sütun), ortama serum ilave edildiğinde ~% 45 azaldığı (Şekil 2-2. sütun), ortama artan miktarda serum ilavesiyle beraber artan mik-



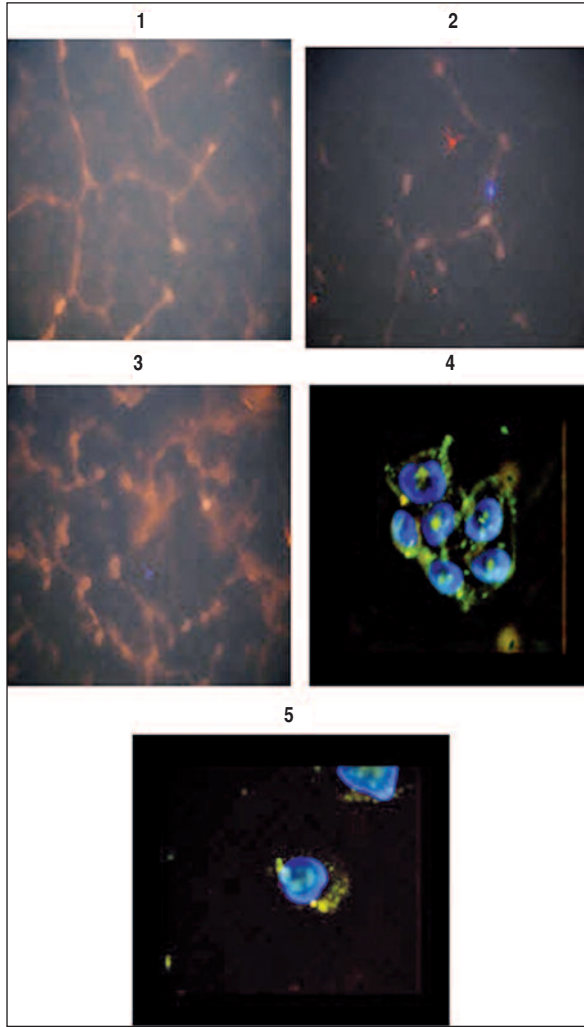
ŞEKİL 1: Eritrosit endotel hücre etkileşiminde kullanılan "transwell" adı verilen özel membran sistemi.



ŞEKİL 2: 1. sütun: HUVEC + eritrosit, 2. sütun: HUVEC + eritrosit + 100 µL serum, 3. sütun: HUVEC + eritrosit + 100 µL serum + 1 µL antikor, 4. sütun: HUVEC + eritrosit + 100 µL serum + 10 µL antikor, 5. sütun: HUVEC + eritrosit + 100 µL serum + 50 µL antikor, 6. sütun: HUVEC + eritrosit + 10 µL antikor 7. sütun: HUVEC + eritrosit + 100 µL antikor, 8. sütun: HUVEC (-) + eritrosit + 100 µL antikor.  
HUVEC: İnsan göbek kordonu endotel hücreleri.

tarda antikor ilavesiyle de etkileşimin arttığı gözlemlendi (Şekil 2-3, 4. sütun). Ortama ilave edilen antikor miktarının artışıyla serumdaki serbest CD38 ile yarışmalı olarak etkileşimde azalma gözlemlendi (Şekil 2-5, 6, 7. sütun). Pozitif kontrol olarak HUVEC (-) eritrosit-antikor (antiCD31) etkileşimi gösterildi (Şekil 2-8. Sütun).





**ŞEKİL 3:** HUVEC'de CD38'in yerinin ve CD31 ile etkileşiminin belirlenmesi. Floresan mikroskopu görüntüleri (1, 2 ve 3) no'lu fotoğraflarda HUVEC'lerde Rhodamin işaretli CD31 (PECAM), 4 no'lu fotoğrafta HUVEC yüzeyinde bulunan CD31 ile etkileşen CD38 molekülü (mavi), 5 no'lu fotoğrafta FITC ile işaretlenmiş CD38 (yeşil), DAPI ile işaretlenmiş çekirdek (mavi) görülmektedir (x100).

HUVEC: İnsan göbük kordonu endotel hücreleri.

Floresan teknikler kullanılarak yapılan deneylerde anti-CD31 varlığında hücre yüzeyi kapandığından eritrosit etkileşimi görülmedi. Bu bulgu, eritrosit CD38'in CD31 ligandı aracılığı ile HUVEC hücreleriyle etkileştiğini doğrulamaktadır (Şekil 3-1, 2, 3). Negatif kontrol olarak anti-CD31 kullanılmadığında ise eritrosit CD38'in CD31 aracılı olarak HUVEC hücreleri ile etkileştiği görüldü (Şekil 3-4, 5).

#### WESTERN EMDİRİM ANALİZİ İLE HUVEC-ERİTROSİT ETKİLEŞİMİNİN BELİRLENMESİ

Sağlıklı ve CEA değeri yüksek bireylerden alınan

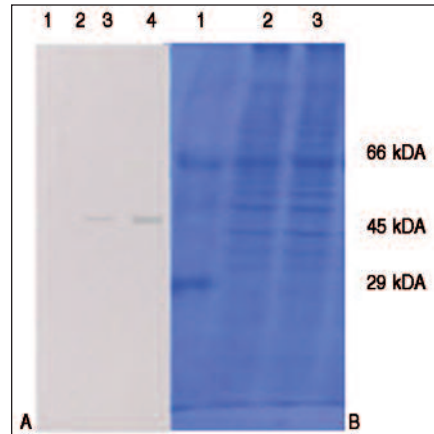
kan örneklerinden elde edilen eritrositlerle HUVEC'lerin etkileşimi, SDS- PAGE (Şekil 4A) sonrası yapılan Western emdirim (immünblot) ile belirlendi.

Western analizi sonucunda anti-CD31 varlığında hem sağlıklı bireyde hem de kanserli hasta örneğinde sinyal görülmedi (Şekil 4B-1, 2). Anti-CD31 yokluğunda ise hem sağlıklı bireyde hem de kanserli hasta örneğinde 45 kDa'a karşılık gelen sinyal gözlemlendi (Şekil 4B-3).

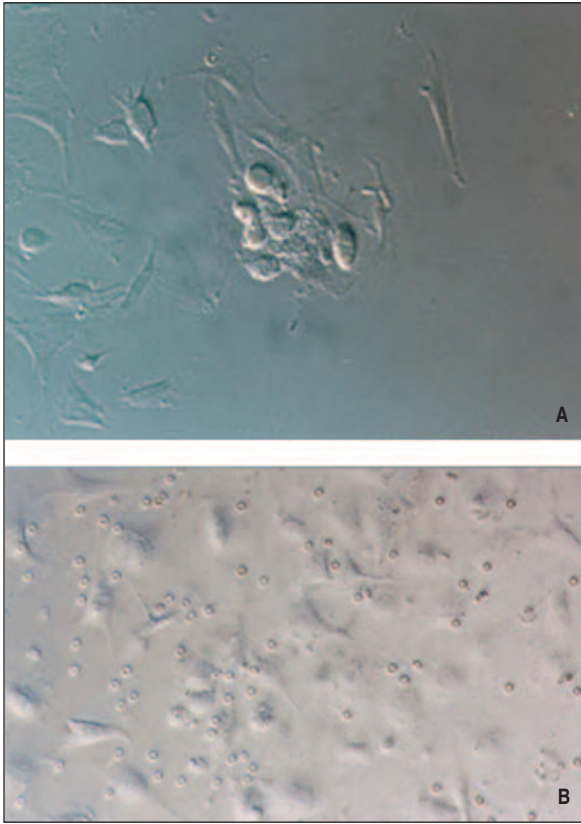
Floresan tekniklerin yanında Faz kontrast mikroskopu ile de çalışmalar yapılmıştır. Ateroskleroz teşhisi konmuş bireylerden ve normal bireylerden elde edilen eritrositler ile HUVEC-eritrosit etkileşimi incelendiğinde ateroskleroz teşhisi konmuş bireylerde bu etkileşimin arttığı görüldü (Şekil 5B).

Ayrıca, bu etkileşim paralel olarak yüksek CEA değerine sahip bireylerden alınan kan örneklerinden elde edilen eritrositlerle de gerçekleştirilmiştir. Yüksek CEA değerine sahip bireylerde bu etkileşimin fazla olduğu izlendi (Şekil 6B).

Giemsa eritrosit boyası kullanılarak yapılan deneylerde HUVEC-eritrosit etkileşiminin sağlıklı bireylere kıyasla aterosklerozlu ve kanserli bireylerde daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 7B, C).



**ŞEKİL 4:** HUVEC-eritrosit etkileşiminin anti-CD31 varlığında ve yokluğunda normal ve kanserli hastada **A- Western emdirim analizi görüntüsü (anti-CD31 varlığında)** 1- Sağlıklı bireylerde HUVEC-eritrosit etkileşimi 2- Kanserli hastada HUVEC-eritrosit etkileşimi. (**anti-CD31 yokluğunda**) 3- Sağlıklı bireyde HUVEC-eritrosit etkileşimi 4- Kanserli hastalarda HUVEC-eritrosit etkileşimi. **B-1-SDS-PAGE sonrası Coomassie parlak mavisi boyama görüntüsü.** (1- Standart proteinler BSA-66 kDa, ovalbumin-45 kDa, karbonik anhidraz-29 kDa) 2- Sağlıklı bireyden elde edilen HUVEC-eritrosit etkileşimi. 3- Kanserli hastada HUVEC-eritrosit etkileşimi.



**ŞEKİL 5:** Faz-kontrast mikroskobunda HUVEC-eritrosit etkileşiminin gösterilmesi. A. Sağlıklı bireyden alınan kan örneği. B. Ateroskleroz teşhisi konmuş hasta kan örneği kullanılarak elde edilen görüntüler (x40).

CEA'lı ve aterosklerozlu hasta örneğinde normal bireye kıyasla; eritrosit sayısındaki artışa paralel olarak HUVEC ile eritrosit etkileşiminde artış gözlemlendi (Şekil 8).

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada CD31 ve CD38 yüzey antijeni arasındaki ilişkiyi normal ve CEA'sı yüksek bireylerde, kalp-damar tıkanıklığı teşhisi konmuş hastalarda inceleyerek patolojik durumlardaki moleküller arası etkileşimdeki değişim incelendi.

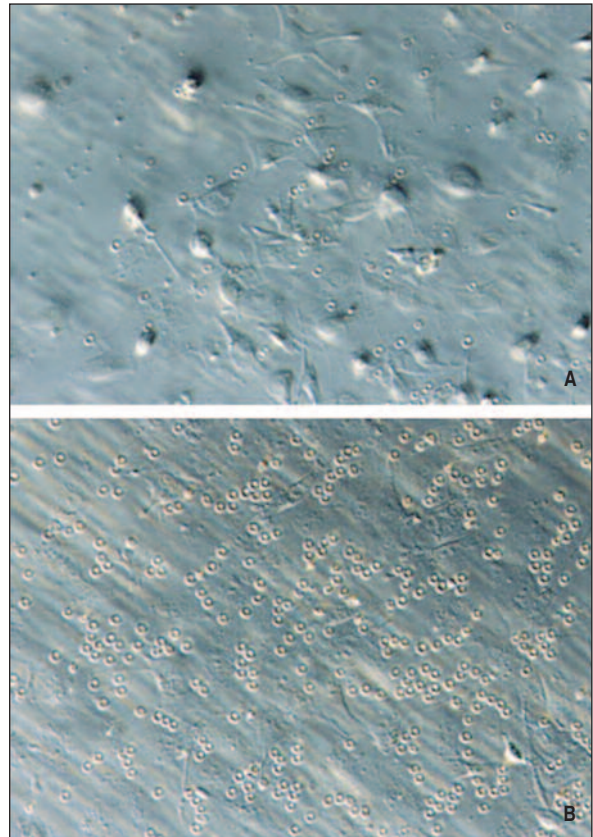
Ekto enzim ailesinden olan CD38, hücre yüzey reseptörleri ile etkileşerek önemli hücre işlevlerini düzenler. Daha çok, CD38'in fizyolojik uyarı durumundaki modülasyonu ve patolojik durumlardaki anlatımı üzerine çalışmalar yapılmıştır.<sup>18</sup>

CD38'in lenfosit alt birimlerindeki anlatım adezyon özelliğiyle ilgilidir. CD38 özellikle, integrin aracılı bağlanmada CD38<sup>+</sup> lenfositleri ve HEC

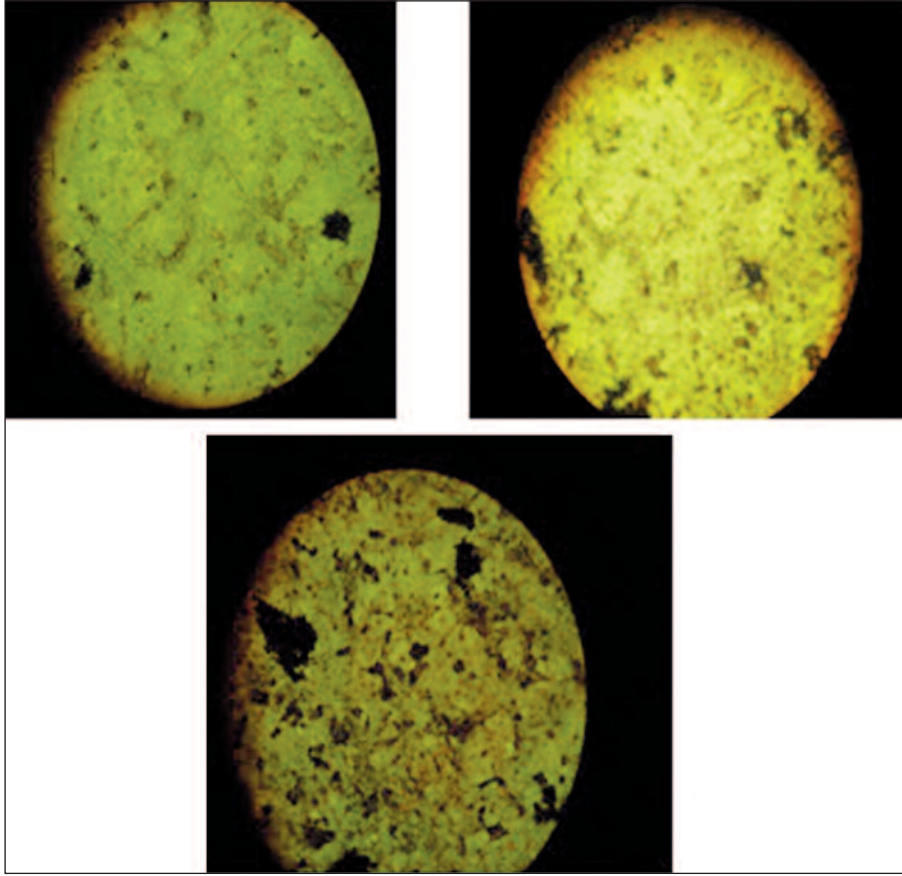
arasında oluşan selektin benzeri adezyonda rol oynar.<sup>19</sup>

İnsan CD38 ligandı olan CD31 (PECAM-1) plateletler, monositler, nötrofiller ve endotel hücrelerin yüzeyinde anlatım bularak adezyon aracılı biyolojik olaylarda önemli rol oynamaktadır. mAb Moon-1 (anti CD31) CD38 aracılı hücre adezyonunu inhibe eder. CD31 Ig süperailisinin bir üyesi olup, mAb Moon-1 tarafından tanınmaktadır.<sup>20</sup> Yapmış olduğumuz floresan mikroskobu deneylerinde, Moon-1 varlığında hücre yüzeyi kapatılarak CD31 aracılı CD38 etkileşiminin gerçekleşmediği gösterildi.

NAD<sup>+</sup> glikohidrolaz, NAD<sup>+</sup>'nin nikotinamit ve ADP-riboza hidrolizini katalizleyen bir enzimdir.<sup>21</sup> Ökaryotlarda NAD<sup>+</sup> glikohidrolaz enzim sınıfının çoğu temsilcisinin membrana bağlı olarak hücre membranının dış yüzeyinde yer aldığı görülür.<sup>22</sup> Bu tür ekto-NAD<sup>+</sup> glikohidrolaz enzimleri arasından öne çıkan CD38, uzun yıllar insan lenfosit yüzey antijen-



**ŞEKİL 6:** Faz-kontrast mikroskobunda HUVEC-eritrosit etkileşiminin gösterilmesi. A. Sağlıklı bireyden alınan kan örneği. B. Yüksek CEA değerine sahip hasta kan örneği kullanılarak elde edilen görüntüler (x40).

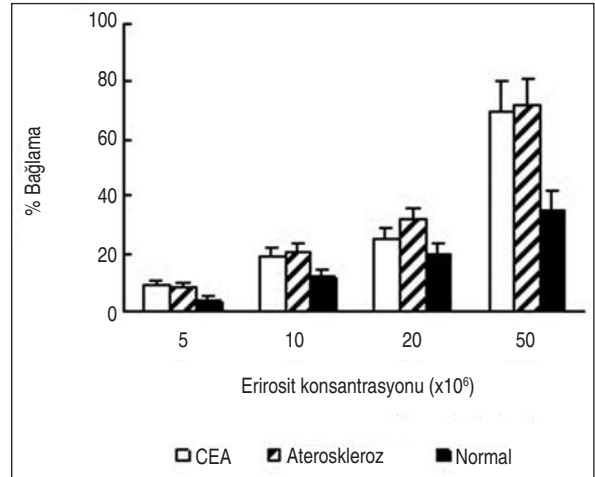


**ŞEKİL 7:** Faz kontrast mikroskopunda Giemsa boyama sonrası HUVEC-eritrosit etkileşiminin gösterilmesi. **A.** Sağlıklı bireyden alınan kan örneği, **B.** Ateroskleroz teşhisi konmuş hasta kan örneği, **C.** Yüksek CEA değerine sahip hasta kan örneği kullanılarak elde edilen görüntüler (x40).

lerinin bir temsilcisi olarak tanınmıştır.<sup>23-25</sup> CD38 bunun ötesinde, memelilerdeki başlıca NAD<sup>+</sup> glikohidrolaz olarak belirlenmiş ve değişik dokulardaki NAD<sup>+</sup> glikohidrolaz etkinliğinin başlıca sorumlusu olduğu gösterilmiştir.<sup>26</sup> Bununla birlikte CD38'in özellikle kan hücrelerinin, kemik iliğindeki öncüllerinden olgun biçimlerine dönüşme sürecinde eksprese olan, hücre farklılaşması ve gelişmesinde önemli rol oynayan, bu sürecin belirli aşamalarının belirteci niteliğinde bir protein olduğu düşünülmektedir.<sup>27,28</sup>

Yaptığımız çalışmada, eritrosit membranının dış yüzeyinde yer alan ve NAD glikohidrolaz etkinliğine sahip CD38'in CD38 ligandı olan ve endotel hücre yüzeyinde bulunan CD31 üzerinden etkileşime girdiği gösterilmiştir.

Endotel, tüm damar düz kaslarında bulunan damar duvarını kaplayan ince skuamöz epitelyum tabakasıdır. Endotel hücreleri insan vücudundaki kan damarlarını kaplayan hücrelerdir. Endotel



**ŞEKİL 8:** Endotel hücresi ile eritrositlerin etkileşimi. [<sup>14</sup>C] NAD-adenozin ile radyoaktif olarak işaretlenen HUVEC artan sayıda eritrosit ile bir saat inkübe edildi. Inkübasyon sonrası santrifüjlenerek üst sıvıdaki radyoaktif içerik sayıldı.

hücre; fizyolojik akardengede, kan damarı geçirgenliği, fizyolojik ve patolojik uyarılara kan damarının yanıtında önemli rol oynar.<sup>29</sup> Lökosit



adezyonu ve inflamasyonunun kontrolü ve denetiminden, tromboz ve fibrinolizis arasındaki denge- nin devamından sorumlu hücrelerdir. Vazodilatör ve vazokonstrüktör substratların yapımında etkili olup vasküler homeostazın sağlanmasında temel rol oynar. Son yapılan çalışmalarda, başta ateroskleroz olmak üzere birçok hastalıkta endotelin rolü olduğu ortaya çıkmıştır.<sup>30</sup>

Endotel hücre yapısı ve fonksiyonundaki anormallikler tromboz (damarın pıhtı oluşturarak tıkanması), ateroskleroz (damar sertliği) ve vaskülit (damar iltihabı) gibi kan hücre duvarı rahatsızlıklarına işaret edebilir. Bu önemli biyolojik olaylarda endotel hücrelerin rolü in vitro olarak izole edilip kültüre edilmeleriyle daha iyi anlaşılır.<sup>31</sup>

CD31'in; endotel hücre-hücre etkileşimine aracılık ettiği ve aynı zamanda lökosit ve endotel hücre arasındaki etkileşimi de düzenlediği ifade edilmiştir. Eritrosit endotel etkileşiminde özellikle damar hasarı, diyabet, talasemi gibi patolojik du-

rumlarda ve tümör dokularında CD31'in arttığı gösterilmiştir.<sup>32</sup> Ayrıca, CD31'in yanı sıra kanser hücrelerinde CD38 anlatım seviyesinin arttığı da bilinmektedir.<sup>33</sup> Normal eritrosit davranışı ile kıyaslandığında, eritrositin anormal adezyonunun damar tıkanıklığı mekanizmasında önemli olduğu düşünülmektedir.<sup>34</sup>

Bu çalışmada, normal bireylere kıyasla aterosklerozlu ve kanserli bireylerde HUVEC eritrosit etkileşiminin artış gösterdiği floresan ve faz kontrast mikroskopu ile gösterilmiştir. Bu bulgular ayrıca immünolojik bir yöntem olan bağışık emdirim yöntemiyle de desteklenmiştir. Yapılan bu çalışmaların ileride planlanan klinik destekli araştırmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

### Teşekkür

*Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 623 proje numarası ile desteklenmiştir.*

## KAYNAKLAR

- Ziegler M, Jorcke D, Schweiger M. Identification of bovine liver mitochondrial NAD<sup>+</sup> glycohydrolase as ADP-ribosyl cyclase. *Biochem J* 1997;326(Pt 2):401-5.
- Coşkun Ö, Nurten R. [Purification of NAD<sup>+</sup> glycohydrolase enzyme from erythrocyte membrane]. *Türkiye Klinikleri J Cardiovasc Sci* 2010;22(3):318-23.
- Korkut C, Yalçıntepe L, Kiremit-Korkut N, Uzun-Altınöz S, İşsever S, Gümüşel F, et al. Serum proteins with NAD<sup>+</sup> glycohydrolase activity and anti-CD38 reactivity--elevated levels in serum of tumour patients. *Cancer Lett* 1998;126(1):105-9.
- Albeniz IU, Nurten R, Bermek E. ADP-ribosylation of serum proteins: evaluation as a potential tumor marker. *Cancer Lett* 1996;108(2): 239-45.
- Deaglio S, Mehta K, Malavasi F. Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leuk Res* 2001;25(1):1-12.
- Mehta K, Shahid U, Malavasi F. Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB J* 1996;10(12):1408-17.
- Ergüler G, Demir N, Demir R. [Structural properties and function of adhesion molecules]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2002;22(3):313-27.
- Chiba R, Nakagawa N, Kurasawa K, Tanaka Y, Saito Y, Iwamoto I. Ligation of CD31 (PECAM-1) on endothelial cells increases adhesive function of alphabeta3 integrin and enhances beta1 integrin-mediated adhesion of eosinophils to endothelial cells. *Blood* 1999;94(4):1319-29.
- Saygılı Ö, Gültekin F. [Intracellular adhesion cell]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 1999;19(6): 362-5.
- Harry BL, Sanders JM, Feaver RE, Lansey M, Deem TL, Zarbock A, et al. Endothelial cell PECAM-1 promotes atherosclerotic lesions in areas of disturbed flow in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(11): 2003-8.
- Tete' S, Mastrangelo F, Grimaldi S, Costanzo G, Salini L, Speranza L, et al. Immunohistochemical evaluation of CD31 in human cystic radicular lesions and in keratocysts. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2005;18(3 Suppl):39-45.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973;52(11):2745-56.
- Horenstein AL, Stockinger H, Imhof BA, Malavasi F. CD38 binding to human myeloid cells is mediated by mouse and human CD31. *Biochem J* 1998;330 ( Pt 3):1129-35.
- Bilsel S, Erşahin C, Taga Y, Emerk K. Subcellular localization of radioactively labelled defibrotide in cultured endothelial cells. *Thromb Res* 1992;66(4):385-90.
- Deaglio S, Morra M, Mallone R, Ausiello CM, Prager E, Garbarino G, et al. Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *J Immunol* 1998;160(1):395-402.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.
- Gallay N, Anani L, Lopez A, Colombat P, Binet C, Domenech J, et al. The role of platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31) and CD38 antigens in marrow microenvironmental retention of acute myelogenous leukemia cells. *Cancer Res* 2007;67(18):8624-32.
- Funaro A, Horenstein AL, Calosso L, Morra M, Tarocco RP, Franco L, et al. Identification and characterization of an active soluble form of human CD38 in normal and pathological fluids. *Int Immunol* 1996;8(11):1643-50.
- Piali L, Hammel P, Uherek C, Bachmann F, Gisle RH, Dunon D, et al. CD31/PECAM-1 is a ligand for alpha v beta 3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J Cell Biol* 1995;130(2):451-60.



20. Deaglio S, Dianzani U, Horenstein AL, Fernández JE, van Kooten C, Bragardo M, et al. Human CD38 ligand. A 120-KDA protein predominantly expressed on endothelial cells. *J Immunol* 1996;156(2):727-34.
21. Zocchi E, Franco L, Guida L, Calder L, De Flora A. Self-aggregation of purified and membrane-bound erythrocyte CD38 induces extensive decrease of its ADP-ribosyl cyclase activity. *FEBS Lett* 1995;359(1):35-40.
22. Malavasi F, Funaro A, Roggero S, Horenstein A, Calosso L, Mehta K. Human CD38: a glycoprotein in search of a function. *Immunol Today* 1994;15(3):95-7.
23. Funaro A, Malavasi F. Human CD38, a surface receptor, an enzyme, an adhesion molecule and not a simple marker. *J Biol Regul Homeost Agents* 1999;13(1):54-61.
24. Ferrero E, Malavasi F. Human CD38, a leukocyte receptor and ectoenzyme, is a member of a novel eukaryotic gene family of nicotinamide adenine dinucleotide+-converting enzymes: extensive structural homology with the genes for murine bone marrow stromal cell antigen 1 and aplysian ADP-ribosyl cyclase. *J Immunol* 1997;159(8):3858-65.
25. Howard M, Grimaldi JC, Bazan JF, Lund FE, Santos-Argumedo L, Parkhouse RM, et al. Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science* 1993;262(5136):1056-9.
26. Polzonetti V, Pucciarelli S, Vita A, Vincenzetti S, Natalini P. CD38 in bovine lung: A multi-catalytic NADase. *J Membr Biol* 2009;227(3):105-10.
27. Zocchi E, Franco L, Guida L, Benatti U, Bargellesi A, Malavasi F, et al. A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD<sup>+</sup> glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;196(3):1459-65.
28. Mehta K, Shahid U, Malavasi F. Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB J* 1996;10(12):1408-17.
29. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf)* 2009;196(2):193-222.
30. Torun E, Bayram F. [Endothelium as an endocrine organ and role of endothelin in hypertension]. *Erciyes Medical Journal* 2004;26(3):126-31.
31. Bonomini M, Sirolli V, Gizzi F, Di Stante S, Grilli A, Felaco M. Enhanced adherence of human uremic erythrocytes to vascular endothelium: role of phosphatidylserine exposure. *Kidney Int* 2002;62(4):1358-63.
32. Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(12):2514-23.
33. Albeniz I, Demir O, Nurten R, Bermek E. NAD glycohydrolase activities and ADP-ribose uptake in erythrocytes from normal subjects and cancer patients. *Biosci Rep* 2004;24(1):41-53.
34. Sultana C, Shen Y, Rattan V, Johnson C, Kalra VK. Interaction of sickle erythrocytes with endothelial cells in the presence of endothelial cell conditioned medium induces oxidant stress leading to transendothelial migration of monocytes. *Blood* 1998;92(10):3924-35.