

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

**İNSAN KORPUS KAVERNOZUM HÜCRE  
KÜLTÜRÜ OLUŞTURULMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
DR. HATİCE ARIKAN**

**İZMİR-2008**

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

# İNSAN KORPUS KAVERNOZUM HÜCRE KÜLTÜRÜ OLUŞTURULMASI

UZMANLIK TEZİ  
DR. HATİCE ARIKAN

TEZ SORUMLUSU: Doç. Dr. AYKUT KEFİ

İZMİR-2008

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım sayın hocalarım başta Prof. Dr. Ahmet Adil Esen ve Prof. Dr. İlhan Çelebi olmak üzere, Prof. Dr. Murat Sade, Prof. Dr. Ziya Kırkalı, Prof. Dr. Uğur Mungan, Doç. Dr. Güven Aslan, Doç. Dr. Aykut Kefi ve Öğr. Gör. Uzm. Dr. Ömer Demir'e ayrıca Prof. Dr. Kutsal Yörükoğlu, Prof. Dr. Mustafa Seçil, Doç. Dr. Burçin Tuna'ya teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında her aşamada büyük desteklerini gördüğüm, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan hocalarım Prof. Dr. Ahmet Adil Esen, Doç. Dr. Aykut Kefi, Yard. Doç. Dr. Nergis Murat, Öğr. Gör. Uzm. Dr. Ömer Demir ve sevgili arkadaşım Dr. Sinem Evcim'e ayrıca teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince her zaman büyük bir uyum içinde çalıştığım, hem ilginç, hem keyifli anıları paylaştığım; Uzm. Dr. Bora İrer, Uzm. Dr. Hikmet Köseoğlu, Uzm. Dr. Serdaç Çimen, Uzm. Dr. İsmail Özdemir, Uzm. Dr. Ahmet Cihan, Dr. Asif Cahangirov, Uzm. Dr. Ozan Bozkurt, Dr. Bilgin Öztürk, Dr. Ruhi Güngör, Dr. Elnur Mammadov, Dr. Önder Çınar, Dr. Onur Kizer'e, klinik, poliklinik ve ameliyathane hemşireleri ve personel arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dönem arkadaşlarım, her zaman samimiyetle desteklerini gördüğüm, iyi ve kötü günlerimizde bir kez bile tatsızlık yaşamadığım, sevgili dostlarım Dr. Asif Cahangirov, Uzm. Dr. Ozan Bozkurt'a teşekkürler...

Bugünlere gelmemde karşılıksız destekleri ve fedakârlıklarını esirgemeyen sevgili annem Edibe Sıçramaz ve sevgili babam Rahmi Sıçramaz'a sonsuz teşekkürler...

Ve sevgili eşim Dr. Alper Arıkan'a teşekkürler...

## İÇİNDEKİLER

1. Tablo ve Şekil listesi.....	II
2. Resim ve Grafik listesi .....	III
3. Kısaltmalar.....	IV
4. Özet.....	1
5. Özet (İngilizce) .....	2
6. Giriş ve Amaç.....	3
7. Genel Bilgiler.....	3
8. Gereç ve Yöntemler.....	21
9. Bulgular.....	29
10. Tartışma .....	42
11. Sonuç ve Öneriler.....	48
12. Kaynaklar.....	49

## **TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ**

**Şekil 1:** NO'nun sentezi ve etki mekanizması

**Şekil 2:** Kaveolin ve fonksiyonu

**Şekil 3:** ABCA'nın ters kolesterol metabolizmasındaki fonksiyonu

**Tablo 1:** 3 no'lu hastanın dokularının kültür Şeması

**Tablo 2:** 4 no'lu hastanın dokularının kültür Şeması

## **RESİM ve GRAFİK LİSTESİ**

**Resim1:** Korpus kavernozum hücre kültüründe 5. gün bakısında belirgin iğsi hücre görünümü. Medyum olarak DMEM, enzim olarak kollajenaz kullanılan 1 -2 mm'lik doku parçalarından elde edilen korpus kavernozum hücreleri görülmektedir.( x400 büyütme)

**Resim 2:** 5. gün bakısında iğsi hücrelerin yanında, dokuların etrafında küme yapmış şekilde kaldırım taşı manzarası gösteren korpus kavernozum hücreleri görülüyor ( x400 büyütme).

**Resim 3:** Korpus Kavernozum hücrelerinin pasajlama öncesi oluşturduğu konfluen yapı (x400 büyütme).

**Resim 4:** Kollajenaz A uygulanan B kabında 7. günde korpus kavernozum hücrelerinin iğsi yapıda görünümü (x400 büyütme)

**Resim 5:** Elastaz kullanımıyla endotelial morfolojide hücrelerin sayıca arttığı görülmektedir. (x400 büyütme)

**Resim 6:** Spatül kullanılarak hazırlanan C kabında korpus kavernozum hücresi gözlenmedi (x400 büyütme). Mevcut görüntü hücre olarak düşünüldü fakat daha sonraki bakılarda aynı yapının devam etmesi nedeniyle artefakt olarak değerlendirildi.

**Resim 7:** Elastaz uygulanan D kabının 1 hafta sonraki görüntüsü; kümelenmiş endotelial morfolojide hücreler dikkat çekmektedir (x400 büyütme).

**Resim 8:** Lamininli kapta hazırlanan eksplant kültürde korpus kavernozum hücrelerine rastlanılmadı (x400 büyütme).

**Resim 9:** Kültürün hazırlandığı kapta korpus kavernozum hücrelerinin görünümü (x400 büyütme)

**Resim 10:** Korpus kavernozum hücre kültüründe iğsi ve küboid hücrelerin bir arada görünümü (x400 büyütme)

**Resim11:** : Konfluen yapı gösteren morfolojik olarak endotel yapısındaki korpus kavernozum hücrelerinin görünümü (x400 büyütme)

**Resim 12:** Korpus kavernozum hücrelerinde GAPDH ve ABCA'nın agaroz jeldeki görüntüleri

**Resim 13:** GAPDH ve kaveolinin agaroz jeldeki görüntüleri

**Resim14:** Endotel hücrelerinin von Willebrand faktör ile immünhistokimyasal olarak gösterilmesi (x400 büyütme)

## **KISALTMALAR**

FBS	(Fetal Bovin Serum)
eNOS	(Endotelial nitrik oksit sentetaz)
nNOS	(Nöronal nitrik oksit sentetaz)
iNOS	(İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz)
NANC	(Nonadrenerjik-nonkolinerjik)
ABCA	(ATP Binding Protein 1)
DMEM	(Dulbecco's Modified Eagle Media )
dPBS	(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline )
DMSO	(Dimethyl Sulfoxide )
HSS	(Hanks Salt Solution)
EGM	(Endothelial Growth Medyum)
IGF-1	(Insulin-like Growth Factor-1 )
rh-EGF	(Recombinant Human Epidermal Growth Factor)
VEGF	(Vascular Endothelial Growth Factor)
PCR	(Polymerase Chain Reaction)
RT-PCR	(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
vWF	(von Willebrand Faktör)
PKG	(Protein kinaz G)
NO=EDRF	(Nitrik oksit) (=Endothelial Derived Releasing Factor)
PGI2	(Prostasiklin)
t-PA	(Doku plazminojen aktivatör)
PAI -1	(Plazminojen aktivatör inhibitör tip I)
ELAM	(Endotelyal Lökosit Adezyon Molekülü)
ICAM	(İntraselüler Adezyon Molekülü)
sGC	(Soluble guanilat siklazı)
VDKH	(Vasküler düz kas hücreleri)
MLC	(Miyozin hafif zinciri)
VCAM	(Vasküler Hücre Adezyon Molekülleri)
MHCII	(Major histokompatibilite kompleks 2)
cAMP	(Siklik adenzin monofosfat)
LDL	( Low Dansity Lipoprotein)
Ox-LDL	( Oxide Low Dansity Lipoprotein)
HDL	(High Dansity Lipoprotein)

# İNSAN KORPUS KAVERNOZUM HÜCRE KÜLTÜRÜ OLUŞTURULMASI

**Dr. Hatice Arıkan**

**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji AD, İnciraltı, İzmir**

## **AMAÇ**

Bu çalışmanın amacı, erektil fonksiyonun anlaşılmasına ışık tutacak insan korpus kavernozumundan düz kas hücre ve endotel hücrelerinden oluşan hücre kültürü modelinin oluşturulması ve endotel hücre varlığının gösterilmesidir.

## **YÖNTEM**

Erektil Disfonksiyon nedeniyle penil protez takılması planlanan yaşları 54- 65 arasında değişen 8 hastanın korpus kavernozum dokuları alınarak farklı yöntem ve tekniklerle korpus kavernozum hücre kültürü elde edildi. Hücrelerin, homojenite, canlılık, çoğalabilme ve morfolojik özellikleri değerlendirildi. RT-PCR ile endotel kaynaklı protein olan ABCA1 ve kaveolin varlığı ile İmmünohistokimyasal olarak endotel hücre varlığı araştırıldı.

## **BULGULAR**

RT-PCR ile endotel kaynaklı molekül olan ABCA1 ve kaveolin gösterildi. İmmünohistokimyasal boyama yöntemi ile von Willebrand faktör kullanılarak endotel hücrelerinin varlığı gösterildi. Korpus kavernozum hücre kültüründe, elastaz ve EMB kullanımı ile en iyi metod elde edildi.

## **SONUÇ**

Erişkin insan korpus kavernozum hücre kültürü enzimatik izolasyon yöntemi ile oluşturuldu. Bu çalışmayla oluşturulan hücre kültür protokolü insan korpus kavernozum hücre kültürleri ile yapılacak bilimsel çalışmalar için iyi bir modeldir.

**Anahtar kelimeler:** Korpus kavernozum penis, erektil disfonksiyon, hücre kültürü, kaveolin, ABCA1



## **CELL CULTURE FROM HUMAN CORPUS CAVERNOSUM**

**Dr.Hatice Arıkan**

**Dokuz Eylul University School of Medicine, Department of Urology, Inciralti, Izmir**

### **OBJECTIVE**

The aim of this study is to form a primary tissue culture by producing endothelial and smooth muscle cell cultures from adult human corpus cavernosum and to search for the most appropriate method for this purpose.

### **METHODS**

The tissues for the primary corpus cavernosum cell culture were obtained from 8 patients aged between 54- 65 years old who have undergone penile prosthesis implantation because of erectile dysfunction during the procedure.

Many methods have been tried during the cell culture study protocols. Cells were evaluated according to their homogeneity, viability, reproducibility and morphology. While morphological inspections were carried out by confocal microscope. RT-PCR was performed to evaluate the presence of endothelial molecules such as ABCA1 and caveolin and immunocytochemistry staining was done for the determination of endothelial cells.

### **RESULTS**

We observed that using elastase and EBM was the best way for obtaining cavernosal endothelial cells from the whole tissue. ABCA1 and caveolin mRNA expressions were determined by RT-PCR and endothelial cells were visible by immunocytochemistry staining.

### **CONCLUSION**

Adult human corpus cavernosum cell culture was formed by enzymatic isolation methods. The cell culture protocol in the present study is a good and practical method for future scientific research with adult human corpus cavernosum cell cultures.

**Keywords:** Corpus cavernosum, penis, erectile dysfunction, cell culture, Caveolin, ABCA1

## **GİRİŞ VE AMAC**

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü koşullar altında üretilmesi ve yaşatılmasına dayanan bir laboratuvar işlemidir. Tarihsel olarak hücre kültürü alanındaki gelişmeler öncelikle doku ve organlardan elde edilen hücrelerin yaşatılması ve sonra da geliştirilen yöntemlerle çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Bu teknikler özellikle 1950 ve 1960'li yıllarda virüslerin memeli hücrelerinde üretilmesi üzerine yapılan çalışmalar ile gelişme göstermiştir. Son yıllarda deneysel kanser araştırmaları ve kök hücre çalışmalarının bilimsel olarak öneminin ortaya konmasıyla hücre kültürleri toplumda da popülerite kazanmıştır. Bu çalışmayla, erektil disfonksiyon (ED) ateroskleoz modeli konusunda özellikle endotel hücre kültürü ile yapılacak çalışmalara zemin hazırlaması açısından korpus kavernozum hücre kültürünü sağlıklı ve çoğaltılabilir özellikte oluşturmayı amaçladık.

## **GENEL BİLGİLER**

### **ENDOTEL VE FONKSİYONU**

Normal endotel bütün damar düz kaslarında bulunan, damar duvarını kaplayan ince bir epitel tabakasıdır. Vazodilatatör ve vasokonstriktör substratların yapımında etkili olarak, vasküler homeostazın sağlanmasında temel rol oynayan en küçük endokrin organdır (40). Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalar, endotelin dokularla kan arasında seçici bir bariyer oluşturmaktan başka homeostazda da çok önemli işlevleri olan bir doku niteliğini taşıdığını göstermiştir. Endotel hücreleri salgıladıkları mediatörler ile koagülasyonu, fibrinolizisi, damar tonusunu, dolayısıyla kan akışı ve kan basıncını etkileyip çeşitli fizyolojik ve patolojik olaylarda rol oynayan aktif hücrelerdir.

Endotel hücre fonksiyonları beş bölüm altında özetlenebilir.

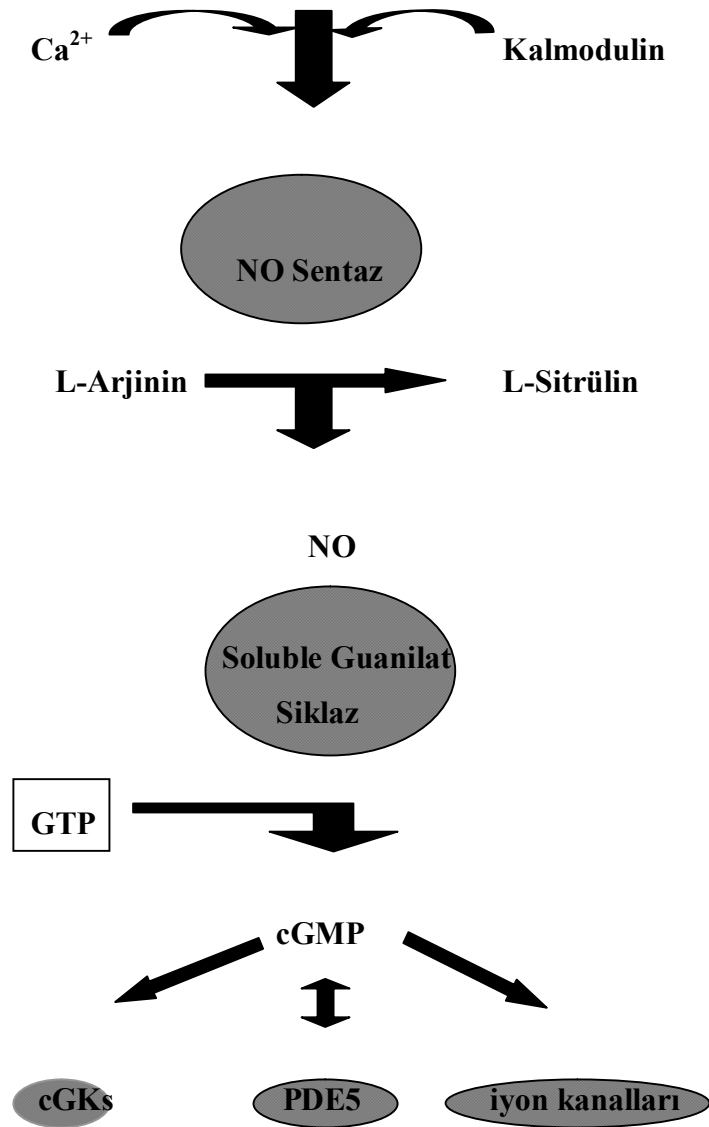
1. Kontrol edilemeyen makro moleküllü protein ve lipoproteinlerin çevre dokuya infiltrasyonuna karşı seçici bariyer görevi görmesi.
2. Dolaşımda bulunan lipoproteinlerin metabolizmasına katılıp subendotelyal bölgeye geçecek lipoproteinlerin tabiatına karar vermek
3. Trombosit agregasyonu ve trombozisi önlemek
4. İmmünkompetan hücrelerle birlikte savunma mekanizmalarına katılmak

5. Gevşetici ve kasıcı maddeler salarak vasküler tonusun düzenlenmesine katkıda bulunmak

Endotel bu fonksiyonlarını aşağıdaki gibi çok sayıda salgıladığı maddeler aracılığıyla sağlamaktadır (41,42).

Nitrik oksid, L-arjininden NO sentaz (NOS) aracılığıyla sentezlenir. Korpus kavernozumda endotel ve sinir innervasyon noktaları NO'nun esas olarak salgılandığı yerlerdir. NO sentezinden sorumlu olan NOS'un birden fazla izoformu vardır; endotelyal NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS), indüklenbilir NOS (iNOS) (31). Nöronal NOS; NANC (nonadrenerjik-nonkolinerjik) sinir uçları, dorsal penil sinir dalları ve derin dorsal arter adventisyasındaki sinir pleksuslarından, eNOS ise kavernozaal endotelden ve intrakavernozaal helisin arterlerden salgılanır (31–37). İndüklenbilir NOS ise inflamatuvar mediyatörlerin ve bakteriyel ürünlerin indüksiyonunu takiben farklı hücrelerden izole edilebilir ancak iNOS peniste ekspresyona olmaz (38).

Seksüel uyarı sonrası NANC sinirlerin uyarılması NOS salınımına neden olur. Salınan NO arteriyel ve kavernozaal düz kas yapısına diffüze olur (31, 39 -41). NO düz kasta cGMP seviyesini arttırarak soluble guanilat siklazı (sGC) aktive eder. Soluble guanilat siklaz cGMP bağımlı protein kinaz G (PKG)'yi aktive eder. Aktive PKG,  $Ca^{2+}$  kanal aktivitesini ve hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunu azaltır. Azalan  $[Ca^{+2}]$ ,  $Ca^{2+}$  bağımlı  $K^{+}$  kanallarının açılmasını sağlayarak düz kas hücresinde hiperpolarizasyona neden olur (42). Protein kinaz G aynı zamanda diğer proteinleri fosforilleyerek  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunu etkiler veya miyozin hafif zincirin (MLC) fosforilasyon durumunu değiştirir. Tümü NO bağımlı korpus kavernozum (KK) düz kas gevşemesine neden olur.



Şekil 1: NO'nun sentezi ve etki mekanizması

### 1- Vazokonstriktörler

- Anjiotensin konverting enzim (ACE)
- Endotelinler (ET-1, ET-2, ET-3)
- Anjiotensin II
- Tromboksan A2

- Asetil kolin, araşidonik asit, PGH<sub>2</sub>, trombin, nikotin

## **2- Vazodilatatörler**

- Nitrik oksit (NO=EDRF)
- Adrenomedülin
- Endotel bağımlı hiperpolarizan faktörler
- Prostatiklin (PGI<sub>2</sub>)
- Bradikinin, asetilkolin, serotonin, histamin, substans P

## **3- Antitrombotik (homeostaz) maddeler**

- Trombomodülin
- Doku plazminojen aktivatör (t-PA)
- Plazminojen aktivatör inhibitör tip I (PAI -1)

## **4- Büyüme modülatör / mediatörleri**

### a) Büyüme promotörleri

- Heparin sülfat
- TGF- $\beta$
- NO
- Bradikinin
- Prostatiklin

### b) Büyüme inhibitörleri

- PDGF
- FGF
- IGF -1
- IL -1
- Endotelin
- Anjiotensin II

## **5- İnflamatuar mediatörler**

Adezyon molekülleri;

- Endotelial Lökosit Adezyon Molekülü (ELAM)
- İntraselüler Adezyon Molekülü (ICAM)
- Vasküler Hücre Adezyon Molekülleri (VCAM)

Antijenler ;

- Major histokompatibilite kompleks 2 (MHCII)

## **Vasküler Tonusun Endotelium Tarafından Düzenlenmesi**

Vasküler tonusun düzenlenmesi, endotelin en önemli görevi olarak bilinmektedir. Bu görevi birçok kasıcı ve gevşetici ajan salınımı ile sürdürür. Bu faktörler arasındaki denge endotelin fonksiyonel veya disfonksiyonel durumunu belirler.

### **Vazodilatasyon Oluşturan Faktörler**

Endotel hücreleri tarafından salınan ana gevşetici faktör NO'dır. NO, L-arjininin, L-sitruiline oksidasyonu sırasında NOS enzimi tarafından oluşturulan serbest radikaldir (31 -38). Bu enzimin, nöronal NOS (nNOS), indüklenebilir NOS (iNOS) ve endotelyal NOS (eNOS) olmak üzere 3 alt tipi vardır. Endotelyum hücreleri esas olarak eNOS eksprese ederler ve buna bağlı olarak devamlı bir biçimde sistemik ve pulmoner dolaşıma düşük miktarlarda NO salınırlar (31 -38). Endotelyum hücrelerinde NO bir defa salındıktan sonra düz kas hücrelerinde bulunan "Hem" in prostetik grubu ile etkileşir. Bu ise guanilat siklaz aktivasyonuna ve siklik guanidin monofosfat (cGMP) üretiminde artışa neden olur. Artmış cGMP hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda azalmaya ve buna bağlı olarak ise vasküler düz kas hücrelerinde (VDKH) gevşemeye neden olur. Prostaglandin ve endotel bağımlı hiperpolarizan faktör (EDHF), endotelyum tarafından salgılanan ve damar tonusunun düzenlenmesi üzerine etkili diğer vazodilatör ajanlardır. Prostaglandinler endotelyum tarafından humoral ve hemodinamik yanıt olarak üretilirler. Araşidonik asidi (AA) substrat olarak kullanılarak COX enzimi aracılığı ile sentezlenirler. Prostaglandinler gevşetici etkilerini adenilat siklaz stimülasyonuna bağlı olarak VDKH'de hücre içi siklik adenosin monofosfat (cAMP) konsantrasyonunu artırarak gösterirler. Endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) ise gevşetici etkisini hücre membranında potasyum geçirgenliğini artırarak gösterir (37,38,42,43).

### **Vazokonstriksiyon Oluşturan Faktörler**

Normal vasküler tonusun devamlılığı için endotelyum hücreleri endotelinler, tromboksan A<sub>2</sub> ve prostaglandin H<sub>2</sub> gibi birçok kasıcı mediyatör salgılar. Bunların içerisinde ET-1 endotelyum hücreleri tarafından salınan en güçlü kasıcı ajandır (42,43). Trombin, adrenalin, Anjiyotensin II, hipoksi ve artmış gerilim stresi gibi uyarılara yanıt olarak üretilir. VDKH'de spesifik reseptörlerine bağlanarak hücre içerisindeki kalsiyum konsantrasyonunun artışına sebep olur. NO'nun etkisini antagonize eder. İlginç olarak sağlam endotelyumda ET-1, NO ve prostasiklin üretimini stimüle ederek ve vazokonstriktör etkiyi ayarlayarak kendi sentezini azaltır (39,41,42).

Endotel hücreleri tarafından sentezlenen tromboksan A<sub>2</sub> ve prostaglandin H<sub>2</sub> VDKH'lerindeki ve trombositlerdeki tromboksan reseptörlerini aktive ederler. Bu faktörler de NO'nun ve prostasiklinin etkilerine ters bir etki oluşturarak VDKH'de kasılmaya neden olurlar. Bununla beraber bu maddelerin koroner arter üzerine olan etkileri henüz tam olarak

aydınlatılamamıştır. PAF-1'de endotelyum hücrelerinden hümoral ve hemodinamik uyarılar sonucunda sentezlenen ve salınan vazomotor tonus ayarlayıcı başka bir kasıcı ajandır. Son olarak endotelyum anjiotensin dönüştürücü enzim (ADE) eksprese eder ve bu da anjiotensin I'den Anjiotensin II dönüşümüne neden olarak direkt ET-1 salınımına neden olur.

Sonuç olarak vazokonstriktör ve vazodilatör ajanların arasındaki bu ilişki sağlıklı endotelin vasküler tonus üzerine olan etkisini belirler. Bu denge üzerinde herhangi bir değişiklik endotelial disfonksiyon gelişimine neden olur.

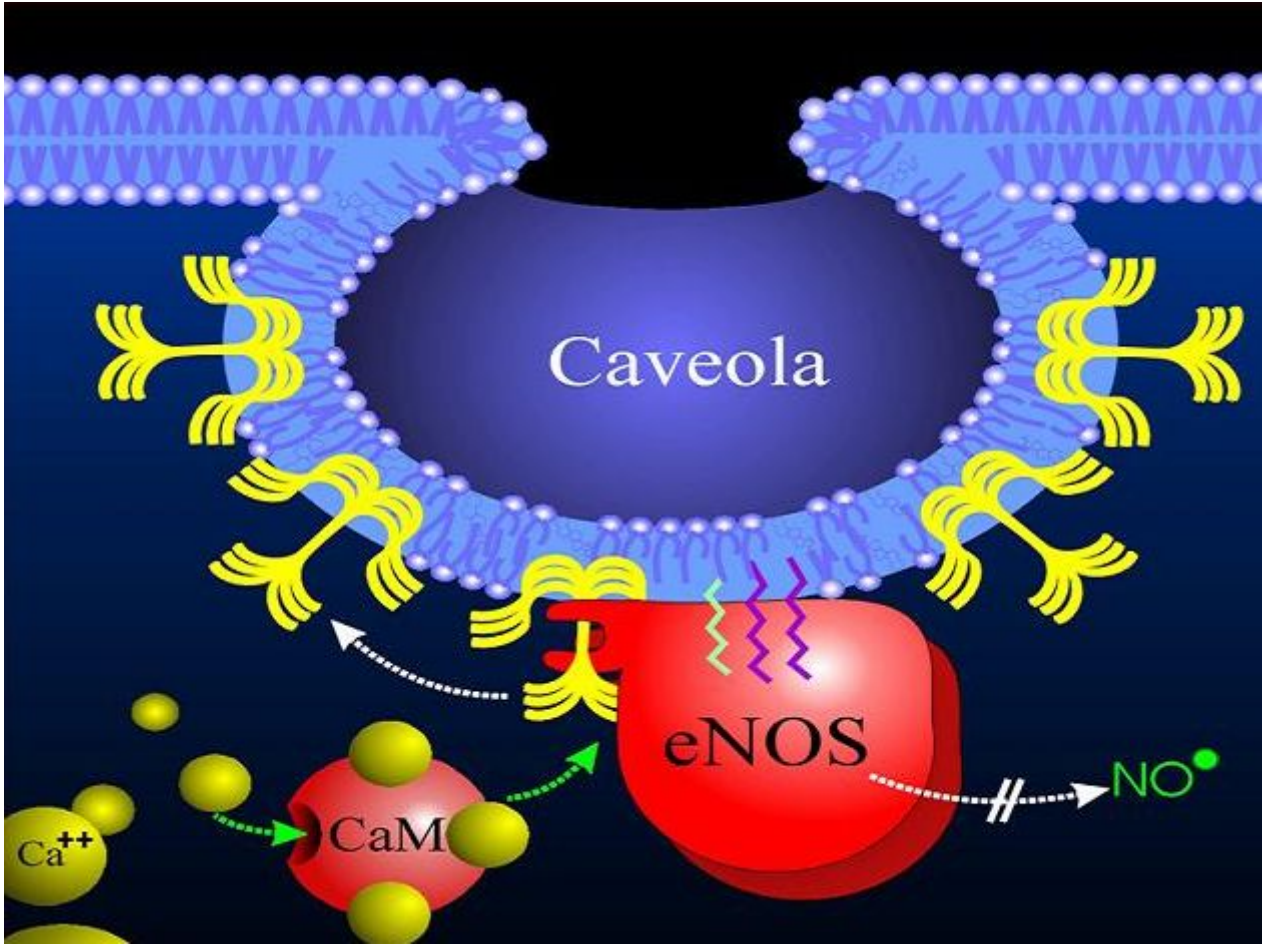
### **Enflamasyon ve Trombozisin Endotelyum Tarafından Düzenlenmesi**

Vasküler tonusun devamlılığının sağlanması dışında, normal endotelyum anti-proliferatif ve anti-enflamatuvar özelliklere de sahiptir. Endotelyum bağımlı vazodilatör olan NO; lökositlerin endotelyum duvarına adezyonunu (10,11), vasküler düz kas hücrelerinin (VDKH) migrasyon ve proliferasyonunu inhibe eder (12,13). Endotelyum hücrelerinin proliferasyonunu stimule eder (14). Bunun yanında NO trombosit agregasyonunun inhibisyonu ve trombosit deagregasyonunun stimülasyonunu sağlar (15).

Prostasiklinler; bir diğer endotelyum bağımlı gevşetici ajanlardır. Bu ajanlar, NO ile sinerjistik olarak etkileşir veya NO'ye sinerjistik olarak etki ederek, trombosit agregasyon ve adezyonunu inhibe ederler (16). Bunun yanında sağlıklı endotelyum hücrelerinin yüzeyleri negatif yüklü olarak heparanlar ile sarılmıştır ve kontakt inhibisyon sağlarlar (17). Endotelyum hücreleri doku plasminojen aktivatörleri (tPA), trombin inaktivatörleri ve trombomodülün gibi antikoagulan faktörler sentezlerler (18). Sonuç olarak lökositler vasküler yüzeye tutunamaz ve hücre proliferasyonunu sıkıca kontrol ederler (19). Bunlar endotelial disfonksiyon ve ateroskleroz karşısında görev alan savunma sistemleridir.

### **eNOS ve Kaveolin ve ABCA 1'in hücredeki lokalizasyonu ve etkileşimi**

Kaveola 50 -100 nm büyüklüğünde, kolesterol, glikosfingolipid ve seramid'den zengin hücre yüzey invajinasyonudur. Kaveola'nın yapısı kolesterol metabolizmasının, lipid alımının ve kolesterol eflüksünün regülasyonundan sorumlu kaveolin adlı yapısal proteinler ile sağlanmaktadır. Yapısal olarak, kaveolin, kaveola membranında bulunan, kolesterol metabolizmasının, lipid alımının ve kolesterol eflüksünün düzenlenmesi gibi birçok fonksiyonu olan kompleks oligomerik bir proteindir (şekil 2).



Şekil 2: Kaveolin ve eNOS ilişkisi (<http://michel-lab.bwh.harvard.edu/biblio> adresinden alınmıştır)

Kaveolin iki fonksiyonel parçadan oluşmaktadır. Karboksi parçası ile kaveolin'e kolesterol bağlanması ve bu kolesterolün plazma membranına taşınmasından sorumludur (46 -51). Bunun yanında aminoterminali kaveolin proteinin yapısal ve devamlılık fonksiyonundan sorumludur. eNOS, kaveolada kaveoline bağlanmış bir şekilde inaktif olarak bulunmaktadır. Hücre içi kalsiyum miktarının artması ve kalmodulinin/ $Ca^{2+}$  kompleksinin oluşmasıyla kompetitif olarak eNOS'un kaveolinden ayrılmasına kalmodulinin eNOS'a bağlanarak aktivasyonuna neden olmaktadır. Ekstrasellüler LDL kolesterolün artması gibi hücre içi serbest kolesterol düzeylerinin arttığı durumlarda kaveolin proteini hücre içi havuzlardan hücre yüzeyine doğru hareket etmekte ve kaveolin sentezi ve transkripsiyonu artmakta, hücredeki serbest kolesterol miktarı normale dönene kadar kaveola, kaveolar serbest kolesterol ve kolesterol efflüksü artış göstermektedir (47- 49,51). Bununla beraber kaveolin protein ekspresyonunun ve miktarının artması kolesterolün hücre içerisinden plasmalemmal



kaveolaya kolesterol transportunu arttırmakla beraber HDL miktarını da arttırdığı gözlenmiştir (47,48). Birçok çalışmada NO sentazın endotelial izoformu olan eNOS'un kaveolada yerleştiği ve kaveolinin eNOS enzimatik aktivitesinin negatif düzenleyicisi olarak görev yaptığı gösterilmiştir (48,49).

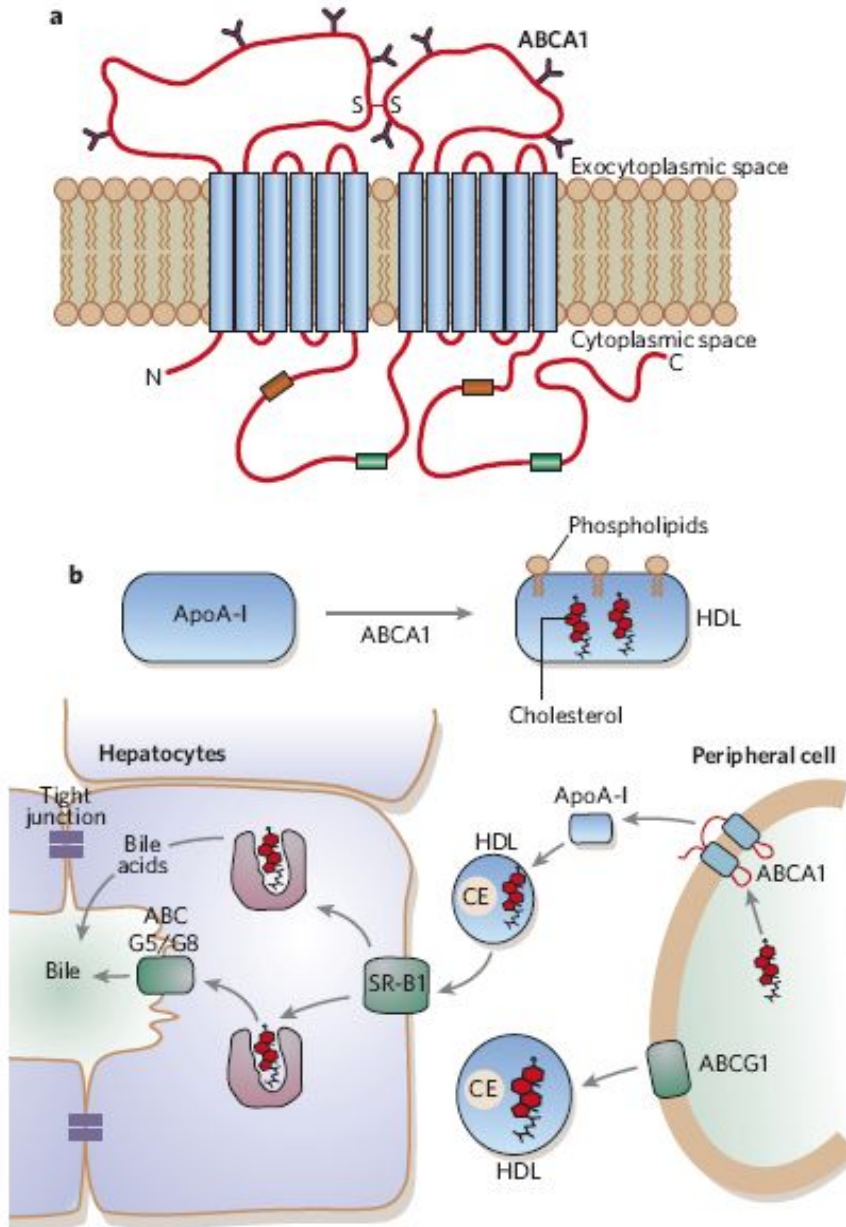
Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Ox-LDL'nin plazma membran yapısındaki kolesterol miktarını azalttığı gösterilmiştir. Ox-LDL'nin, eNOS'un kaveoladan intraselüler membran kompartmanına geçişine neden olduğu ve eNOS aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (47). Kolesterolün yüksek konsantrasyonu, kaveolada invajinasyona neden olurken, kolesterolün düşük konsantrasyonda olması durumunda morfolojide jeneralize bir düzleşme meydana gelmektedir (48).

Artmış LDL-kolesterol seviyelerinin endotel hücrelerindeki NO seviyelerini azaltması, yüksek kolesterolün kalmodulin ve kaveolin arasında eNOS için kompetisyona neden olması ile açıklanmıştır (49). Başka bir çalışmada ise ox-LDL'nin kaveola içerisindeki kolesterol dağılımını bozarak eNOS'un internal membran alanlarına göçmesine neden olduğunu ve böylece eNOS aktivitesinde azalmanın meydana geldiğini ve ortama HDL verildiği zaman LDL'nin etkilerinin geri döndüğü gösterilmiştir (50,51).

Hücre içinde bulunan fazla kolesterol, sitozolde bulunan kaveolin proteini ile kaveolada bulunan, hücre membranında simetrik bir şekilde transmembranal olarak yerleşmiş olan ABCA1 proteinine taşınır. Kolesterol ABCA1 proteini aracılığıyla HDL'de bulunan Apolipoprotein A1 mevcudiyetinde HDL'ye aktarılıp ester kolesterol şeklinde depolanır. Buradan kolesterol iki şekilde karaciğere taşınır birincisi; HDL partiküllerinin, periferden topladıkları ve esterleştirdikleri kolesterolü VLDL partiküllerine aktararak, kolesterolü dolaylı yoldan karaciğere gönderdikleri yoldur. Diğeri ise HDL partiküllerinin kolesterolü karaciğere doğrudan doğruya taşıdıkları, yani karaciğer hücreleri tarafından tanınıp tutuldukları yoldur. Hücredeki fazla kolesterolün kaveolin, ABCA1 ve HDL aracılığıyla karaciğere taşınmasına "ters kolesterol transportu" (reverse cholesterol transport) denir (şekil 3).

Hücre membranının bir yanından diğeri yanına uzanan bir protein olan ABCA1 etkin kolesterol eflüsü için esastır. ABCA1, kaveolin ve HDL'nin hücre yüzeyindeki kaveolada aynı lokalizasyonda olduğu ve birbirleri ile ilişkili çalıştığı birçok çalışmada gösterilmiştir. ABCA1 ve kaveolin arasındaki ilişkinin bozulması HDL aracılıklı kolesterol eflüsünün bozulmasına ve ateroskleroz gelişmesine neden olduğu gösterilmiştir. ABCA1 ve kaveolin'deki ekspresyon artışı HDL seviyesini yükseltmektedir. Ayrıca ateroskleroza karşı koruyucu (ateroprotektif) etkisinin olduğu, ABCA1 "knockout" farelerde ise HDL seviyesinin

düşük olup subendotelyal alanda lipidle yüklü makrofajların biriktiği, ayrıca makrofajlardaki ABCA1'in selektif inaktivasyonunda, plazma lipidleri ve HDL düzeylerinden bağımsız olarak belirgin ateroskleroza yol açtığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Her ne kadar, yakın bir süre önce varlığı belirlendiyse de, ABCA1'in makrofajlardan kolesterol eflüsünde de yaşamsal bir rol oynadığı açıktır. Bu gerçek, onun kardiyovasküler hastalık için yeni bir terapötik hedef olacağını düşündürmektedir. ABCA ekspresyonunu artıran ajanların ters kolesterol transportunu indüklediği ve ateroskerozu önlediği birçok çalışmada gösterilmiştir.



Sekil 3: ABCA'nın ters kolesterol metabolizmasındaki fonksiyonu ( *Nature* December 2005; 438, 612 -621)

## **HÜCRE KÜLTÜRÜ VE AŞAMALARI**

Laboratuvar düzeni ve kullanılan araçlar Viroloji ve hücre kültürü laboratuvarı, işlemlerin ayrı oda ve hava akımına sahip kabinlerde (Klass 2 kabin-pozitif basınçlı HEPA filtreli) yapıldığı şekilde oluşturulmalıdır. Bakteri ve mantar kontaminasyonundan korunmak için çalışma alanı, çalışılmadan önce ve sonra dezenfektan ve UV ile temizlenmeli, diğer durumlarda temiz ve tozsuz tutulmalıdır. Farklı hücre dizileri aynı anda işlenmemelidir. Hiçbir sıvı ağız ile pipetlenmemelidir. Flasklar kullanılmadan önce %70'lik alkol ile silinmeli, olası bir kontaminasyon durumunda erken farkına varmak için, hücre üretme besiyerleri örnek ekilmediği sürece antibiyotiksiz kullanılmalıdır.

### **1. Kullanılan malzemeler**

#### **1.1. Mikroskop**

Hücre kültürü laboratuvarında iki tip mikroskop kullanılır. Flasklarda hücrelerin tek tabaka olup olmadığı, yüzeyinde yeterli hücre olup olmadığı ve ekimlerden sonra sitopatik etkinin izlenmesi için “inverted” mikroskop ve floresan antikor reaksiyonlarını izlemek için floresan mikroskopu kullanılır.

#### **1.2. Su Banyosu**

Azot tankı veya  $-80^{\circ}\text{C}$  soğutuculardan çıkarılan hücre stoklarının hızlı eritilmesinde ve Fetal Bovin Serum (FBS)'un, enzimlerin dolayısıyla  $37^{\circ}\text{C}$ 'de kullanılacak malzemelerin hazırlanmasında kullanılır. Düzenli olarak temizlenmeli ve bu sayede hücrelerin kontamine olması önlenmelidir.

#### **1.3. Santrifüj**

Hücre kültürünün her aşamasında kullanılır. İlk olarak dokunun enzimatik etkileşimini sonlandırmak için daha sonraki aşamalarda çözünmüş hücreleri bakteri ve epitel hücrelerinden arındırılmasında kullanılır.

## 1.4. İnkübatör

Hücre kültürü ile ilgili tüm işlemlerde %5 -10 CO<sub>2</sub>'li inkübatörler kullanılır. Düzenli olarak temizliğinin yapılması kültürleri kontaminasyondan korur. 37<sup>0</sup> C ve %90 -95 nemli ortam sağlar.

## 1.5. Güvenlik kabinleri

Kabinlerin biri “temiz” kavramlı işler (hücre üretme ortamlarının hazırlanması, hücre pasajlanması, stok açma ve hücre stoklama işlemleri) için diğeri “kirli” kavramlı işler (Hasta örneklerinin hazırlanması, hücrelere ekimi ve virus tanımlamasında) için kullanılmalıdır.

## 1.6. Buzdolabı ve Dondurucular

Hücre üretme sıvıları +4°C'lik soğutucularda, bazı tanımlama gereçleri FBS, L-Glutamin, antibiyotik solüsyonları vb. -20°C'de, hemen kullanılacak hücre stokları, örnekleri, sulandırılmış monoklonal antikorlar -80°C'de, hücre ve virus stokları ise -196°C'lik azot tankında saklanır.

## 1.7. Hücre üretme ortamı sıvılarını hazırlama, saklama koşulları ve sterilizasyon yöntemleri

Hücre kültürlerinde, hücrelerin üremesi ve canlılıklarının devamı için çeşitli yöntem ve çözeltiler kullanılır. Bunların ortak özellikleri, vitaminler, aminoasitler, glikoz ve organik maddeler eklenmiş tamponlu tuz çözeltileri içermeleridir. Hücreler özel besiyeri sıvısında süspansiyon haline getirildikten sonra çeşitli yöntemlerle üretilir. Hücrelerin üretilmesinde büyüme medyumunu olarak DMEM ve EBM kullanılır. Büyüme medyumları yine steril koşullara uyularak hazırlanır. Bu aşamada kontaminasyon riskini en aza indirmek için antibiyotik, FBS, endotel dışı hücrelerin büyümesini engelleyen antikorlar kullanılır. Vücutta hücreler ve dokular devamlı olarak yıkım ürünlerini ortadan kaldırıp beslenmeyi sağlayan, dolaşan vücut sıvıları ile temas halindedirler. Bu sıvılar tüm bölümler için gerekli olan canlılığı, farklılaşmayı ve hücrelerin büyümesini sağlarlar. Buna benzer, canlı hücreler *in-vitro* olarak üretildiğinde kültür sıvısı, hücrelerin tüm beslenme gereksinimlerini karşılar. Genellikle hücre dizisinin alındığı ticari kuruluşlarda, hücre dizisi ile birlikte idame, üretme ve stoklama sıvılarının formülleri de bulunur. Kültür ortamı oluşturulduğunda, eğer bir

kontaminasyon durumuyla karşılaşırsa, kullanılan sıvıların üremeye engel olup olmadığı (toksikite testi), sterilizasyon kontrolü (bakteri ve mantarlar için) ve mikoplazma cinsi bakteriler ile kontaminasyon kontrolü yapılır. Bu kontroller düzenli aralıklarla tekrarlanır.

## **2. Hücre kültürü kavramı, hücre kökenleri, hücre dizisini stoklama, stok açma ve idame ettirme yöntemleri**

### **2.1. Hücre kültürü**

Bu yöntemin temel ilkesi, canlı dokulardan alınan parçaların in-vitro koşullarda yaşama ve üremelerini sağlamaktır. Tüp, şişe gibi laboratuvar gereçlerinde uygun besleyici sıvıların içinde üretilerek kullanılan canlı dokulardır. Bu amaçla farklı canlıların (insan, maymun, tavşan, kobay, fare) çeşitli organları (böbrek, akciğer, tümör, amniyon zarları, vb) önce parçalanarak tek tek hücrelere ayrılırlar. Bu hücreler çeşitli tuzlar, tampon maddeleri, tüp veya şişelere konulur. Bu hücre süspansiyonu 37<sup>0</sup> C'de bekletildiğinde hücreler kabın çeperine yapışarak ürerler. Üreme sonucunda oluşan yapıya hücre kültürü denir. Çok çeşitli kaynaklardan sağlanan ve dokulardan elde edilen hücre kültürleri üç bölümde incelenir:

- 1) Primer (birincil) hücre kültürleri
- 2) Sekonder veya diploid hücre kültürleri
- 3) Sürekli veya heteroploid hücre kültürleri

#### **2.1.1. Primer hücre kültürü**

Doğrudan dokudan elde edilen hücre kültürlerine primer hücre kültürleri denir. Primer kültürler elde edildiklerinde dokunun özelliklerini taşırlar. Genellikle heterojen bir yapı gösterirler, hücre hatları gibi tek tip hücreler değildir. Primer hücre kültürleri küçük doku parçalarının petri yüzeylerine ekilmesiyle eksplant kültürler halinde ya da enzim uygulanmasıyla tek hücre süspansiyonu halinde yapılabilir. Primer kültürler kontaminasyon riski olan kültürlerdir, bu yüzden manipulasyonlarda steriliteye özen gösterilmelidir. Kullanılan cerrahi malzemeler otoklavlanmış olmalıdır. Tüm manipulasyonlar laminar kabin içinde yapılmalıdır.

Örnek: İnsan embiryonu böbreği (HEK), insan amniyonu (HAM), Rezüs maymun böbreği (RhMK), yeşil maymun böbreği (GMK), tavşan böbreği (RK).

### **2.1.2. Sekonder hücre kültürü**

Normal kromozom sayısına sahip diploid hücrelerden elde edilirler. En fazla 50 kez pasajları yapılabilir.

### **2.1.3. Sürekli hücre kültürü**

Teorik olarak sonsuz pasajları yapılabilir. Genellikle kötü huylu tümörlerden elde edilirler. Laboratuvar koşullarında değişime uğrarlar ve kromozom sayıları sabit değildir.

Örnek: İnsan Larenks Epidermoid Karsinomu (Hep -2), İnsan Nazofarenks Karsinomu (KB), İnsan Serviks Karsinomu (HeLa)

## **2.2. Hücre dizisi stok açma/stoklama**

Hücre dizisini pasajlama ve stoklama sırasında hücrelerde bazı değişiklikler oluşabilir. Bu değişim; kültür ortamındaki değişikliklerden, hücreler içinde bir grubun aşırı çoğalmasından veya genomik değişikliklerden (spontan mutasyon) kaynaklanabilir. Bu olasılıkları en aza indirmek için; laboratuvar koşulları standardize edilmeli, saf ve klonu tanımlanmış hücreler seçilmeli ve stokta saklanan hücrelerin aralıklı olarak rutine sokulmaları gerekir. Hücre pasajlama işlemi flasklarda tek tabaka halinde bulunan hücrelerin zarar verilmeden yüzeyden ısı ve tripsin yardımıyla kaldırılıp sıvı içinde süspanse edilerek başka ortamlara aktarma prensibine dayanır. Aktarılan ortam (tüp, flask) %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37<sup>0</sup> C'de hücreler tam tabaka olana kadar inkübe edilir. Standardizasyon açısından her pasajlama işleminde hücre sayımı (Hücre süspanسیونunun konsantrasyonu hücreler optik olarak düz bir hazneye konularak mikroskop altında sayılır. Tanımlanmış ve derinliği belli bir alan içindeki hücreler sayılır. Hücre sayımında hemositometre kullanılır ve hücre canlılığını (trypan blue canlılık testi) değerlendiren testler yapılmalıdır. Hücreler, 5. veya 10. pasaj sonrasında yeterli sayıda çoğalabilir ve stoklanabilirler. Sürekli hücreler, daha hızlı ürerler, daha kolay klonlanırlar. Yeterli miktarda üretildikten sonra stoklanabilirler. Stoklamada kullanılan besiyeri ve serum aynı marka olmalı ve hücre dizisinin seleksiyonu önlenmelidir. En iyi stoklama ısısı sıvı nitrojenle yapılandır. Stoklanacak hücre içine mutlaka prezervatif solüsyon

konulmalıdır. Yavaş yavaş soğutulmalı ve  $-70^{\circ}\text{C}$ 'nin üzerine ulaştığında sıvı nitrojene ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) konmalıdır. Hücreler  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de 6 ay -1 yıl canlılıklarını koruyabilirler. Hücreler yavaş dondurulup hızlı eritilirler. Bu yüzden, hücre açma işleminde azot tankından çıkarılan kırıyotüpler hemen  $37^{\circ}\text{C}$ 'lik su banyosunda hızla eritildikten sonra hücre dizisine uygun üretme sıvıları içine alınarak tek tabaka üreyinceye kadar etüvde bekletilirler.

### **2.3. Hücre kültürü besiyeri ve solüsyonlar**

Hücre kültürü besiyerleri laboratuvar ortamında hücrelerin normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan mikro çevreyi sağlayan besleyici solüsyonlardır. Hücre kültürü besiyerleri içeriklerindeki aminoasit, karbonhidrat, vitamin ve iyonlarla hücrelerin gelişimini desteklerler. Laboratuvar ortamında hücrelerin çoğaltılabilmesi için uygun pH, sıcaklık ve nemin sağlanması çok önemlidir. Hücre kültürü besiyerleri içeriklerindeki iyonlarla gerekli ozmolarite ve pH'ı da sağlarlar.

Besiyeri ihtiyacı hücrelerin tipine, adaptasyon kabiliyetine ve hücre kaynağı organizmanın türüne göre farklılık gösterir. Hücreler farklı besiyerlerinde farklı davranabilirler. Bu yüzden çalışmanın amacına göre hücrenin besiyeri ihtiyaçlarının belirlenmesi gerekir.

Hücrelerin canlılıklarının devamı ve çoğalmaları için aminoasitler, karbonhidratlar, lipidler, vitaminler, iyonlar ve proteinlerin ortamda bulunması şarttır. Standart bir besiyerinde yukarıdaki bileşenlerin sağlanması için iki temel solüsyon uygulanır:

#### **2.3.1. Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM)**

Hücre kültürlerinde olması gereken temel aminoasit kombinasyonu ilk defa Eagle tarafından 1955'de tanımlanmıştır. Kendi ismini taşıyan Minimum Eagle's Medyum (MEM) isimli besiyeri bazı modifikasyonlarla bugüne kadar gelmiştir. Dulbecco tarafından modifiye edilen DMEM solüsyonu bugün somatik hücre kültürlerinde en sık kullanılan besiyeri bileşenidir. DMEM hücrelerin beslenebilmeleri için gerekli glukozu, canlılıklarını sürdürebilmeleri için uygun ozmolarite ve pH'a, fonksiyonlarını görebilmeleri için gerekli aminoasitlere ve vitaminlere sahiptir. Ancak tek başına hücre gelişimi için yeterli değildir.

#### **2.3.2. Fetal Bovin Serum (FBS)**

Serum, hücrelerin tutunabilmeleri ve çoğalmaları için kullanılan ve içeriği tam olarak tanımlanmamış zengin bir protein çözeltilisidir. Bu protein çözeltilisinin içinde hormonlar,

enzimler, hücrenin büyümesi ve çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri, yüzeylere tutunabilmesini sağlayan hücreler arası matris proteinleri bulunur. Hücre türüne ve uygulamalara göre besiyerindeki serum oranı değişebilir. Standart bir somatik hücre kültüründe serum oranı %10'dur. Serum üretimi pahalı ve zahmetli bir süreçtir. Sığır embriyolarının kanlarının toplanmasıyla hazırlanan serumların üretiminde bir standart yoktur. Farklı hayvanlardan elde edilen serumlar birbirlerinden farklılık gösterirler. Bu da deneylerin sonuçlarını etkilemektedir. Bu dezavantajlarından dolayı bazı laboratuvarlar serumsuz besiyerlerini kullanmaktadırlar. Serum kullanılmayan bir besiyerinin çeşitli büyüme ve tutunma faktörleriyle desteklenmesi gerekir, bu da çalışmasına göre serumdan daha pahalıya mal olabilir.

### **2.3.3. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS)**

Hücre içi ve dışındaki ozmotik basıncı dengede tutan bir tuz solüsyonudur. İçeriğindeki inorganik tuzlar ve su, hücre metabolizmasını destekler. pH'ı tamponlayarak hücreler için uygun bir ortam sağlar.

### **2.3.4. Tripsin**

Tripsin hücre pasajlamalarında kullanılan temel enzimdir. Tripsin bir serin proteaz tipi enzimdir, lizin ve arjinin aminoasitlerinin peptidlerini yıkar. Laboratuvarımızda %2,5 EDTA'lı tripsin solüsyonu kullanılmaktadır. Tripsin kullanımında dikkat edilmesi gereken bazı noktalar şunlardır:

- \* -20<sup>0</sup> C'de saklanır, daha yüksek sıcaklıklarda bekleyen tripsin solüpsinin aktivitesi düşer, bu yüzden alıgatlanarak saklanması uygundur.
- \* Serum tripsin inhibitörlerini içerir, hücrelere tripsin uygulanmadan önce mutlaka bir kere Ca ve Mg içermeyen FBS ile yıkanmalı ve yüzeylerindeki serum uzaklaştırılmalıdır.
- \* Tripsin hücrelerin yüzeyini örtecek kadar uygulanır. Laboratuvarımızda 100 mm'lik petripler için 2 ml, 60 mm'lik için 1ml, 35 mm'lik için ise 0.5ml uygulanır.
- \* Tripsin sıcaklık arttıkça daha etkili çalışır. Tripsin uygulanan hücreler inkübatöre konulduklarında yüzeyden daha çabuk, oda sıcaklığında ise daha yavaş ayrılırlar.
- \* Hücreler yüzeyden ayrılır ayrılmaz tripsinin inhibe edilmesi önemlidir. Tripsin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlar.



\* Hücrelerin yüzeyden ayrılma hızı değişebilir. Besiyerindeki serum oranı, hücre tipi, petrideki hücre yoğunluğu, tripsinin aktivitesi ve son pasaj üzerinden geçen süreye göre hücreler farklı zamanlarda kalkarlar.

\* Farklı şişelerdeki tripsinler birbirlerine her zaman eş değer olmayabilir.

\* Tripsini inhibe etmek için tripsin hacminin en az iki katı kadar %10 FBS'lu besiyeri uygulanmalıdır. Daha sonra hücreler pipetlenerek birbirlerinden ayrılırlar.

## 2.4. Hücre Pasajlama

Hücreler pasajlanabilmeleri için hücre kültür petrilerinin yüzeyini tamamen kaplamış olmalıdır. Böyle petrilere 'konfluen petriler' denir. Konfluen petrilerin üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılır. Hücreler serumdan arındırılmak için FBS ile yıkanır. FBS aspire edilerek uzaklaştırılır. Hücreler inkübatörde tripsinle 5 dakika inkübe edilir.

\*100 mm petri için 2 ml tripsin

\* 60 mm petri için 1 ml tripsin

\* 35 mm petri için 0,5 ml tripsin uygulanır.

Tripsine duyarlılık, hücre tipine göre farklılık gösterir. Bu yüzden tripsin uygulanan hücrelerden bazıları 5 dakikadan daha az sürede petri yüzeyinden ayrılabilir. Bu nedenle mikroskop altında aralıklarla kontrol edilmesi gerekmektedir. Tripsin, hacminin en az iki katı serumlu besiyeriyle inhibe edilir.

\* 100 mm petri için 2 ml tripsin, 4 ml besiyeri

\*60 mm petri için 1 ml tripsin, 2 ml besiyeri

\*35 mm petri için 0,5 ml tripsin, 1ml besiyeri uygulanır.

Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilir ve bir falkon tüpe aktarılır. Tüpe 2 -3 ml daha medyum ilave edilir. Hücre süspansiyonu santrifüjlenir (1000 -1500 rpm, 5 dakika), süpernatant uzaklaştırılır. Hücreler 1 ml besiyerinde sulandırılarak sayılırlar ve daha sonra petrilere ekimler yapılır.

## 2.5. Hücre Sayılarının Hesaplanması

1ml kültür medyumunda sulandırılan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak ependorf tüpe konulur ve üzerine 90 µl Tripkan Blue boyası konarak karıştırılır. Bu karışım Toma lamına konur, Toma lamından 5 bölme sayılır, bulunan sayı sulandırma miktarı 50.000 ile

çarpılır. Sonuç olarak 1ml medyumda kaç milyon hücre olduğu bulunur. Ekim yapılacak sayı belirlenip hücrelerin petriye ekimleri yapılır. Genelde 60 mm'lik konfluent bir kültür kabı 2 tane 100 mm'lik medyumlu kültür kabına geçirilir. 100 mm hücre kabı 1/5 oranında 100 mm'lik başka bir kaba geçirilir. 60 mm'lik hücre kabı 1/5 oranında 60 mm'lik başka bir kaba geçirilir.

- 100 mm'lik kültür petrisine  $5 \times 10^6$
- 60 mm'lik kültür petrisine  $2 \times 10^6$
- 35 mm'lik kültür petrisine  $1 \times 10^6$
- 24 kuyuluk kültür kabının her kuyusuna 125.000 hücre transfer edilir.

Bunun için hücre kültür kabı sayılır ve 500.000 hücre/ml olacak şekilde seyreltilir.

- 100 mm'lik kültür petrisine 10 ml hücre süspansiyonu
- 60 mm'lik kültür petrisine 4 ml hücre süspansiyonu + 1 ml medyum
- 35 mm'lik kültür petrisine 2 ml hücre süspansiyonu + 1ml medyum
- 24 kuyuluğun her kuyusuna: 250 µl hücre süspansiyonu + 250 µl medyum.

## 2.6. Hücrelerin Dondurulması

Petri üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılır. Hücreler serumdan arındırılmak için PBS ile yıkanır, daha sonra PBS aspire edilerek uzaklaştırılır ve hücreler inkübatörde tripsinle 5 dakika inkübe edilir. Tripsin, hacminin en az iki katı serumlu besiyeriyle inhibe edilmelidir. Daha sonra hücreler pipetleterek tek hücre süspansiyonu haline getirilerek bir falkon tüpe aktarılır, üzerine 2 -3 ml daha medyum ilave edilir. Hücre süspansiyonu santrifüjlenir (1000 -1500 rpm, 5 dakika), süpernatant uzaklaştırılır. Pellet 1 ml besiyerinde sulandırılarak sayılır. Dondurma tüpleri içerisine 1: 1 oranında dondurma medyumunu ve hücre çözeltisi konulur. Tüpler dondurma kabına yerleştirilir ve kap - 80<sup>0</sup> C'lik derin dondurucuya konulur.

## 2.7. Hücrelerin Çözülmesi

Sıvı nitrojen (-196<sup>0</sup> C) veya - 80<sup>0</sup> C'den alınan kriyovial 37<sup>0</sup> C'lik su banyosunda hızlı bir şekilde eritilir. Kriyovialin içindeki hücre süspansiyonu 6 ml besiyeri içeren falkon tüpe yavaşça aktarılır. Hücreler DMSO içerisinde oldukları için manipülasyonlar nazik olmalıdır. Tüp 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılır ve pellete 1 ml

medyum uygulanır. Hücreler 1 ml medyum içinde iyice çözüldükten sonra üzerlerine 4 ml besiyeri eklenir. 5 ml'lik hücre süspansiyonu 60 mm'lik medyumlu kültür kabına aktılır. Ertesi gün medyum değiştirilir (2.gün). Kültür kabı her gün invert mikroskop ile kontrol edilip hücreler konfluen oldukları gün tripsinlenerek pasajlanabilir.

# GEREÇ VE YÖNTEMLER

## 1. Laboratuvar Koşullarının Sağlanması

Hastalardan korpus kavernozum dokusu alınması için ameliyathane koşullarında steril ortam oluşturulması ve dokunun da laboratuvara hızla taşınması gerekmektedir. Doku alınması işlemi esnasında laboratuvarın hazır olması, laminar akımın en az 30 dk UV altında çalışması ve bu esnada hava akımının da açık olduğunun kontrol edilmesi gereklidir. 37<sup>0</sup> C'lik su banyosu çalıştırılarak uygun sıcaklığa gelmesi sağlanır. Çözünmesini veya yeterli sıcaklığa gelmesini istediğimiz solüsyonlar su banyosuna konulur. Eller işleme başlamadan önce yıkanır, alkolle silinir ve bundan sonraki tüm işlemler laminar akımlı kabinler içinde gerçekleştirilir. Kullanılacak malzemeler bir yardımcı tarafından tek tek alkolle silinerek içeri alınır ve ellerin dışarı çıkarılmamasına dikkat edilir.

## 2. Büyüme Ortamlarının Hazırlanması

Medyum hazırlamak için 500 ml DMEM solüsyonu, FBS, 5 ml glutamin ve 5 ml sulandırılmış penisilin/streptomisin solüsyonu kullanılır. 500 ml'lik DMEM solüsyonu içinden 60 ml uzaklaştırılarak, içine 50 ml FBS, 5 ml glutamin ve 5 ml penisilin/streptomisin eklenir. FBS -20<sup>0</sup> C'de muhafaza edilir. Kullanım için çıkarılıp erimesini bekledikten sonra 56<sup>0</sup> C'de 25 dakika inaktive edilerek 50 ml'lik tüplere bölünür ve -20<sup>0</sup> C'den saklanır. Her ortam hazırlanması esnasında 50 ml'lik tüpler su banyosunda uygun sıcaklığa getirildikten sonra kullanılır. Bunun dışında Endotelial Büyüme Medyum ( EBM ) kullanılır. EBM içerisinde; 10 ml FBS, 0,5 ml R<sup>3</sup>-IGF-1, 0,5 ml heparin, 0,5 ml askorbik asit, 0,5 ml rhEGF, 0,5 ml gentamisin/amfoterisin, 0,2 ml hidrokortizon, 0,5 ml VEGF, 2 ml rhFGF-B bulunmaktadır. Her iki büyüme ortamı da -20<sup>0</sup> C'de saklanır ve saklama işlemi ortamların ilk hazırlanma aşamasında alıgatlanarak yapılmalıdır.

Ortamların hazırlanması aşamasında, daha sonraki birçok kültür ortamının kontaminasyonundan sorumlu olmaması için steriletaye son derece dikkat edilmelidir.

### **3. Enzim Hazırlanması**

Dokuları mekanik olarak parçalara ayırdıktan sonra inkübatörde parçalanmanın kimyasal olarak da devam etmesi için enzim kullanılması gerekir. Bunun için kollajenaz ve elastaz kullanıldı.

#### **3.1. Kollajenaz Hazırlanması**

Laminar akım içinde steril koşullara dikkat ederek, kollajenaz içerisine 25 ml HSS (Hanks salt solution) konular, tüp aşağı yukarı sallanarak karışması sağlanır. Daha sonra karışım enjektöre yerleştirilerek filtreden geçirilir ve süzülen solüsyon tüpte toplanır. Tüpün üzerine tarih ve içerik yazılır. – 20<sup>0</sup> C’de saklanır. Kullanılacağı zaman 37<sup>0</sup> C’de su banyosuna konularak uygun sıcaklığa getirilir. Örnekler yine ilk hazırlanma aşamasında alıgatlanır.

### **4. Dokunun Alınması – Taşınması**

Tüm hazırlıklar tamamlandıktan sonra dokunun sağlıklı olarak alınması ve hızla laboratuara getirilmesi gerekmektedir. ED nedeniyle penil protez takılması planlanan nın, ameliyat esnasında protez materyali takılmadan önce insizyonla korpus kavernozum yapılarının görülmesini takiben dokular keskin diseksiyonla alınarak önce serum fizyolojik ile yıkanır. Daha önce 37<sup>0</sup> C’de ısıtılarak hazırlanmış medyum içine steril koşullara dikkat edilerek konular. Hızlıca laboratuvar ortamına götürülür.

### **5. Dokunun İşlenmesi**

Tüp içinde gelen doku, laminar akım içine alınır ve tüp içindeki medyum uzaklaştırılır. Dipte kalan doku bir petri kabının içine, dokuyu zedelememek için tüp ters çevrilerek boşaltılır. Dokuyu küçük parçalara ayırmak için 2 yöntem uygulanır.

1-Dokunun iki bistüri yardımıyla 1 -2 mm’lik parçalara ayrılması,

2-Metal bir spatül yardımıyla ezilerek parçalanmasıdır.

## 6. Dokuların İnkübatöre Gidiş Basamakları

Mekanik parçalanma işlemini takiben dokular küçük petri kaplarının içlerine yerleştirildikten sonra enzimatik parçalanma işlemi için tüm kaplara aynı miktarda enzim konulmadı (kollajenaz, elastaz). Bu noktada dokular 3 farklı işleme tabi tutuldu.

- 1- Kollajenaz uygulanması
- 2- Elastaz uygulanması
- 3- Hiçbir enzimatik işleme tabi tutulmadan parçalanmış dokunun besleyici medyum (DMEM) eklenerek direk inkübatöre yerleştirilmesi (eksplant kültür)

Bu petri kaplarına yerleştirme esnasında, deneyin sağlıklı sonuçlar vermesi ve en doğru yöntemin bulunmasını sağlamak için farklı doku boyutlarının, farklı enzim miktarlarının ve 37<sup>0</sup> C shaker'da kalma sürelerinin her bir örnek hazırlığında farklı olmasına dikkat edildi.

Hazırlanan petri kapları 37<sup>0</sup> C 1 saat 80 rpm'de shaker'a konuldu. İşlem bittikten sonra yine örnekler laminar akım içinde açılarak petri kaplarının her birine enzimin ( kollajenaz ve elastaz) inhibisyonunu sağlamak için 5 ml medyum eklendi ve bunlar 15 ml'lik falkon tüpe konuldu.

Daha sonra falkon tüpler 300G'de 25<sup>0</sup> C 5 dakika santrifüj edildi. İşlem sonrası üstte kalan kısım pipetle çekilerek alındı. Dipte kalan dokuların üzerine 3 ml medyum eklenerek aspire edildi. Alınan materyal 6 cm'lik petri kabına birim alanda en az doku olacak şekilde boşaltılarak üzerine 10 ml medyum eklendi. Bu son aşamada kullanılan medyum DMEM olabileceği gibi deneyimizde EBM de kullanıldı.

DMEM, hücrelerin beslenebilmeleri için gerekli glukozu, canlılıklarını sürdürebilmeleri için uygun ozmolarite ve pH'a, fonksiyonlarını görebilmeleri için gerekli aminoasitlere ve vitaminlere sahiptir. Ancak tek başına hücre gelişimi için yeterli değildir. EGM içerisinde IGF -1, FBS, Heparin, Askorbik asit, rh-EGF, Gentamisin sülfat, VEGF, Hidrokortizon, rhFGF bulunmaktadır.

**Tablo 1:** 3no'lu hastanın dokularının kültür şeması

	Enzim	İnkübatör	Boyut	Lamininli kap
A	Kollajenaz 2 ml	2 saat	0.5- 1 mm <sup>3</sup>	
B	Elastaz 2 ml	2 saat	0.5- 1 mm <sup>3</sup>	Kullanıldı
C	Elastaz 2 ml	4 saat	0.5- 1 mm <sup>3</sup>	
D	Elastaz 2 ml	4 saat	0.5- 1 mm <sup>3</sup>	
E eksplant	-	-	0.5- 1 mm <sup>3</sup>	Kullanıldı
F eksplant	-	-	0.5- 1 mm <sup>3</sup>	
G	Elastaz 2 ml	2 saat	0.5- 1 mm <sup>3</sup>	
H	Elastaz 2 ml	4 saat	0.5- 1 mm <sup>3</sup>	Kullanıldı

**Tablo 2:** 4 no'lu hastanın dokularının kültür şeması

	Enzim	İnkübasyon	Boyut / filtre	Attachment F.
K	Elastaz 2 ml	2 saat	0.5- 1mm <sup>3</sup>	Kullanıldı
L	Elastaz 2 ml	2 saat	0.5- 1mm <sup>3</sup>	Kullanıldı
M	Elastaz 2 ml	4 saat	0.5- 1mm <sup>3</sup> / +	Kullanıldı
N	Elastaz 2 ml	2 saat	0.5- 1mm <sup>3</sup>	-
O	Elastaz 2 ml	2 saat	0.5- 1mm <sup>3</sup>	-
P	Elastaz 2 ml	2 saat	0.5- 1mm <sup>3</sup> / +	-
R eksplant			0.5- 1mm <sup>3</sup>	Kullanıldı
S eksplant			0.5- 1mm <sup>3</sup>	-

## 7. Hücrelerin Pasajlanması

İnsan korpus kavernozum dokusundan primer hücre kültürü yapılmasını takiben ilk 3 gün petri kapları, hücrelerin yüzeye yapışmasını zorlaştırmamak için inkübatörden çıkarılmadı. Hücrelerin günün başında mikroskopik incelemeleri yapıldı. Bakıda petri kabını

hücrelerin doldurmuş olduğu görüldüğünde pasajlama yapılması gerekir. Pasajlama için yeniden laminar akım hazırlığının yapılması, kullanılacak olan malzemelerin alkolle silinerek alana alınmasını takiben pasajlama yapılması düşünülen petri kapları belirlendikten sonra inkübatörden sırayla bir yardımcı tarafından alınarak laminar akım içine konulur. Petri kabının kapağı açılır ve ağız kısmı havaya bakacak şekilde konulur. Pipet yardımıyla medyum uzaklaştırılır. 2 ml PBS ile yıkanır, PBS çekilir. 1 ml Tripsin eklendikten sonra mekanik olarak hücrelerin yüzeyden ayrılmasını kolaylaştırmak için petri kabına alttan vurma işlemi uygulanır. Ayrıca bu hareket özellikle laminin ya da attachment faktör gibi hücrelerin petri yüzeyine yapışmasını kolaylaştıran maddelerin kullanılmasından sonra yapışmayı kolaylaştırıcı fakat aynı zamanda da tripsin sonrası ayrılmayı da zorlaştırıcı etkiden kurtulmaya yardımcı olur. Daha sonra kap inkübatöre yerleştirilir, 3 dk sonra alınır. Gözle bakıda hücrelerin havalanmış olduğunun görülmesini takiben tripsini inhibe etmek için ortama 2 ml medyum eklenir. Pipet yardımıyla ortamdaki hücreleri içeren 3 ml solüsyon çekilir. Bunları her bir petri kabına 1 ml olacak şekilde konulur. Her birinin üzerine 7 ml medyum ekleyerek yeni hazırlanmış olan pasaj kapları inkübatöre yerleştirilir.

## **8. Hücrelerin Dondurulması**

Yeterince hücre olması durumunda daha sonra kullanılmak üzere, fazla hücrelerin dondurulması işleminde öncelikle dondurma medyumunu hazırlanması gerekir. Bunun için % 0,8 DMSO'dan 2 ml ve % 20'lik FBS'den 23 ml eklenerek toplam 25 ml'lik medyum elde edilir. Elimizdeki konfluen hücre kültür kabını alarak önce içlerindeki medyum uzaklaştırılır. Hücreler PBS Dulbecco's medyum'la (2 ml) yıkanır. 1ml tripsin eklenerek hücrelerin tabandan havalanması sağlanır ve lam inkübatöre konularak 3 dk bekletilir. İnkübatörden çıkarıldıktan sonra tripsini inhibe etmek için üzerine 2 ml medyum eklenir. Elimizdeki örnek falkon tüpte toplanır ve tüp 7 dakika 600 G'de santrifüj edilir. Santrifüj sonrası üstte kalan kısım atılır ve 1 ml'lik mikro pipet kullanarak tüpün içine 2 ml dondurma medyumunu eklenerek medyumun dipte çöken hücrelerle iyice karışması sağlanır. 1ml'lik tüplere konularak  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanır.

## **9. Dondurulan Hücrelerin Çözdürülmesi**

Daha önce  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de dondurulmuş hücreler, içi distile su ile doldurulmuş  $37^{\circ}\text{C}$ 'deki sıcak su banyosuna konularak çözülür. Hücrelerin dondurulması yavaş fakat çözdürülmesi hızlı olmalıdır. Özel dondurma tüpünün içindeki 1 ml materyal alınarak falkon tüpe konulur



ve üzerine 5 ml DMEM eklenerek santrifüje konularak 1500 rpm de 5 dk çevrilir. Santrifüj sonrası tüpün üstünde kalan kısım atılır. Altta kalan kısım alınarak flaska konulur ve üzerine 30 ml DMEM eklenerek inkübatöre yerleştirilir.

Çözülen hücreler 5. günde inkübatörden çıkarılıp, ortamı uzaklaştırıldıktan sonra, 2 ml tripsin eklenerek inkübatörde bekletilir. Üzerine 8 ml medyum eklenerek elimizde son olarak toplam 10 ml solüsyondan Toma lamına 1 ml damlatılır ve x10 büyütmede yapılan sayımda 500 hücre olduğu görülmesi yeterli sayıda hücrenin varlığına (yaklaşık  $50 \times 10^6$ ) işaret eder.

## 10. PCR

KK dokusundan elde edilen RNA'lardan PCR yöntemiyle ABCA1 ve Kaveolin'in mRNA ekspresyonlarına bakıldı.

### 10.1. Hücrelerden RNA İzolasyonu

Dokular 5 dakika inkübasyon sonrası Sigma 3K30 santrifüj cihazında, +4° C'de 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpte oluşan şeffaf sıvı kısım başka bir ependorf tüpe pipet yardımıyla alındı. Alınan miktarın üzerine kullanılan trizolün 1/5'i kadar %99 kloroform (Sigma) eklendi. Tüpler elde 5 dakika sallanarak homojenizasyon sağlandı. Daha sonra 4° C'de 8000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alınıp üzerine RNA'nın çökmesi için aynı miktarda isopropanol (Merck) eklenerek -20° C'de 24 saat bekletildi. Daha sonra örnekler -20° C'den çıkarılarak 4° C'de 8000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpteki izopropanol uzaklaştırıldı. Dipteki RNA 1 ml %75 etanol eklenerek (Merck) ile yıkanıp +4° C'de 8000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Bu işlem iki kez daha yapıldı. Santrifüjden sonra etanol pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve tüpteki RNA 3 saat kurumaya bırakıldı. Kuruyan RNA uygun miktarda *Diethyl pyrocarbonate* (DEPC) (Sigma) uygulanmış steril distile suda çözüldü. RNA konsantrasyonu Lambda 25 UV/VIS Spektrofotometresi (PerkinElmer) ve programı kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. 260nm'deki absorbans değeri kullanılarak RNA konsantrasyonu,  $A_{260}/A_{280}$  değerleri kullanılarak ise RNA kalitesi değerlendirildi. RNA örnekleri daha sonra kullanılmak üzere -80° C'buzdolabında saklandı.

## 10.2. RNA'lardan cDNA Sentezi

cDNA sentezinde örnekler 4 µg olacak şekilde hacimleri hesaplandı. Örnekler 10 µl olacak şekilde DEPC'li su eklendi. Örneklerin üzerine 1'er µl Random Hexamer (0,2 u/µl) eklenerek termal cycle cihazında (Tchne TC- 412) 70° C'de 5 dk muamele edildi. Örnekler buz üzerine alındıktan sonra üzerine 2 µl 5X Reaction Buffer, 2 µl 10 Mm dNTP MİX, 1 µl RNase inhibitör (20u/µl) karışımı eklenerek termal cycle'da 25 °C'de 5 dk muamele edildi. Daha sonra örneklerin üzerine 2 µl 5X Reaction Buffer, 1 µl Reverse Transcriptase (200u/µl)'dan oluşan karışım eklenerek termal cycle'da 1 siklus 25° C'de 0,1dk, 25° C'de 10 dk, 42° C 1 saat, 70° C'de 10 dk muamele edildi. Örnekler alınarak -20° C'de derece konuldu.

## 10.3. cDNA'dan DNA Sentezi

DNA sentezi için 2 µl cDNA kullanılarak sentezlendi. 10,2 µl distile su, 0,4 µl 10 MM dNTPmix, 1,2 µl MgCl, 2 µl Taq Buffer, 2 µl ileri primer, 2 µl geri primer, 0,2 µl Taq Polymerase'dan oluşan karışımdan 18 µl epondorf tüplere dağıtılarak üzerine 2'şer µl cDNA eklendi. Karışım Termal cycle cihazına konuldu. Burada GAPDH için 95<sup>0</sup> C 'de 5 dakikalık denatürasyon, 50<sup>0</sup> C 'de 30 saniye primer bağlanması ve 72<sup>0</sup> C 'de 1 dakikalık zincir uzaması basamaklarını oluşturacak şekilde 30 döngüden oluşan PCR tepkimesidir. Kaveolin için 95° C'de 5 dakikalık denatürasyon, 55<sup>0</sup> C 'de 30 saniye primer bağlanması ve 72<sup>0</sup> C 'de 1 dakikalık zincir uzaması basamaklarını oluşturacak şekilde 30 döngüden oluşan PCR tepkimesidir. ABCA1 için 95<sup>0</sup> C 'de 5 dakikalık denatürasyon, 55<sup>0</sup> C 'de 30 saniye primer bağlanması ve 72<sup>0</sup> C'de 1 dakikalık zincir uzaması basamaklarını oluşturacak şekilde 35 döngüden oluşan PCR tepkimesi uygulandı. Sentezlenen örnekler 4<sup>0</sup> C soğutucuya kaldırıldı.

## 10.4. Agoroz Jel Hazırlanması

TAE buffer yapmak için 20 ml TAE + 980 mll distile su birleştirilir. 200 ml TAE buffer 3 gr Agorozla karıştırılarak agarozun çözünmesini sağlamak için 7 dk mikrodalgada bekletilir.

Fırından çıkarılan çözeltinin içine 6 ml etidyum bromür konulur ve jel dökülür.

## 10.5. Örneklerin Jele Yüklenmesi ve Elektroforezde Yürütülmesi

% 1,5'luk agoroz jele, 10 µl PCR ürünü ile 2 µl yükleme solüsyonundan oluşan karışım yüklendi. 1. yuvaya; 2 ml markır, 2 ml loading dye, 8 ml distile steril su ve ikinci yuvaya 2 ml loading dye ve 10 ml PCR ürünü ve bundan sonraki yuvalara da sırayla

elimizdeki PCR ürünleri tek tek yerleştirilir. Markır olarak 100 bp DNA Ladder kullanılır. Thermo EC1000 -90 elektroforez cihazında 200 V, 60 mA' de 2 saat yürütüldü.

## **10.6. Jeldeki Görüntülerin Alınması ve Bantların Dansitometrik Olarak Hesaplanması**

PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezi ile ayrıldıktan sonra Stratagene Egle Eye® Görüntüleme Sistemi kullanılarak jel görüntüleri elde edildi. PCR ürünlerine ait bantlar LaBworks® analiz programı kullanılarak dansitometrik olarak ölçüldü ve yarı-kantifiye edildi.

## **11. RT-PCR**

Çözdüğümüz hücreler falkon tüp içinde 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, santrifüj sonrası tüpün üzerinde kalan kısım atılarak dipte kalan ve hücre içeren kısmın içerisine 350 µl RA1 ve 3.5 µl B-merkaptolanol eklenir ve vorteks'de çalkalanır. Karışım filtreden geçirilerek dış kısmındaki toplama kabıyla santrifüje götürülerek 11000G'de 1dk çevrilir. Filtre santrifüj sonrası çıkarılır. Dipte kalan sıvı alınarak içine 350 µl %70'lik etil alkol konular ve vorteks'de çalkalanır. Her örnek 2 ml'lik filtreli toplama tüplerine konular ve lizat yüklenerek 8000G'de 30sn santrifüj edilir. Dipte kalan kısım atılarak filtre uzaklaştırılır ve başka bir tüpün içine yerleştirilir.

350 µl MDS (Membran desalting solution) eklenerek membranı kurutmak için 11000G'de 1dakika santrifüj edilir. Altta kısm atılır ve filtre alınarak yeni bir tüpün içine konular ve üzerine daha önce hazırlanan 95µl DNase reaksiyon karışımı eklenir. 15 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra alttaki kısım atılır ve yeni bir tüpün içine konular.

200 µl RA2 eklenir 8000G'de 30sn çevrilir, alttaki kısım atılarak yeni bir kolonun içine konular.

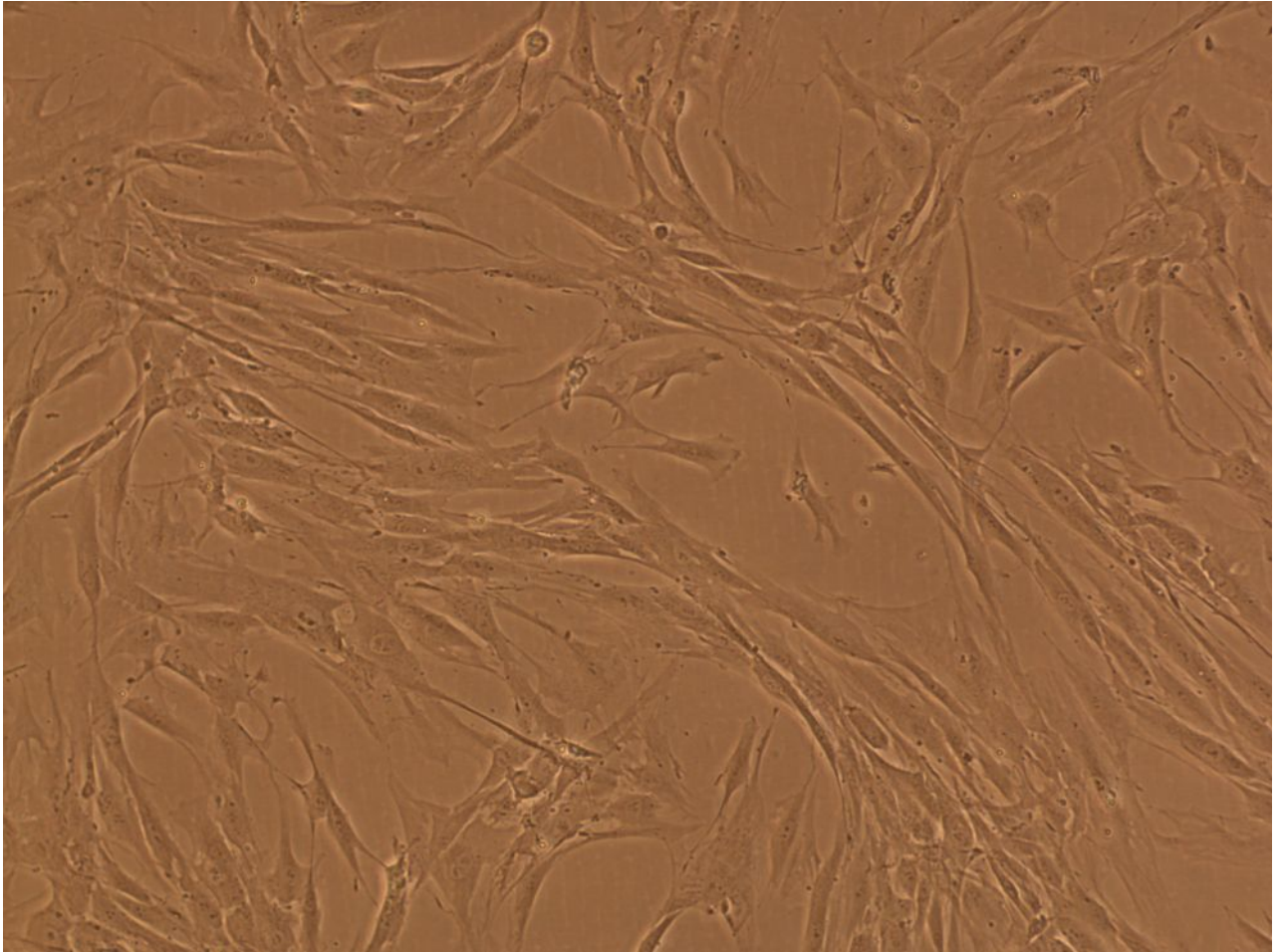
600 µl RA3 eklenir 8000G'de 30sn çevrilir, alttaki kısım atılarak yeni bir kolonun içine konular

250 µl RA3 eklenir 11000G'de 2dk çevrilir, alttaki kısım atılarak RNase free tüp içine konular.

60 µl H<sub>2</sub>O(RNase free) eklenerek 11000G'de 1dk çevrilir, alttaki kısım alınır ve RNase free tüpe ve sonrasında -20 °C'ye konular.

## **BULGULAR**

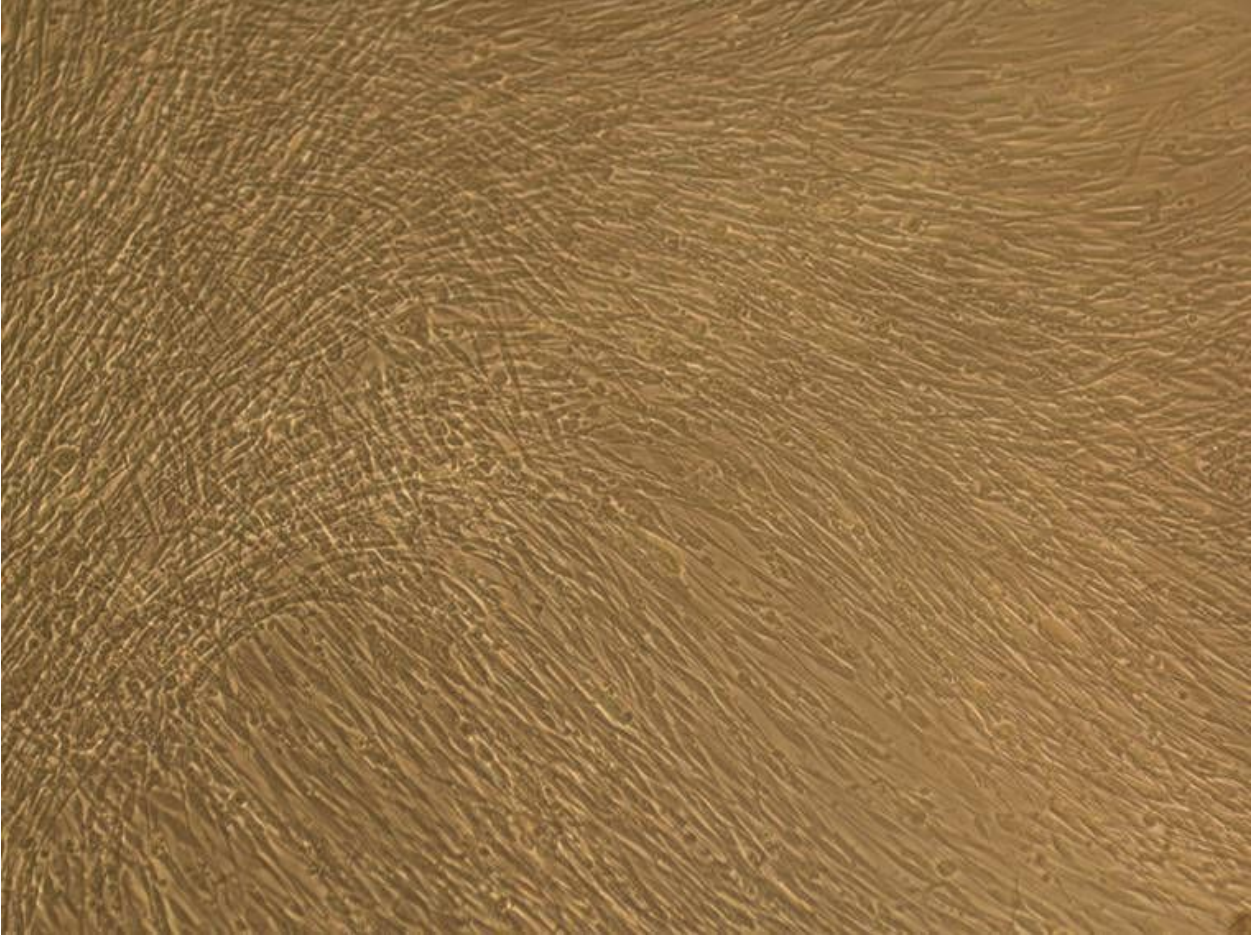
Petri kaplarına ekim yapıldıktan sonra hazırlanan kaplar inkübatöre yerleştirildi. Hücrelerin yapışmasını kolaylaştırmak için izlemler gūnaşırı yapıldı. İşlemden 3 gün sonra yapılan bakıda, özellikle küçük parçalara ayırdığımız dokuların etrafında hücre gruplarının daha belirgin olduğu görüldü. 5. gün bakısında belirgin iğsi hücreler (Resim 1) ve küme yapmış şekilde küboid yapıda hücreler (Resim 2) görüldü. Hücrelerin kabı belirgin şekilde doldurması nedeniyle ilk pasajlama yapıldı. Pasajlama öncesi şekildeki gibi kabın dolduğu görülür (Resim 3).



**Resim1:** Korpus kavernozum hücre kültüründe 5. gün bakısında belirgin iğsi hücre görünümü. Medyum olarak DMEM, enzim olarak kollajenaz kullanılan 1 -2 mm'lik doku parçalarından elde edilen korpus kavernozum hücreleri görülmektedir.( x400 büyütme)

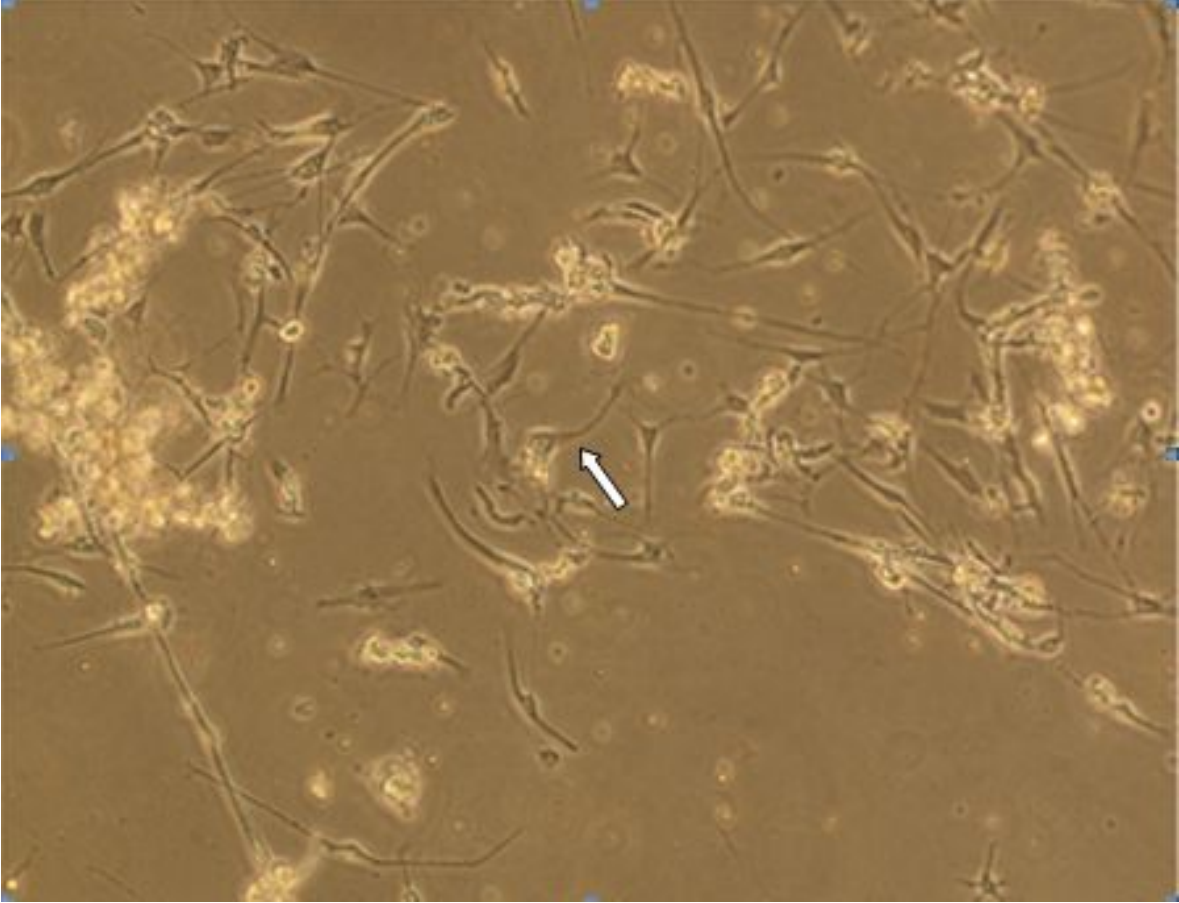


**Resim 2:** 5. gün bakısında iğsi hücrelerin yanında, dokuların etrafında küme yapmış şekilde kaldırım taşı manzarası gösteren korpus kavernozum hücreleri görülüyor ( x400 büyütme).



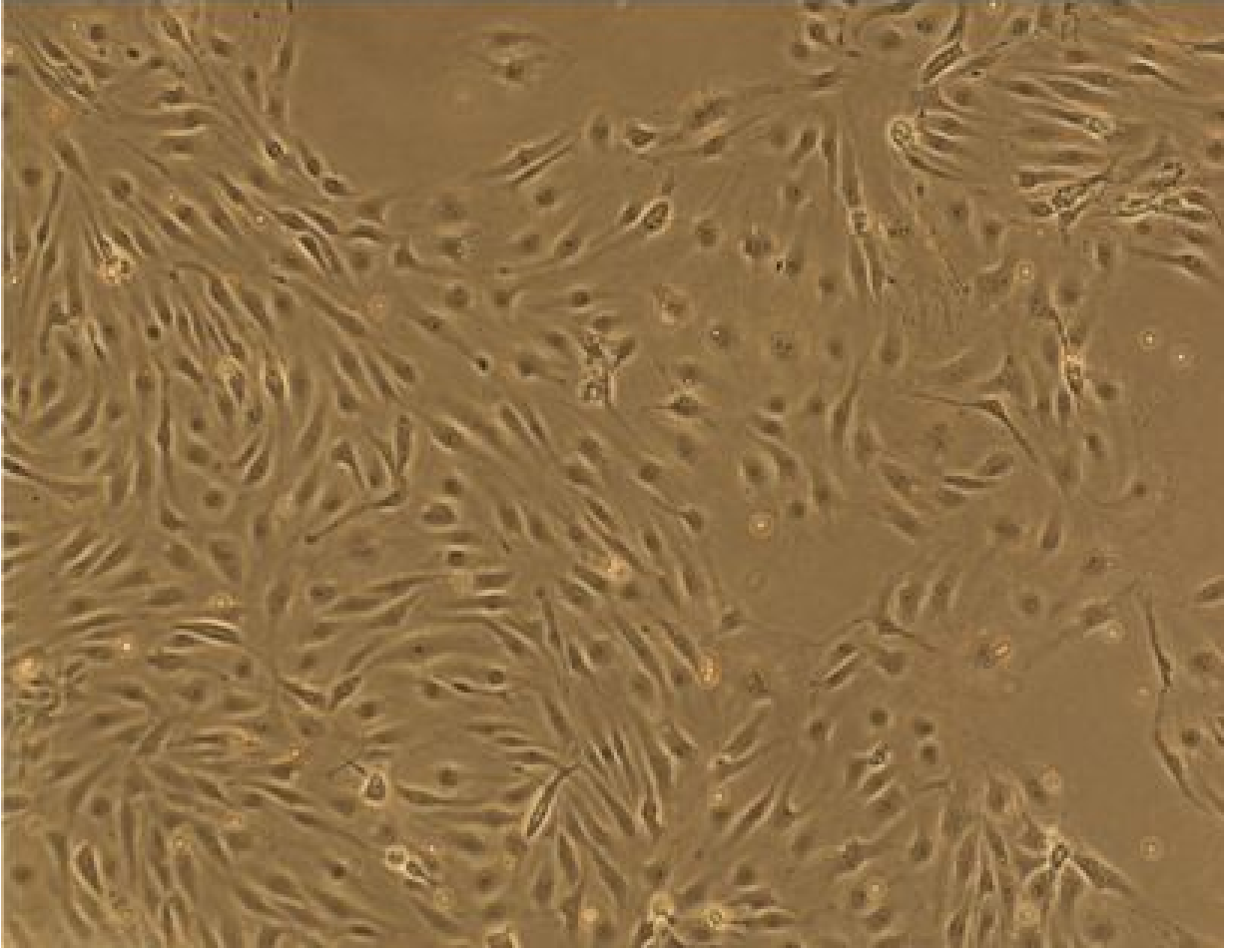
**Resim 3:** Korpus Kavernozum hücrelerinin pasajlama öncesi oluşturduğu konfluen yapı (x400 büyütme).

Mikroskop altında yapılan bakıda konfluen yapının olduğunun görülmesi üzerine pasajlama yapılır. İkinci hastanın dokuları da yine aynı şekilde alındıktan sonra ve bu örnekte kollejenazın yanı sıra elastaz da kullanıldı. Dokular boyut, inkübatörde kalma süresi, kullanılan kaplarda laminin kullanıp kullanmama, elastaz kullanımı gibi değişiklikler yapılarak farklı örnekler hazırlandı. Örneklerin 7. gün bakısında, kollajenaz kullanılan A kabında, şekildeki hücresel yapılar görüldü (Şekil 4). Hücrelerin iğsi yapıda olduğu ve hücrelerin özellikle doku parçalarının etrafında kümelendiği görüldü.



**Resim 4:** Kollajenaz A uygulanan B kabında 7. günde korpus kavernozum hücrelerinin iğsi yapıda görünümü (x400 büyütme)

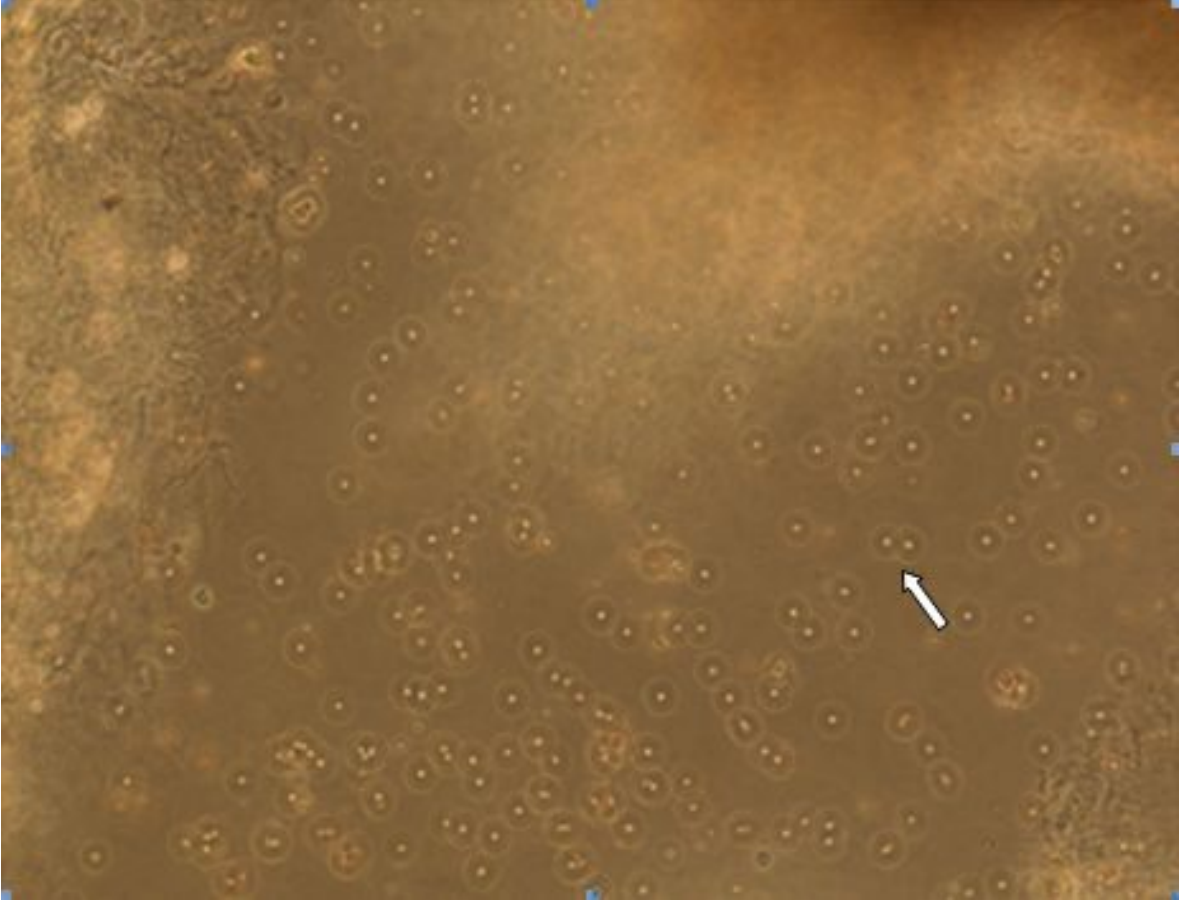
B örneğinde lameller lamininle muamale edilmiş olup, elastaz kullanılması da bir diğer farklılığı ortaya koymaktadır. Kültür hazırlanmasından 1 hafta sonraki eşzamanlı bakıda iğsi hücrelerin yanı sıra, endotel hücre benzeri küboid yapıda hücreler (kaldırım taşı manzarası) yaygın olarak görülmüştür (Resim 5).



**Resim 5:** Elastaz kullanımıyla endotelial morfolojide hücrelerin sayıca arttığı görülmektedir (x400 büyütme).

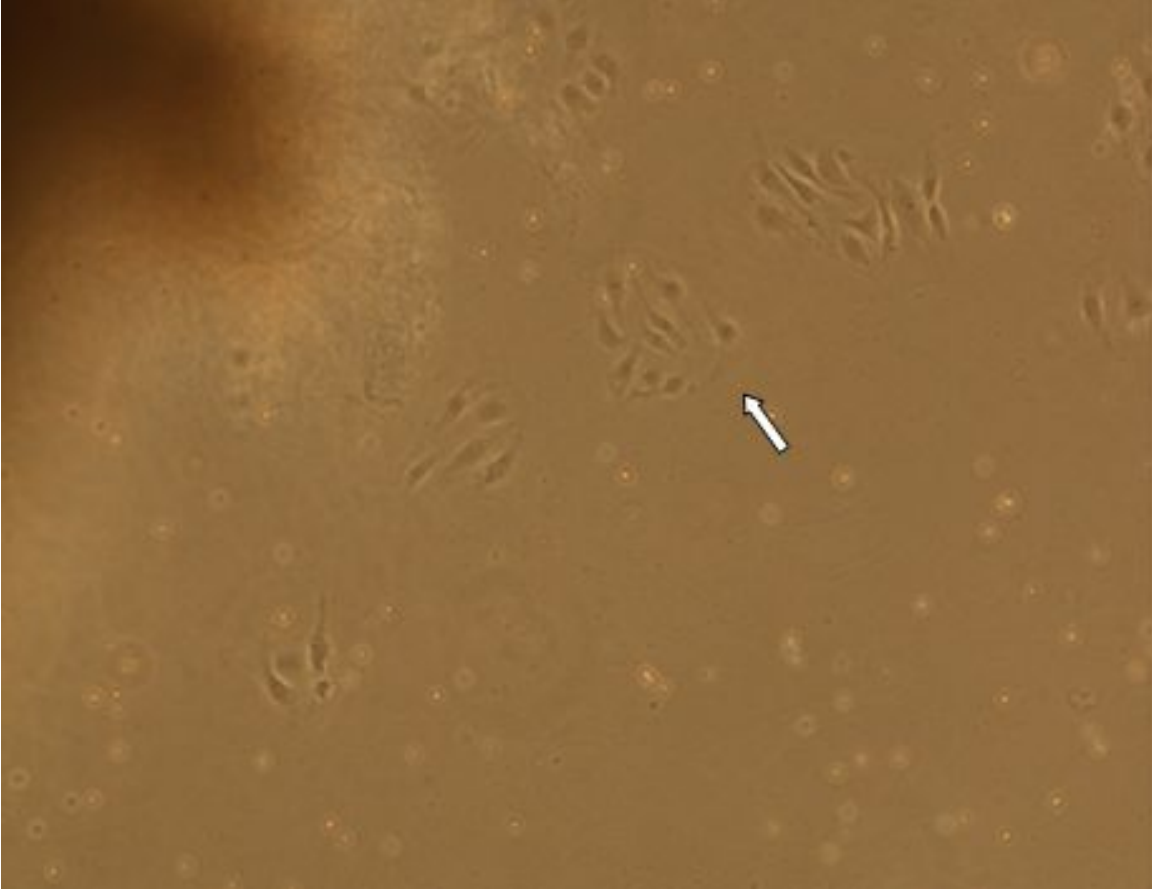
C örneğinde dokular bistüri ile parçalama işlemi yerine, metal bir spatül yardımıyla ezilerek lama yerleştirildi. Inkübatörde 4 saat bekletilerek laminin içermeyen kapta hazırlanan kültürün mikroskopik bakısında hücreye rastlanılmadı (Resim 6).





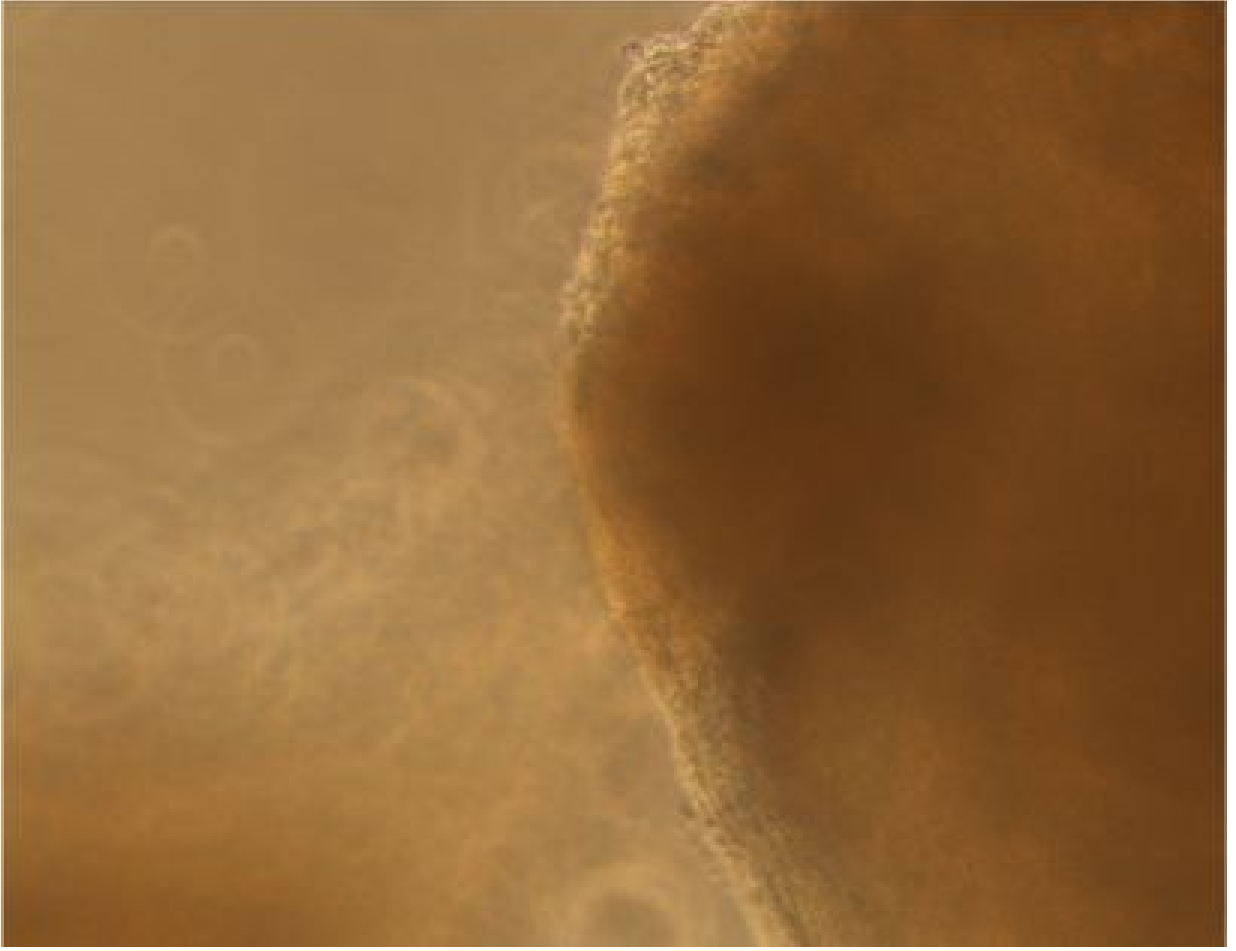
**Resim 6:** Spatül kullanılarak hazırlanan C kabında korpus kavermozum hücresi gözlenmedi (x400 büyütme). Mevcut görüntü hücre olarak düşünüldü fakat daha sonraki bakılarda aynı yapının devam etmesi nedeniyle artefakt olarak değerlendirildi.

D örneğinde elastaz kullanılmış olup, doku bistüri ile parçalandı ve laminin kullanılmadı. 1 hafta sonraki mikroskopik bakıda küçük kümeler halinde özellikle lamın perifer kısmına lokalize olan küboid yapıda hücrelere rastlandı ( Resim 7).



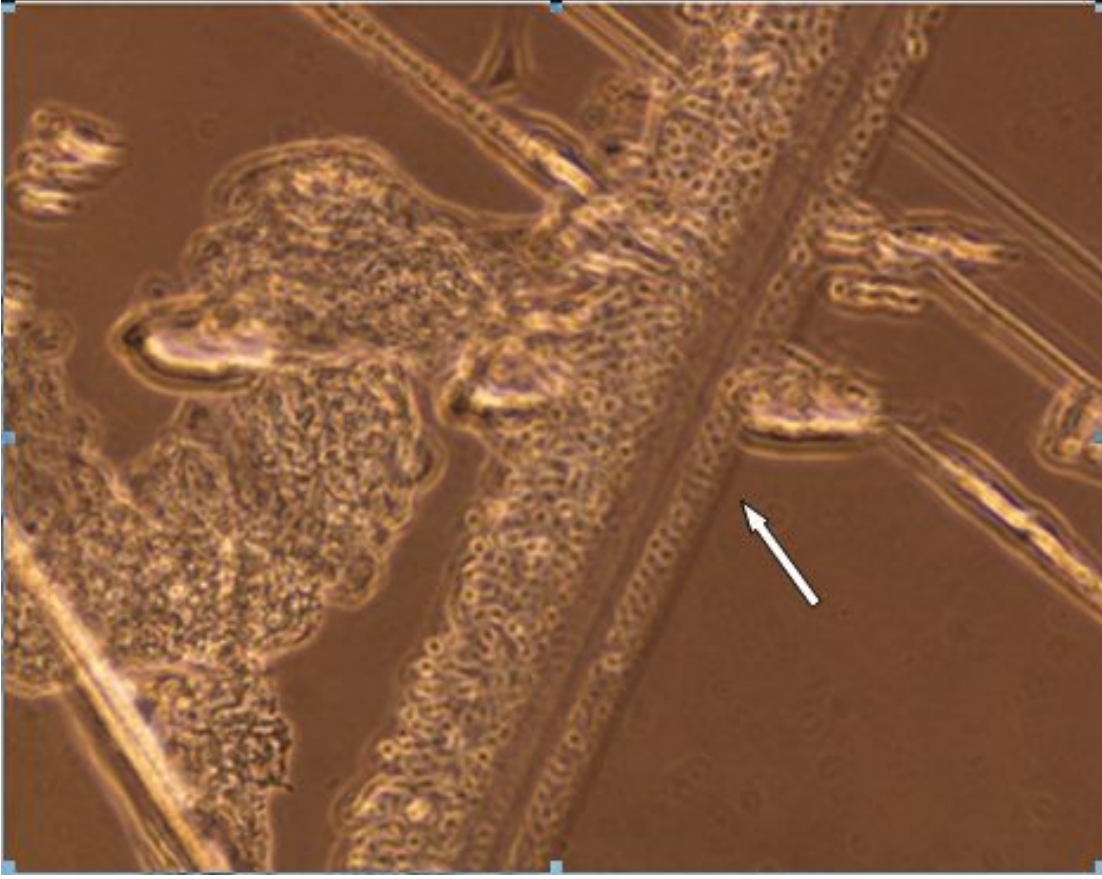
**Resim 7:** Elastaz uygulanan D kabının 1 hafta sonraki görüntüsü; kümelenmiş endotelial morfolojide hücreler dikkat çekmektedir (x400 büyütme).

E ve F adlı eksplant örneklerde enzim kullanılmamış olup, doku parçalama işleminden sonra E örneği lamininli kaba, F örneği lamininsiz kaba konulmuştur. 1 hafta sonraki mikroskopik bakıda iki örnekte de hücreye rastlanmadı (Resim 8).

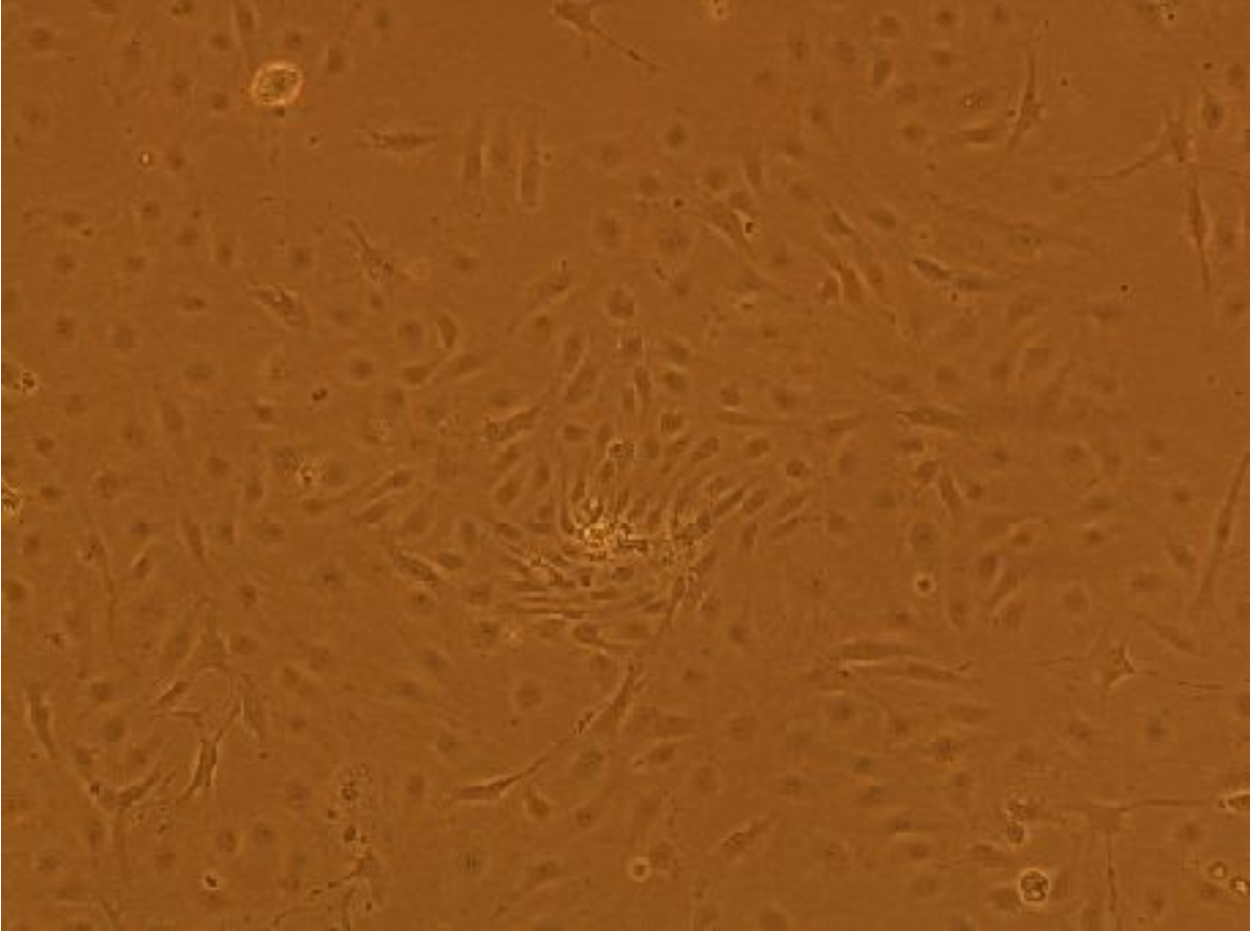


**Resim 8:** Lamininli kaptta hazırlanan eksplant kültürde korpus kavernozum hücrelerine rastlanılmadı (x400 büyütme).

Z örneği, dokuların bistüri ile parçalara ayrıldığı lam, bir peri kabının içerisine konarak, üzerine de medyum eklendikten sonra inkübatöre yerleştirildi. Kontrolde özellikle bistüri hattının olduğu noktalarda hat şeklinde hücre kümeleri görüldü. Fakat 2 gün sonraki bakıda lamın üzerinde hiç hücreye rastlanmadı (Resim 9).



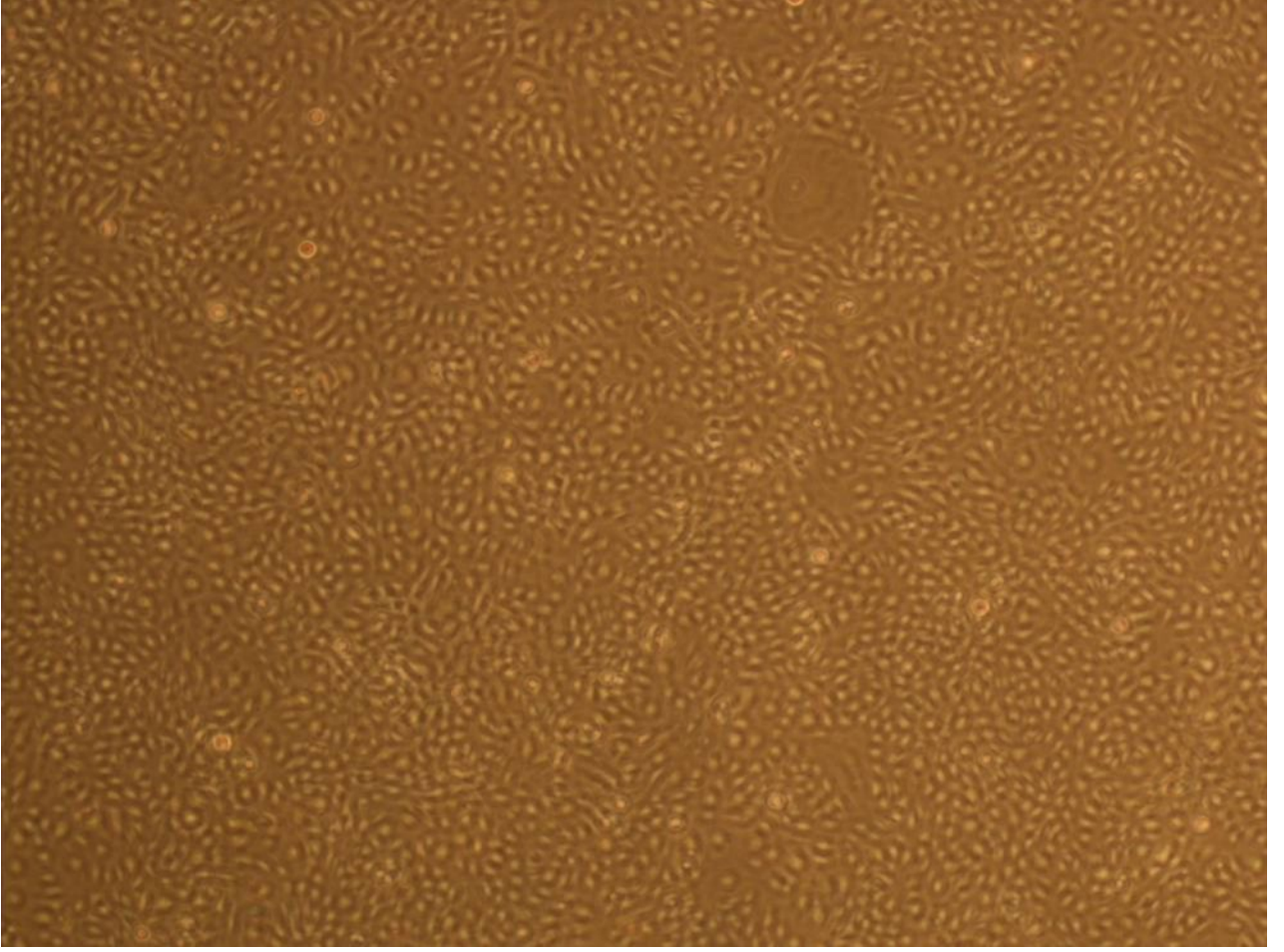
**Resim 9:** Kültürün hazırladığı kaptaki korpus kavernozum hücrelerinin görünümü (x400 büyütme)



**Resim 10:** Korpus kavernosum hücre kültüründe iğsi ve küboid hücrelerin bir arada görünümü (x400 büyütme)

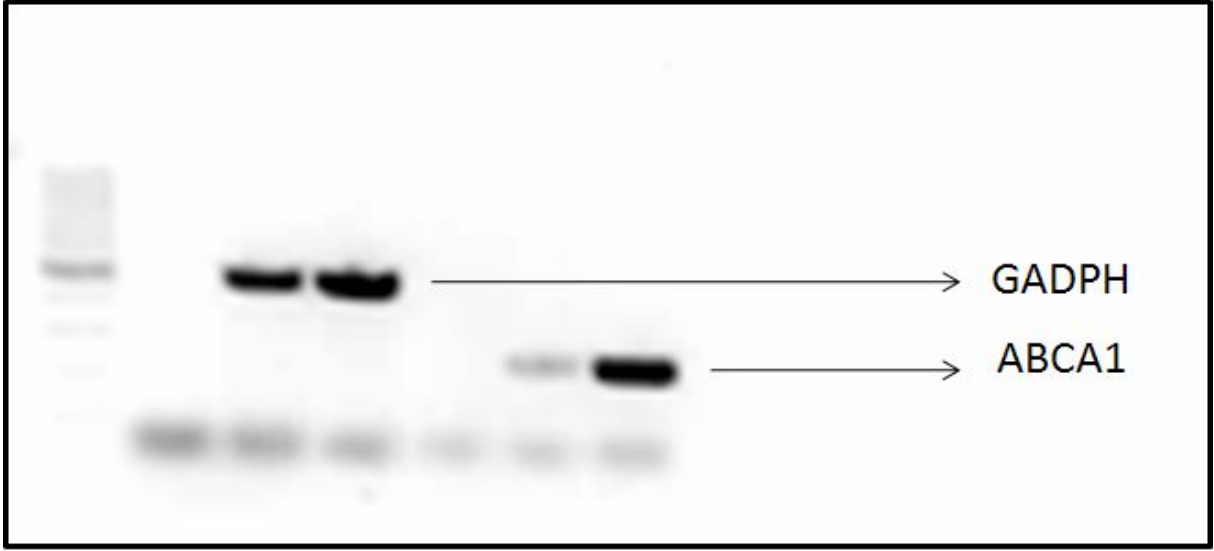
Hücrelerin zemine yapışmasını kolaylaştırmak için attachment faktör ve büyüme medyumunu olarak da EBM kullandığımız dokunun inkübatörde 3.günün sonundaki mikroskopik bakısında iğsi ve küboid yapıda hücrelerin miks yapıda olduğu bir görünüm mevcuttu (Resim 10).

Aynı örneğin ilk kültür tarihinden 1 hafta sonraki mikroskopik bakısında tipik kaldırım taşı manzarasıyla karşılaştık (Resim 11).



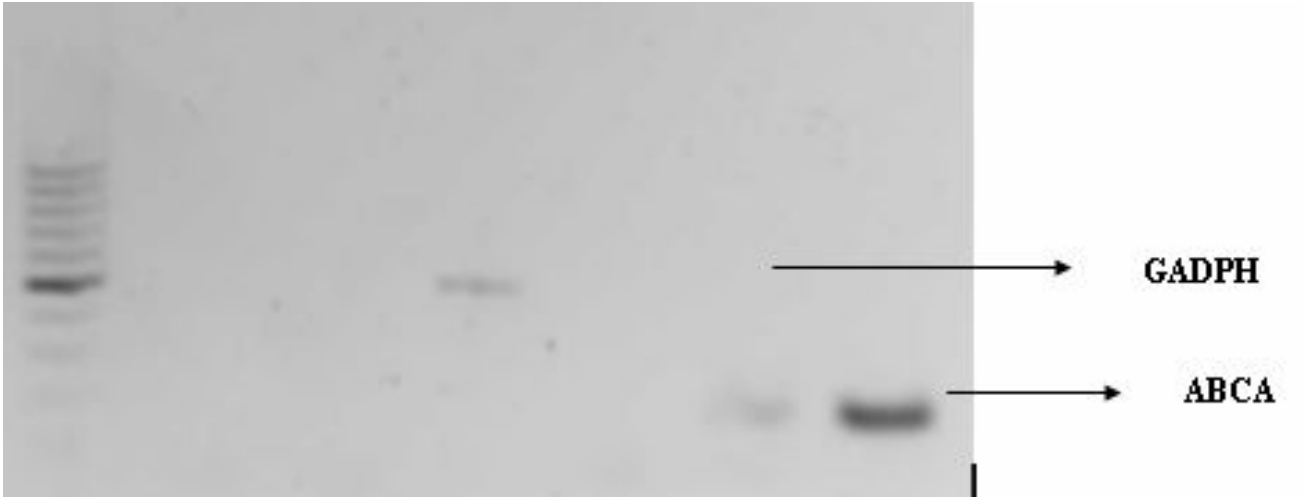
**Resim 11:** Konfluen yapı gösteren morfolojik olarak endotel yapısındaki korpus kavernozum hücrelerinin görünümü (x400 büyütme)

Daha sonra morfolojik olarak endotel hücre görünümünde olan petri kaplarındaki hücreleri alarak PCR çalışmasıyla endotel yerleşimli olan kaveolin, eNOS, ABCA1'i göstermeyi amaçladık. GAPDH kontrol grubu olmak üzere her seferinde örneklerden birinin cDNA'sını kullanarak PCR'ı kuruldu ve ilk deneyde uygun aralıkta ABCA1 görüntülendi (Resim 12).

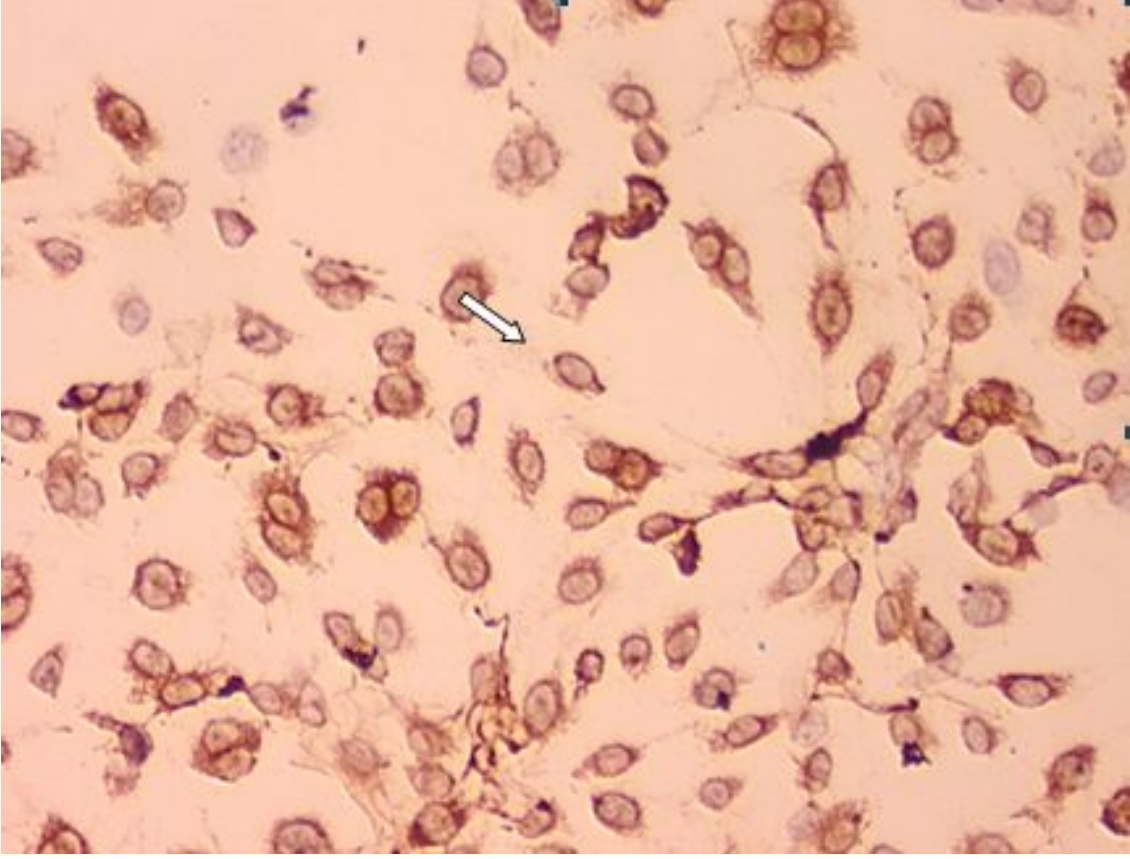


**Resim 12:** Korpus kavernozum hücrelerinde GAPDH ve ABCA'nın agaroz jeldeki görüntüleri

Daha sonra agaroz jelde kaveolin ve GAPDH yürütüldü. Kaveolin uygun aralıkta görüntülendi (Resim 13 ).



**Resim 13:** GAPDH ve kaveolinin agaroz jeldeki görüntüleri



**Resim 14:** Endotel hücrelerinin von Willebrand faktör ile immünohistokimyasal olarak gösterilmesi (x400 büyütme)



## **TARTIŞMA**

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü koşullar altında üretilmesine ve çoğaltılmasına dayanan bir laboratuvar işlemidir. Hücre kültürü elde etme teknikleri, özellikle 1950 ve 1960'lı yıllarda virüslerin memeli hücrelerinde üretilmesi üzerine yapılan çalışmalar ile gelişme göstermiştir. Son yıllarda deneysel kanser araştırmaları ve kök hücre konusunun bilimsel olarak öneminin ortaya konmasıyla toplumda da popülerlik kazanmıştır.

Son zamanlarda korpus kavernozum izolasyonunda farklı modellere başvurulmuş ve bu sayede ED ile ilişkili biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmalar hakkında bilgilerimiz artmıştır (53,2). Korpus kavernozum pür primer hücre kültürü özel hücre tiplerinin moleküler ve fonksiyonel karakteristiklerinin tanımlanmasına imkân sağlamıştır (3,4). İlginç olarak temel hücre kültür çalışmaları hemen hemen korpus kavernozum düz kas hücreleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu hücreler, peniste erektil fonksiyonu kolaylaştırarak ereksiyonda önemli görevler kazanmışlardır (9,20). Yapılan çalışmalar düz kasın, hem ereksiyon hem de endotel disfonksiyonu üzerinde etkili olduğu yönünde kanıt taşımaktadır (21).

İntakt korporal doku, kas doku hücreleri, endotelial hücreler ve fibroblastlarla heterojen bir yapıya sahiptir. Bunlar optimal erektil fonksiyonu sağlarlar (3,4). Her bir hücrenin özellikleri, diğer hücre tipleriyle olan ilişkileri (17), organ banyosu (3,5,6,15) ve kültür ortamındaki ilişkileri iyi tanımlanmalıdır. Bu da yakın zamanda spesifik hücre tipi üzerinde primer kültür yapılmasını kolaylaştıracaktır. Bununla birlikte izole hücre kültürlerinde diferansiasyonun bozulması ve hücre saflığının sağlanamaması hücre kültür tabanlı deneylerde sonuçların değerlendirmesini karmaşık hale getirmektedir (22).

Korpus kavernozum parankimi düz kas lif demetlerinden oluşmaktadır. Fibröz iskelet, tunika albuginea ve ona ait fibröz sütunları, intrakavernöz fibröz iskelet, periarteriyel ve perinöral fibröz kılıfları içerir. Kavernöz vasküler boşluklar (sinüzoidler), düz kas yapısının içine gömülü olarak bulunmaktadır. Böylece düz kas, her sinüzoidi gerçek bir musküler duvarla oluşturmaz (33). Spesifik hücre tiplerinin izolasyonu ve kültürünün yapılabilmesi, farklı protokollerle her hücre tipinde yüksek düzeyde canlılık ve saflığın sağlanmasını gerektirir.

Son zamanlarda, korpus kavernozumdan saf primer hücre kültür eldesi için hala pek çok teknik zorluk bulunduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Çünkü daha önceki çalışmalarda izole endotel veya düz kas hücre kültürlerinde morfolojik ve fonksiyonel özelliklere odaklanılmıştır. Bununla birlikte izolasyon protokol ayrıntılarına dikkat edilmemiş, kültür kompozisyonunun özellikleri tam olarak anlaşılammış ve bazen de hücre

kültürü ile ilgili deney sonuçlarıyla ilgili yanlış yorumlar yapılmıştır. Bu nedenle bu çalışmaya odaklı, kavernozaal hücre kültür izolasyonu, homojen hücre yüzdesi, hücresel fenotiple ile ilgili birçok makale incelendi. Bu çalışmayla, daha sonra yapılacak, üremeye ilgili izolasyon metodlarını tespit etmek, insan penisinden yüksek homojenlikte ve morfolojik olarak iyi diferansiye endotel, düz kas ve fibroblastik hücreleri oluşturmak amaçlanmıştır.

Pilatz ve arkadaşlarının 2005'de yaptığı çalışmada, yaş ortalaması 39 yıl (17 – 57 yıl) olan toplam 57 hastanın kavernozaal dokuları alınmıştır. Dokular, 33 hastada transseksüel transformasyon esnasında, 23 hastada penil deviasyon operasyonu, 1 hastada da penil karsinom operasyonu esnasında alınmıştır. Benzer deneyler fetal kavernozaal düz kas hücreleri üzerinde Crescioli ve Maggi tarafından yapılmış olup, hücre kültürüne estradiol eklenmesiyle doz bağımlı olarak hücre proliferasyonunda azalma görülmüştür (39). Aynı ortama testosteron eklenmesiyle fetal düz kas hücre proliferasyonu artmıştır. Krall yaptığı çalışmada insan korpus kavernozaal doku örneğini, 22 yaşında potent bir erkeğin distal kesiminden ampute edilen penisinden almıştır (52).

Schultheiss, çalışmalarında penil deviasyon ameliyatı geçiren 19- 63 yaş aralığındaki 12 hastanın penil dokularından biyopsi ile örnek almış ve transseksüel transformasyon operasyonu olan 6 hastanın penil dokularında immünohistokimyasal boyama yöntemi ile androjen ve östrojen alfa reseptör varlığı araştırılmıştır (1,8). Androjenlerin sinir sistemi üzerinde hem periferik hem de santral etkilerinin olmasına rağmen korpus kavernozaal üzerinde lokal etkileri de mevcuttur. 7 gün boyunca kültürle belli miktarlarda; testosteron, dihidrotestosteron, estradiol ve progesteron uygulanarak androjen ve östrojen reseptörleri hem stromal hem de endotelial hücrelerde aranmıştır (1). Primer endotelial hücre kültürü, transseksüel grubunun korpus kavernozaal dokularının enzimatik izolasyonu ile oluşturulmuştur. 6 hastadan yeterli miktarda (yaklaşık 200 mg) doku elde edilmiştir. Bu doku materyali 1mm<sup>3</sup> lük parçalara ayrılarak, üzerine %0,02'lik kollajenaz A eklenmiş, 1 saat 37<sup>0</sup>C'de %5 CO<sup>2</sup> ortamında inkübe edilmiştir. Bu kültürler CD31 ve von Willebrand Faktör antikolarıyla immünohistokimyasal yöntemle boyanarak % 95 immünopozitif hücre saptanmıştır. Granchi ve arkadaşları insan fetal penil hücreleri kullanarak fibroblast kontaminasyonu olmadan, pür ve diferansiye insan erişkin korpus kavernozaal hücre kültürü yapmışlar ve izolasyonu kolay ve diferansiyasyon oranları iyi olan düz kas hücrelerini göstermişlerdir (6). Rees ve arkadaşları da kavernozaal eksplant tekniği kullanarak pür düz kas hücreleri elde etmişler (14). Zheng ve arkadaşları enzimatik izolasyon yöntemiyle erişkin insan korpus kavernozaaldan fenotipik olarak stabil düz kas hücre dizini oluşturmuşlardır (22).

Çalışmamızda, grubumuz ED nedeniyle başvuran, ortanca yaş 59 olan ve yaşları 54 – 65 arasında değişen, Doppler USG ile gösterilmiş vaskülojenik ED problemi mevcut olan 8 hasta üzerinde yapıldı.

Dokuların ameliyathaneden laboratuvara uygun sıcaklıktaki medyum ile (DMEM) hızla ulaştırılarak taze doku üzerinde çalışmak mümkün olmaktadır. Kavernozal dokunun endotel hücrelerinin enzimatik ayrımını sağlamak için, Pilatz'ın çalışmasında yaklaşık 16 mm<sup>3</sup>'lük parçalar kullanılmıştır. Daha sonra bu örnekler 1 – 2 mm<sup>3</sup>'lük parçalara ayrılarak plastik tüplere konulmuştur. Çalışmamızda dokunun hastadan yaklaşık 30 – 35 mm<sup>3</sup>'lik tek blok halinde çıkarılmasına özen göstererek, bundan 1 – 2 mm<sup>3</sup>'lük doku parçaları elde ettik. Pilatz'ın deney düzeneğinde, dokular üzerine 5 ml kollajenaz veya elastaz eklenerek ve 37<sup>0</sup> C'de shaker'a konulmuştur. Çalışmamızda 1 – 2 mm<sup>3</sup>'lük dokuları, eklenen enzim miktarları farklılık oluşturacak şekilde (1 – 4 ml kollajenaz veya elastaz) gruplara ayırdık. İzolasyonun 14. gününde kollajenazla yapılan inkübasyonda stromal hücreler tarafından kontaminasyonda artış olmaktadır. Aynı zamanda kollajenazın miktarı artınca kontaminasyonun da arttığı gösterilmiştir (44). Bu etkiyi yaptığımız deneylerde de gözlemledik. Bunun üzerine kollajenaz uygulamasını tamamen terk ederek sadece enzimatik parçalama işlemi için elastaz kullandık. Sonuç olarak intakt doku parçalarının inkübasyonu yerine kıyılarak parçalanmış doku parçalarına elastaz uygulanması ve metal bir spatula ile 2 dk boyunca dokunun ezilmesinin hücre saflık yüzdesinde belirgin bir artış yaptığı görülmüştür.

Pilatz'ın çalışmasında % 0,02 kollajenaz A kullanımı ve uzun inkübasyonla endotel dışı hücrelerde belirgin artış olmaktadır (44). Diğer taraftan % 0,05 elastaz kullanımında değişik inkübasyon sürelerinde az da olsa kontaminasyon olmaktadır (44). Elastaz kullanımıyla kollajenazın aksine, ekstraselüler matriksteki stromal hücrelerin parçalanması mümkün değildir (5,16,27,28). Fakat stromal hücreler ekstraselüler matriksi hemen hemen terk etmektedirler. Literatürde kolonize olmuş silendirler, magnetik tanecikler, tanımlanamayan magnetik aktif hücreler ve kullanılan jelatin kaplı kültür flaskları purifikasyon komplikasyonları olarak karşımıza çıkmaktadır (5,16,27,28). Bizim enzimatik prosedürümüzde küçük doku örneklerinde dahi yüksek sayıda hücreye ulaşılmıştır.

Çalışmamızda kontaminasyon elastaz kullanımında da görüldü fakat adherensi sağlamak için kullandığımız laminin veya attachment faktör sonrası kontaminasyonda azalma oldu. Zaten % 0,02 kollajenaz A'yı, % 0,05 elastazla kıyasladığımızda 14 günlük inkübasyon dönemi sonrası final ürünlerde endotel hücrelerin belirgin olarak iyileşmiş olduğu görüldü (44). Sonuç olarak enzimatik olarak izole edilen endotel hücreleri kendi fenotipik özelliklerini

kaybetmezler. Hücreler, kültür içinde kaldırım taşı manzarası, hücrel spesifik protein ekspresyonu, kontakt inhibisyon gösterirler.

Pilatz inkübasyon süresini 20 dk ile 24 saat arasında tutmuştur. Krall'ın yaptığı çalışmada insan korpus kavernozum doku örnekleri %95 CO<sub>2</sub>, %5 O<sub>2</sub> içeren ortamda 4 gün 37<sup>0</sup>C'de inkübe edilmişler ve 4 günün sonrasında yapılan mikroskopik bakıda dokunun etrafında hücrelerin görülmesi kanıt değeri taşımıştır. Kültürün büyüme medyumu değiştirilip yerine taze medyum konarak deneye devam edilmiştir. Çalışmamızda 1 – 4 saat arasında inkübasyon periyodu kullanıldı. İnkübasyon sürelerindeki farklılıklar kontaminasyon ya da hücre saflığı açısından anlamlı bir değişiklik oluşturmadı.

Doku ne kadar küçük parçalara ayrılarak kültür oluşturulursa o kadar kısa sürede konfluen yapı ve homojen hücre kültürü elde edilmiş olmaktadır. Pilatz, enzimatik parçalama işlemini sonlandırmak için de 10 ml DMEM ve %10 FBS eklemiştir. 10 ml'lik cam pipet yardımıyla 2 dk pipetleme işlemi yaparak enzimatik parçalama işlemini tamamlamıştır. Pipetleme işlemi hücrelerin dokudan daha kolay ayrılmasını sağlamaktadır. Pipetleme işlemi yerine parçalanmamış doku bloklarına bir spatula yardımıyla 2 dk boyunca ezme işlemi de uygulanabilir. Sonradan bu solüsyon 40 µm'lik aralıklı naylon filtrelerle filtre edilerek, bu tek tek hücreler içeren filtrat 200 G'de 10 dk santrifüj edilerek 75 cm<sup>2</sup> lik hücre kültür flasklarına 10 ml EBM eklenerek inkübe edilebilir. Filtre kullanılan örneklerde daha homojen hücre içeren kültürler elde edilmiştir (44). Fakat çalışmamızda filtre kullanılarak hazırlanan kültürlerde korpus kavernozum hücrelerine rastlanılmamıştır.

Çalışmamızda enzimatik parçalama işlemini sonlandırmak için 37<sup>0</sup> C'de shaker'dan çıkardığımız petri kaplarının içerisine farklı miktarlarda DMEM eklendi ve bu değişiklik hücre kültür oluşumunda herhangi bir farklılık ortaya koymadı. DMEM veya EBM eklenerek inkübatöre konulan petri kaplarında sonuçta EBM ile endotel hücrelerin büyüme, sayı ve diferansiyasyonunun iyileştiği görülmüştür. Endotel hücreler kültürde endotel hücre spesifik hücre kültür medyumu (EBM) kullanıldığı zaman, viabilite ve diferansiyasyonlarını aylarca koruyabilirler. Bunun yanında DMEM ile birlikte FBS kullanıldığında endotel hücreleri canlılıklarını 14 günden fazla sürdürmediği görülmüştür. Endotel hücreleri içeren kültür kapları fibroblast veya düz kas hücreleriyle kontaminasyona uğramaktadır.

Kavernozaal düz kas hücre kültürü izolasyonu yapmak için de bugüne kadar diğer otörlerin tarif ettiği protokoller uygulanarak eksplant hücre kültürü hazırlandı. Eksplant hücre kültürü için hücrelerin yaklaşık 3 – 4 gün içerisinde yüzeye yapışması gerekir. Bu yapışan hücreler 4 ile 10 gün içinde eksplant dokudan ayrılmaya ve dokunun etrafında küçük gruplar olarak çoğalmaya başlarlar. Hücreler petri kap içinde bir arada olma özelliği kazandığında

kontakt inhibisyon oluşmadan eksplantın ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. Eksplant kültür yaptığımız ilk dokunun görüntüleri kaldırım taşı manzarası gösterirken daha sonra iğsi yapı kazanmış hücreler 5. pasaja kadar çoğaltıldıktan sonra dondurularak saklanmıştır.

Laminin yüzey ve DMEM kullandığımız bir başka kültürde 15 gün sonra morfolojik olarak endotel hücresi görünümü saptanırken, 20. gün izleminde zeminin tamamen iğsi hücre ile kaplandığı görüldü. Eksplant kültürde EBM kullanılması durumunda endotel hücrelerinin ilerleyen pasajlara dek morfolojik yapısını koruduğu görüldü. Sonuç olarak eksplant kültürün lamininli plakta ve büyüme medyumunu olarak da EBM kullanılmasıyla en iyi sonucun elde edildiğini gördük.

Pilatz bunun dışında; enzimatik hücre izolasyon tekniklerini de uygulamıştır. Kullanılabilir kavernozaal doku oldukça sınırlı olduğundan endotel hücre izolasyonundan sonra enzimatik parçalanmaya uğramamış olan dokuyu farklı konsantrasyonlarda kollajenaz ve elastaz kullanarak 1 – 6 saat inkübatörde tutulmasını takiben düz kas hücreleri elde edilmiştir.

Tunika albuginea fibroblast eldesi daha önce tanımlandığı üzere hem enzimatik hem de eksplant teknikle mümkün olmaktadır. Petri kapları hücrelerin yüzeye yapışmasını engellemek için 3 gün inkübatörden çıkarılmadı. Daha sonra da kontrollerimiz kontaminasyon riskini en aza indirmek için gınaşırı yapıldı. Günlük izlem yapıldığında hem kültür kontaminasyonunun arttığı hem de hücrelerin adherensinin zorlaştığı görüldü. Tüm kontrollerimizde mikroskopik fotoğraflama yöntemiyle hücreler görüntüledi. Bu sayede daha objektif günlük izlem yapılmış oldu.

Pilatz korpus kavernozaal hücrelerini plak yüzeyinden kaldırmak için % 0,05'lik tripsini 37<sup>0</sup> C'de 5 dk uygulamıştır. Çalışmamızda, tripsin 37<sup>0</sup> C'lik inkübatörde 1 dk uygulandı. Tripsinle daha uzun süre muamele ettiğimizde hücrelerin plak üzerinde konfluen yapıyı daha uzun sürede oluşturduğu görüldü. Bunun yanında lamininli petri kabı veya attachment faktör uyguladığımız plaklarda, tripsini uyguladıktan sonra hücrelerin yüzeyden kalkması zorlaştı. Bu durumda tripsini ortamdaki uzaklaştırmadan kaba tabandan uygulanan vurma hareketiyle kültürün kontaminasyonunda ve hücrelerin çoğalmasında değişiklik olmadan hücrelerin tabandan daha kolay ayrıldığı görüldü.

Kavernozaal endotel hücre eldesi için yaklaşık 50 farklı enzimatik izolasyon tekniği kullanarak sonuçta yüksek saflıkta endotel hücresi elde edildi. Doku flasklarında kavernozaal hücre kültürü 1000 hücre/mm<sup>2</sup> dansitedeyken tipik kaldırım taşı manzarası ve kontakt inhibisyon göstermektedir (16,27,28).

İzole kültürlerde cam pipet yardımıyla pipetleme usulüyle mekanik parçalama işlemi uygulanan hücrelerin 12,5 kez daha yüksek sayıda ve artmış endotelial saflıkta olduğu saptanmış olduğundan Pilatz bu yüzden final deneylerde bu yöntemi uygulamıştır (44). Deneysel ortamımızda, mekanik parçalama işlemi iyi sonuçlar vermediği için enzimatik parçalama işlemi uygulandı (44). Alınan örneklerde endotel hücre varlığını göstermek için, endotel kaynaklı kaveolin ve ABCA1 PCR'da gösterildi. İmmunhistokimyasal olarak hücreler, endotel işaretleyicisi olan von Willebrand faktörle boyandı. Başka çalışmalarda endotel işaretleyicisi olan CD31 ve von Willebrand faktör varlığı Western blot tekniğiyle gösterilmiştir. Aynı zamanda kontaminasyonu ekarte etmek için fibroblast spesifik markırla boyanmıştır (44).

Enzimatik izolasyon tekniği uygulanan kültürlerde fazla miktarda diferansiye olmuş düz kas hücresi bulunmaktadır. Bu kültürlerde düz kas hücresi ve fibroblastlar morfolojik olarak ayrılamaz. Konfluen hücre kültürlerinin düz kas hücre markırlarıyla boyanmasını takiben düz kas hücreleri homojenmiş gibi görünür. Fakat hücreler daha az dansitede başka bir yere ekim yapılarak boyanırsa arada hiç boyanmamış hücrelere de rastlanılabilir. Enzimatik izolasyonda, inkübasyon öncesi 100 dakika % 0,05 elastaz veya 60 dakika % 0,02 kollajenaz A uygulanarak endotel hücreleri elde edilmiştir. Kollajenaz A'nın % 0,5 konsantrasyonda 3 saat uygulanmasıyla kavernoza doku tamamen ayrılmaktadır (44). Bu uygulamayla yüksek hücre sayısı elde edilmektedir.

Çalışmamızda 4 saat inkübasyon süresi uygulanan iki ayrı örnekte ve lamininli plakta laminin kullanılmayan plağa göre daha fazla hücre görüldü. Enzim olarak elastaz kullandığımız iki ayrı örnekte, 2 saatlik inkübasyonda, 4 saatlik inkübasyona göre daha fazla hücre görüldü. Büyüme medyumunu olarak EBM, enzim olarak da elastaz kullandığımız örnekte kollajenaz kullandığımız gruba göre daha fazla sayıda hücre görüldü. Attachment faktör kullandığımız iki ayrı grupta 2 saatlik inkübasyona konulan petrideki hücreler, 4 saatlik inkübasyona göre daha fazla oldu.

Modifiye inkübasyon süreleriyle birlikte düşük konsantrasyonda enzim, minimal izolasyon değişiklikleri, çoklu inkübasyon basamakları veya enzimatik işlem uygulanmamış dokuda pipetting (10,11,13,15), hücre sayısında veya düz kas hücrelerinin yüzdesinde değişiklik yapmamıştır (44).

## **SONUÇLAR VE ÖNERİLER**

Bu çalışmada amaç; insan korpus kavernozumundan hücre izolasyon teknikleri konusundaki bilgilerimizi iyileştirmektir. Spesifik hücre tiplerinin izolasyonu ve kültürünün oluşturulması, farklı protokollerle her hücre tipinde yüksek düzeyde canlılık ve saflığın sağlanmasını gerektirir. Çalışmamızda, erektil disfonksiyonu olan insan dokusundan korpus kavernozum hücre kültürü ilk kez elde edilmiştir. Kolesterol transportunda önemli rol oynayan ABCA ve kaveolin gen ekspresyonları ve immünohistokimyasal olarak von Willebrand faktör ile endotel hücreleri gösterilmiştir. Daha önce de uygulamaları başarılı olan basit ve kolay uygulanabilir yöntemlerle kavernozaal hücrelerin enzimatik izolasyon tekniği daha ileride yapılacak araştırmalara temel oluşturacaktır. Çalışmamızın, ateroskleroz modelinde insan dokusundan yapılan hücre kültür çalışmalarına ışık tutacağını düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

- 1- Androgen and estrogen receptors in the human korpus kavernozum penis: immunohistochemical and cell culture results Dirk Schultheiss, Rafael Badalyan, Adrian Pilatz, *World J Urol* (2003) 21: 320–324
- 2- Phenotypic and cytogenetic characterization of a human korpus kavernozum cell line Dahiya R, Sikka S, Hellstrom WJ, et al. *Biochem Mol Biol Int* 1993;30(3):559–569.
- 3- Comparison of endothelin 1- mediated tissue tension and calcium mobilization effects in isolated rabbit korpus kavernozum. Abeysinghe HR, Clancy J, Qiu Y. *Urology* 2002;60(5):925–930.
- 4- The microarchitecture of the intrakavernozaal smooth muscle and the kavernozaal fibrous skeleton. Goldstein AM, Padma-Nathan H. *J Urol* 1990;144(5):1144–1146.
- 5- Effects of hypoxia on endothelin-1 sensitivity in the korpus kavernozum. Filippi S, Marini M, Vannelli GB, et al. *Mol Hum Reprod* 2003;9(12):765–774.
- 6- Expression and regulation of endothelin-1 and its receptors in human penile smooth muscle cells. Granchi S, Vannelli B, Vignozzi L, et al. *Mol Hum Reprod* 2002; 8(12):1053–1064.
- 7- Peroxisome-proliferator activated receptor  $\gamma$  ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells. Calnek D S, Mazzella L, Roser S, et al: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003; 23: 52 -57.
- 8- Androgen and estrogen receptors in the human korpus kavernozum penis: immunohistochemical and cell culture results. Schultheiss D, Badalyan R, Pilatz A, et al. *World J Urol* 2003;21(5):320–324.
- 9- Vascular endothelial growth factor promotes proliferation and migration of cavernous smooth muscle cells. Liu X, Lin CS, Graziottin T. *J Urol* 2001;166(1):354–360.
- 10- Adrenergic receptors on smooth muscle cells isolated from human penile korpus kavernozum. Costa P, Soulie-Vassal ML, Sarrazin B, et al. *J Urol* 1993;150(3):859–863.
- 11- Characterization of ATP-sensitive potassium channels in human korporal smooth muscle cells. Lee SW, Wang HZ, Christ GJ. *Int J Impot Res* 1999;11(4):179–188.
- 12- Characterization of K currents in cultured human korporal smooth muscle cells. Christ GJ, Spray DC, Brink PR. *J Androl* 1993; 14(5):319–328.
- 13- Potassium outward currents in freshly dissociated rabbit korpus kavernozum myocytes. Malysz J, Gibbons SJ, Miller SM, et al. *J Urol* 2001;166(3):1167–1177.
- 14- Human and rabbit kavernozaal smooth muscle cells express Rho-kinase. Rees RW, Ziessen T, Ralph DJ, et al. *Int J Impot Res* 2002;14(1):1–7.



- 15-Relaxation of rabbit cavernous smooth muscle to 17 beta-estradiol: a non-genomic, NO-independent mechanism. Kim SC, Seo KK, Myung SC, et al. *Asian J Androl* 2004;6(2):127–131.
- 16- Engineering of cells and tissues for treatment of erectile dysfunction. Atala A. *World J Urol* 2001;19(1):67–73.
- 17- Reconstitution of human korpus kavernozeum smooth muscle in vitro and in vivo. Kershen RT, Yoo JJ, Moreland RB, et al. *Tissue Eng* 2002;8(3):515–524.
- 18- Functional tissue engineering of autologous tunica albuginea: a possible graft for Peyronie’s disease surgery. Schultheiss D, Lorenz RR, Meister R, et al. *Eur Urol* 2004;45(6):781–786.
- 19- Regenerative medicine in andrology: Tissue engineering and gene therapy as potential treatment options for penile deformations and erectile dysfunction. Schultheiss D. *Eur Urol* 2004;46(2):162–169.
- 20- Pathophysiology of Erectile Dysfunction. Pilatz et al. *European Urology* 2005;47: 710–714
- 21-Endothelial dysfunction in erectile dysfunction: role of the endothelium in erectile physiology and disease. Bivalacqua TJ, Usta MF, Champion HC, et al. *J Androl* 2003; 24(6 Suppl):S17–37.
- 22-Establishment of a phenotypically stable contractile smooth muscle cell line from juman korpus kavernozeum. Zheng Y, Malloy TR, Weber WT, et al. *J Urol* 2003;169(Suppl):306.
- 23- Ex vivo expression of angiogenic growth factors and their receptors in human penile kavernozeal cells. Rajasekaran M, Kasyan A, Allilain W, et al. *J Androl* 2003;24(1):85–90.
- 24- Gap junctions formed of connexin43 are found between smooth muscle cells of human korpus kavernozeum. Campos de Carvalho AC, Roy C, Moreno AP, Melman A, et al. *J Urol* 1993;149(6):1568–1575.
- 25- PGE1 suppresses the induction of collagen synthesis by transforming growth factor-beta 1 in human korpus kavernozeum smooth muscle. Moreland RB, Traish A, McMillin MA, et al. *J Urol* 1995;153(3 Pt 1):826–834.
- 26- In vitro effect of different intracavernous vasoactive drugs on the viability of human kavernozeal endothelial cells. Pilatz A, Schultheiss D, Gabouev AI, et al. *Eur Urol Suppl* 2004;3(2):62.
- 27- Culture of human korpus kavernozeum endothelium. Carson MP, Saenz de Tejada I, et al. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989;25(3 Pt 1):248–254.

- 28- Biochemical eNOS responses of isolated cultured human cavernosal endothelial cells. Tran KB, Engel K, Teal T, et al. *J Urol* 2003;169(Suppl):304.
- 29- Isolation of metabolically active endothelial cells in high yield from bovine cavernous bodies. A model for functional studies on freshly isolated microvascular endothelial cells. Dobrina A, Soranzo MR, Rossi F. *Cell Tissue Res* 1983;232(3):579–591.
- 30- The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. Ross R. *J Cell Biol* 1971;50(1):172–186.
- 31- Glucose-induced changes in protein kinase C and nitric oxide are prevented by vitamin E. Ganz MB, Seftel A. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;278(1):E146–152.
- 32- Smooth muscle myosin regulation by serum and cell density in cultured rat lung connective tissue cells. Babij P, Zhao J, White S, et al. *Am J Physiol* 1993;265(2 Pt 1):L127–132.
- 33- The fibroblast-specific MAb AS02: a novel tool for detection and elimination of human fibroblasts. Saalbach A, Aust G, Haustein UF, *Cell Tissue Res* 1997;290(3):593–599.
- 34- Comparison of antidesmin and anti-actin staining for the computerized analysis of cavernous smooth muscle density. Sattar AA, Haot J, Schulman CC, et al. *Br J Urol* 1996;77(2):266–270.
- 35- Smooth muscle pathology and erectile dysfunction. Wespes E. *Int J Impot Res* 2002;14(Suppl 1):S17–21.
- 36- Mechanisms of venous leakage: a prospective clinicopathological correlation of corporeal function and structure. Nehra A, Goldstein I, Pabby A, et al. *J Urol* 1996;156(4):1320–1329.
- 37- Prostaglandin E2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E. prostanoid receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation. Kolodsick JE, Peters-Golden M, Larios J, et al. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29(5): 537–544.
- 38- Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. Worth NF, Rolfe BE, Song J, et al. *Cell Motil Cytoskeleton* 2001;49(3):130–145.
- 39- Expression of functional estrogen receptors in human fetal male external genitalia. Crescioli C, Maggi M, Vannelli GB, et al. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1815 –1824
- 40- Regulatory functions on the vascular endothelium. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. *N. Eng J Med* 1990;323: 27 -36.
- 41- Tissue Angiotensin and Pathobiology of Vascular Disease. A Unifying hypothesis. Dzau VJ. *Hypertension*.2001;37: 1047 -1052.

- 42- The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Apr;86(8):2863- 2867.
- 43- Regulatory functions on the vascular endothelium. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. *N Eng J Med* 1990;323: 27- 36.
44. Isolation of Primary Endothelial and Stromal Cell Cultures of the Corpus Cavernosum Penis for Basic Research and Tissue Engineering. Adrian Pilatz, Dirk Schultheiss, Alexander I, et al. *European Urology* 47 (2005) 710–719.
- 45- Tissue Angiotensin and Pathobiology of Vascular Disease. A Unifying Hypothesis. Dzau VJ. *Hypertension*.2001;37: 1047- 1052.
- 46- Separation of caveolae from associated microdomains of GPI-anchored proteins. Schnitzer J, McIntosh D, Dvorak AM, et al. *Science* 1995; 269: 1435–1439.
- 47- Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. Blair A, Shaul PW, Yuhanna IS, et al. *J Biol Chem* 1999; 274: 32512–32519.
- 48- Caveolin cycles between plasma membrane caveolae and the Golgi complex by microtubule-dependent and microtubule-independent steps. Conrad, P. A, E. J. Smart, Y. S. Ying, R. G. Anderson, and G. S. Bloom. *J. Cell Biol*; 1995 131:1421–1433.
- 49- Identification of caveolin- 1 in lipoprotein particles secreted by exocrine cells. Liu, P, W. P. Li, T. Machleidt, and R. G. Anderson. 1999. *Nat. Cell Biol*.1: 369–375.
- 50- Caveolin- 1 Expression Is Associated with Plaque Formation in Hypercholesterolemic Rabbits; Wei-Wen Lin, Yu-Chun Lin, Ti-Yu Chang, et al. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*:2006 Volume 54(8): 897–904.
- 51- Lipoprotein promotes Caveolin- 1 and Ras translocation to caveolae: role of cholesterol in endothelial signaling *Arterioscler Thromb*. Zhu Y, Liao HL, Wang N, et al. *Vasc Biol* 2000;20: 2465– 2470.
- 52- Characterization of cyclic nucleotide and inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium-exchange activity of smooth muscle cells cultured from the human corpora cavernosa. Krall JF, Fittingoff M, Rajfer J. *Biol Reprod* 1988;39(4):913– 922.
- 53- The biochemical and neurologic basis for the treatment of male erectile dysfunction. Moreland RB, Hsieh G, Nakane M, et al. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;296(2):225–234.