

Vasküler Patolojilerin Araştırılmasında Önemli Bir Araç: Endotel Hücre Kültürü

An Important Method in the Investigation of Vascular Pathologies: Endothelial Cell Culture

Yusufhan Yazır¹, Hakkı Dalçık¹

¹ Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye

¹ Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Kocaeli University, Kocaeli, Turkey

ÖZET

Endotel hücreleri kan damarlarının iç yüzeyini döşer ve damar duvarıyla dolaşan kan arasında ayırıcı bir yüzey oluşturur. Endotel hücreleri bariyer oluşturma, vazokonstriksiyon, pıhtılaşma ve yangı gibi birçok vasküler biyolojik olayda rol alır. Farklı organlarda bulunan endotel hücreleri farklı fonksiyonlara ve yüzey fenotiplerine sahiptir. Bu hücreler prostaglandin- I_2 , trombosit aktive edici faktör, kollajen, endotelin-1, laminin, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü gibi birçok molekül sentezler. Hücre kültüründe hücreler, laboratuvar koşullarında izole edilir, devamlılıkları sağlanır ve çoğaltılır. Hücre kültür teknikleri; aşı, antikor ve enzim üretimi, ilaç araştırmaları, hücreler arası bağlantılar gibi birçok farklı deneysel çalışma için bu hücrelerin organizma dışında kullanımına olanak sağlar. İnsan göbek kordonu veninden elde edilen endotel hücreleri iyi bir endotel hücre kaynağıdır. Çünkü bu hücreler endotel hücrelerin temel özelliklerine sahiptir, kolay bulunur ve ucuzdur.

Anahtar Kelimeler: Endotel hücresi; hücre kültür teknikleri; göbek kordonu.

Geliş Tarihi: 12.03.2012 • **Kabul Tarihi:** 21.03.2012

ABSTRACT

Endothelial cells line the interior surface of blood vessels and form an interface between circulating blood in the lumen and the rest of the vessel wall. Endothelial cells are involved in many aspects of vascular biology, including barrier function, vasoconstriction, coagulation and inflammation. The endothelial cells in different organs have different functions and surface phenotype. These cells express prostaglandin- I_2 , platelet activating factor, collagen, endothelin-1, laminin, fibronectin and growth factors including platelet derived growth factor, fibroblast growth factor. In the cell culture, cells can be isolated, maintained and proliferate in the laboratory conditions. The techniques of the cell culture have allowed scientists to use the cells in vitro for experimental studies, such as the production of vaccine, antibody and enzyme, drug research, cell-cell interactions. Human umbilical vein endothelial cell is a good source for endothelial cell, because it is cheaper, easy to find and has the basic features of the normal endothelial cells.

Key Words: Endothelial cells; cell culture techniques; umbilical cord.

Received: 12.03.2012 • **Accepted:** 21.03.2012

Kosuyolu Kalp Derg 2012;15(3):137-142 • doi: 10.5578/kkd.3563

Yazışma Adresi/
Correspondence

Dr. Yusufhan Yazır

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Kocaeli-Türkiye

e-posta

yusufhanyazir@yahoo.com

Kan dolaşımı ilk kez 1628 yılında William Harvey tarafından keşfedilerek tanımlandı. Kısa bir süre sonra da Malpighi, damar ağının varlığını ve kanla dolaşım arasındaki fiziksel ayırımı yaptı. 1800'lü yıllarda von Reckinghausen damarların sadece boş tünellerden ibaret olmadığını, onların içlerinin hücreler tarafından sarıldığını keşfetti. 1953 yılında Palade'nin elektron mikroskobik ve 1959 yılında Gowen'in fizyolojik çalışmaları sonrasında, endotel hücreleriyle kan damarlarının immünolojik, metabolik ve sekretuar fonksiyonları keşfedilmeye başlandı⁽¹⁾.

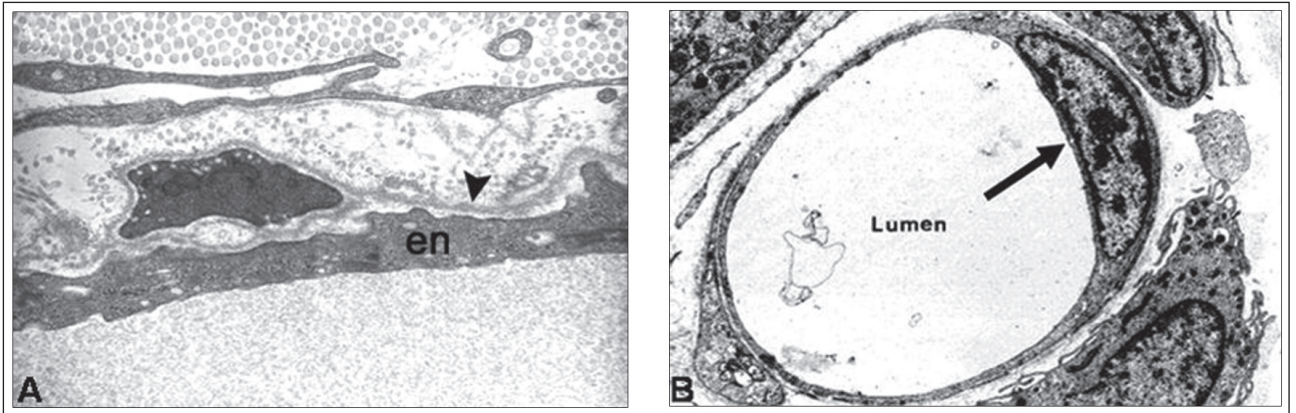
ENDOTEL HÜCRELERİ

Tüm damarları içten örten endotel hücreleri, tunika intimanın lümenine en yakın bölümünde tek sıra olarak bulunur ve atllarında bulunan kendi sentezledikleri bazal laminaya tutunur (Resim 1A)⁽²⁾. Endotel hücreleri besin maddelerinin, biyolojik olarak farklı birçok aktif molekülün ve kan hücrelerinin akışını düzenler. Endotel hücreleri bu fonksiyonlarını dışarıdan gelen sinyalleri değerlendirerek yapar. Bu uyarılar endotel hücrelerine gerek membran, gerekse sitoplazmalarında bulunan reseptör proteinler aracılığıyla ulaşır⁽¹⁾. Endotel hücreleri, ilk kez üçüncü haftanın başında vitellus kesesi duvarındaki visseral mezoderm içinde ilk kanı ve damarları oluşturacak boşlukların çevresinde bulunan mezenşimal hücrelerin dış tabakasından farklılaşan anjiyoblastlardan gelişir^(3,4).

Hücrenin sitoplazmasında merkezi yerleşen nükleus hücrenin şekline bağlı olarak yassılaştırmıştır (Resim 1B). Sitoplazmasında bir çekirdek, kutuplarında küçük bir Golgi kompleksi, az miktarda granüllü endoplazma retikulumu sisternası, mitokondri ve ribozom vardır. Ayrıca, sitoplazmada su, makromolekül ve elektrolit içeren transport vezikülleri bulunur. Nükleus çevresindeki bölgelerde bol

miktarda mikofilaman vardır. Bunlar içerikleri bakımından çeşitli varyasyonlar gösterir. Bir kısmı desminden oluşurken, bir kısmı da vimentin içerir. Bazıları ise her ikisini de içerir⁽⁵⁾. Ayrıca, sitoplazmalarında Weibel-Palade granülleri adı verilen, membranla çevrili granüller vardır. Bu granüller 0.1 µm eninde ve 0.3 µm boyunda olup, içlerinde kanın pıhtılaşmasına yardımcı maddelerden olan von Willebrand Faktör (faktör VIII) içerir. Bu faktör endotel hücrelerine özgüdür, başka bir hücre tarafından salgılanmaz⁽²⁾.

Endotel hücreleri sürekli kapiller, pencere kapiller ve aralıklı kapillerde olduğu gibi yapı ve fonksiyon bakımından buldukları yere göre değişik özellikler gösterir^(6,2). Farklı dokuların endotel hücreleri, protein ekspresyonu ve yüzey fenotipi açısından da birbirlerinden farklıdır. Genellikle endotel hücre belirteci olarak kullanılan von Willebrand faktör (Faktör VIII) tüm damar tiplerindeki endotel hücrelerince salgılanmalarına rağmen, bu salgılanma üniform değildir^(7,8). Beyin, karaciğer ve diğer organlardan kültüre edilen mikrovasküler endotel hücrelerinin hücre yüzey belirteçleri, protein taşıyıcıları ve salgıladıkları intraselüler enzimler farklıdır. Endotel hücreleri aynı organda bile farklılıklar gösterebilir. Örneğin; karaciğerde iki farklı sinüzoidal endotel hücresi olan hepatik periportal endotel hücreleri trombosit-endotel hücre adezyon molekülü (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1; PECAM-1) ve CD34 salgılamakta, sinüzoidal intrahepatik endotel hücreleri bunları salgılamamaktadır⁽⁹⁾. Bu, dokuya özgü fenotipik farklılıklar, uygun kültür koşullarıyla korunabilir. Endotel hücrelerinin fenotipine birçok faktör etki eder. Bunlara örnek olarak mekanik güçler; büyüme uyarıcılar ve inhibitörler; sitokinler; trombin, plazmin ve antikorlar gibi plazma proteinleri; perisit ve düz kas hücreleri gibi diğer doku



Resim 1. A. Endotel hücresi (en) bazal laminasının (ok başı) elektron mikroskobik görünüşü (http://php.med.unsw.edu.au/embryology/images/6/6a/Blood_capillary_EM_01.jpg internet adresinden alınmıştır). B. Bir kapiller endotel hücresi ve yassılaştırmış nükleusunun (ok) elektron mikroskobik görünüşü (<http://trc.ucdavis.edu> internet adresinden alınmıştır).

hücreleri; dolaşımda bulunan eritrosit lökosit gibi hücreler; ekstraselüler matriks; mikroorganizmalar ve bunların suda eriyebilen ürünleri verilebilir. Örneğin; aorttan elde edilen endotel hücreleri, akciğer kaynaklı ekstraselüler matriks üzerine kültüre edildiklerinde akciğere özel endotel hücresi adezyon molekülü (lung-specific endothelial cell adhesion molecule; Lu-ECAM-1) sentezlerken, böbrek kaynaklı matriks üzerine kültüre edildiklerinde böbrek kapillerleri gibi fenestralar geliştirdikleri görülmüştür^(10,11).

Damar lümenini içten saran endotel hücrelerinin birçok önemli fonksiyonu vardır. Endotel hücrelerinin can alıcı fonksiyonu trombosit yapışmasını ve pıhtılaşmayı önleyen antitrombotik bir yüzey sağlayarak kan akımını kolaylaştırmaktır⁽¹²⁾. Yaralanmada ise sitoplazmasında bulunan Weibel-Palade granülleri içindeki von Willebrand faktör ve plazminojen aktivatör inhibitörü salgılayarak trombin oluşumuna katkıda bulunur. Endotel hücreleri seçici bir bariyerdir. Küçük moleküllerin, sıvıların ve çözünmüş maddelerin kontrollü olarak pinositotik veziküller içinde dokulara geçmesinde seçici geçirgen bir bariyer olarak görev alır⁽¹³⁾. Endotel hücreleri, sadece dolaşım ve çevre dokular arasında yapısal bir bariyer değildir. Aynı zamanda kan akımı değişikliklerine, gerilmeye ve enflamasyon mediyatörlerine yanıt olarak çeşitli maddeler salgılayarak kan akımını düzenler. Vazodilatör etkili prostosiklin (prostaglandin- I_2) ve nitrik oksit, vazokonstrüktör etkili endotelin-1, trombosit aktive edici faktör (platelet activating factor; PAF) salgılar⁽¹⁴⁾. Endotelin-1 şu ana kadar bilinen en kuvvetli endojen vazokonstrüktör maddedir^(14,15). Aynı zamanda dolaşımdaki kan hücrelerinin trafiğini düzenleyen hücre yüzey moleküllerini de sentezler. Bu moleküller normalde az miktarlarda sentezlenirken, enflamasyon gibi anormal durumlarda daha fazla sentezlenerek, bazı kan hücrelerinin damar dışına çıkmasına yardım eder⁽¹⁶⁾. Endotel hücreleri kendi bazal laminalarını oluşturmak için tip II, tip IV ve tip V kollajen; fibronektin ve laminin sentezler^(5,13). Yine granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF), makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi büyüme faktörleri ve heparin sentezler. Endotel hücreleri, uzayan ve filizlenen damarlarda (anjyogenez) benzer hücrelerle kontakt kurar. Bu kontakt endotel hücreleri arasındaki hücre-hücre adezyonlarıyla olur. Adezyonda rol alan moleküller de immünglobulin süper ailesinden PECAM-1 ve vasküler endotelial kaderin (VE-kadherin)'dir. Her ikisi de endotel hücrelerince sentezlenir. Endotel hücreleri, vasküler gelişimde ekstraselü-

ler matrikste ilerleyebilen hücrelerdir. Bu ilerleme, integrinin aracılık ettiği hücre-matriks adezyon kompleksleriyle gerçekleşmektedir⁽¹⁾.

Çeşitli fonksiyonlarıyla gün geçtikçe daha önemli bir hücre tipi olan endotel hücrelerinin 1970'li yıllara kadar in vitro olarak incelenmesi mümkün değildi. 1973 yılında Jaffe'nin Maruyama ve Fryer'in çalışmalarını geliştirip, modifiye etmesiyle ilk defa bu hücreler uygun bir şekilde incelenebilir hale gelmiştir^(17,18).

HÜCRE KÜLTÜRÜ NEDİR?

Canlı bir organizmadaki bir veya birkaç hücre grubunun dokuda bulunduğu yerden çeşitli yöntemlerle alınarak in vitro olarak yaşatılması ve üreme yeteneği olanların çoğaltılmasıdır. Dokudan ayırıştırma ya spontan migrasyon ya mekanik yöntemler ya da enzimatik yöntemlerle olabilir. Hücre kültürünün sağladığı avantajlar arasında, incelenecek hücre ve/veya maddelerin etkilenebilecekleri tüm etkenlerden bağımsız olarak incelenebilmesi, ekonomik ve kolay olması, çevre şartlarının kontrol edilebilmesi sayılabilir. Kullanıldığı alanlardan bazıları arasında aşı, monoklonal antikor, enzim ve hormon üretimi; DNA ve RNA replikasyon araştırması; protein sentezi ve enerji metabolizması araştırmaları; ilaç etkileri; sinyal iletim mekanizmaları; hücre haberleşmesi; embriyonik ve kök hücre araştırmaları; sitogenetik analiz ve genetik manipülasyonlar vardır⁽¹⁹⁾.

Hücrelerin kültür ortamında yaşayabilmeleri, çoğalabilmeleri ve belki de en önemlisi işlevlerini koruyabilmeleri yaşayacakları yeni ortamın şartlarına bağlıdır. Bu şartlar in vivo ortamlarındakilerle benzer olmalıdır. Bu amaçla hücre kültüründe hücrelerin doğal ortamlarındaki gibi beslenmesini sağlayacak kültür medyumları ve fetal sığır serumu (fetal bovine serum; FBS), büyüme faktörleri, hücrelerin kültür kaplarının yüzeyine tutunabilecekleri jelatin, kollajen veya fibronektin, yeterince çoğaldıklarında onların pasajını sağlayacak tripsin ve EDTA, potansiyel bir enfeksiyonu engelleyecek antibiyotikler gereklidir⁽²⁰⁾.

HÜCRE KÜLTÜRÜ İÇİN ENDOTEL HÜCRE KAYNAKLARI

Endotel hücresi organizmanın birçok yerinde bulunan kan damarlarından elde edilebilmektedir. Bunlara örnek olarak beyin mikrovasküler damarlarından elde edilmiş endotel hücresi, insan göbek kordonu veni endotel hücresi (human umbilical vein endothelial cell; HUVEC), aorta endotel hücresi, glomerüler endotel hücreleri ve dermal mikrovasküler endotel hücreleri, miyometriyum mikrovasküler endotel hücreleri verilebilir⁽²¹⁻²⁵⁾.

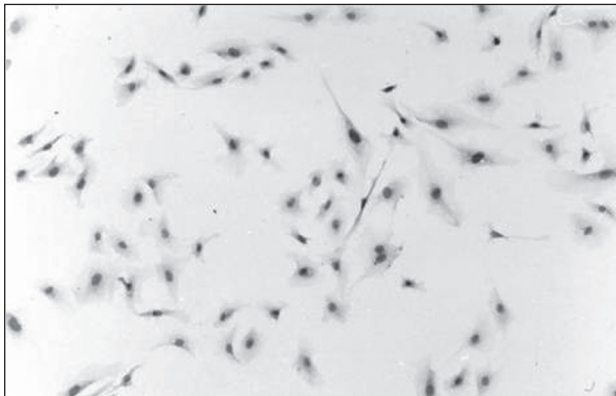
Yukarıdaki hücrelerin içinden HUVEC, in vivo endotel tabakasına oldukça iyi bir modeldir. Hem endotel hücrelerinin temel özelliklerini taşır hem de doğumdan hemen sonra atılan bir dokudan elde edilebildiği için bulunması kolay ve ucuzdur. Büyük, dallanma yapmayan ve geniş yüzeye sahip bir damar olması özelliğiyle üzerinde çalışılması kolaydır⁽²⁶⁾.

SAĞLIKLI BİR KÜLTÜR ve HUVEC

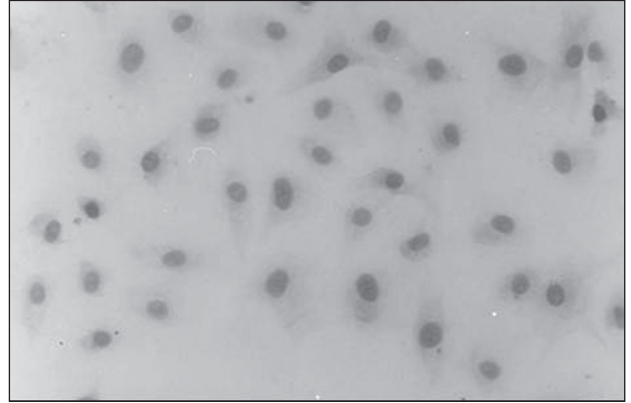
Sağlıklı bir kültür için kültürdeki hücrelerin sağlıklı olmaları gerekir. Bu da hem steril bir kültür ortamıyla hem de kültür için kullanılan maddelerin hücrelere uygun seçimiyle gerçekleşir. Sağlıklı olan endotel hücreleri 6-8 günde ekildikleri kültür kabının tüm yüzeyini (konfluent) kaplayacak kadar hızlı ürer ve endotel hücrelerinin işlevlerini yerine getirir. Çoğalırken ışık mikroskobunda morfolojileri incelendiğinde henüz konfluent olmayan ve sadece yüzeye yapışan endotel hücreleri ince, uzun sitoplazmik uzantılara sahiptir (Resim 2). Konfluent hale geldiklerinde uzun uzantılarının azaldığı, daha çok poligonol bir şekil aldıkları ve hem buldukları yüzeye hem de birbirlerine bağlandıkları görülür. Merkezi yerleşimli yuvarlak veya oval tek bir nükleus ve içinde bir veya birden fazla nükleolus bulunur (Resim 3). Nükleus düzgün sınırlıdır. Ancak hücre sınırları nükleustaki kadar net değildir ve bazı alanlarda görülmeyebilir. Özellikle çekirdeğin çevresi olmak üzere sitoplazmada vakuoller görülebilir, ancak endotel hücrelerinin sağlıklı olduğunu göstermesi açısından bu vakuoller sınırlı sayıda olmalıdır (Resim 4).^(17,18,21,26)

HUVEC İÇİN UYGUN KÜLTÜR KOŞULLARI

Hücrelerin beslenmesi ve fonksiyonlarına devam etmesini sağlamak için kullanılan kültür medyumlarını incelediğimizde endotel hücrelerinde DMEM, RPMI-1640 gibi med-



Resim 2. Hücre kültüründe konfluent olmamış uzun sitoplazmik çıkıntılara sahip endotel hücreleri (HE, x10) (Dr. Yusufhan Yazır'ın doktora tezinden alınmıştır).

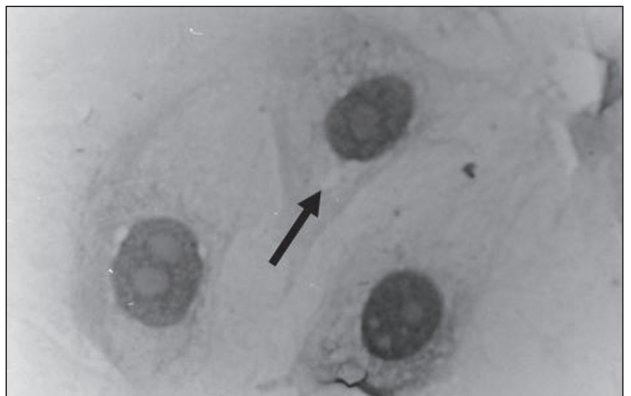


Resim 3. Konfluent olmaya başlayan endotel hücreleri poligonol şekil almaya başlamış (HE, x20) (Dr. Yusufhan Yazır'ın doktora tezinden alınmıştır).

yumların kullanılabilirliği; ancak birçok araştırmacı tarafından sıklıkla M-199 tercih edildiği görülmektedir.⁽²⁷⁻³⁷⁾

Endotel hücre kültüründe en sık kullanılan serum FBS'dir⁽³⁸⁻⁴³⁾. Bazı araştırmacılar yenidoğan sığır serumunu (44), bazıları ise FBS ve yenidoğan sığır serumunu %50 oranlarında karıştırarak kullandıkları görülmüştür. (Morgan DML, 1996). Ancak tüm bu araştırmacıların yaptıkları kültürde hücrelerin konfluent olma ve hücre canlılık sonuçları benzerdir.

Hemen tüm kültürlerde kullanıldığı gibi HUVEC'te de antibiyotik olarak penisilin-streptomisin, tampon çözelti olarak sodyum bikarbonat kullanılır^(32,45-48). Ayrıca, endotel hücrelerinin çoğalmasını artıran ve metabolizmasını sağlayan endotel hücre büyüme faktörü (endothelial cell growth factor; ECGF) veya bu faktörü içeren endotel hücre büyüme ilavesi (endothelial cell growth supplement; ECGS) kullanımı çok sıktır^(34,35,49). Endotel hücrelerinin daha kısa



Resim 4. Kültürdeki endotel hücrelerinin sitoplazmasındaki vakuoller (ok) (HE, x100) (Dr. Yusufhan Yazır'ın doktora tezinden alınmıştır).

zamanda çoğalmalarını sağlar ve in vivo koşullardaki fonksiyonlarının devamına yardım eder.

Endotel hücrelerinin kültür kaplarına tutunmalarını kolaylaştırmak amacıyla bu kapların ve deneyde kullanılan lamellerin yüzeylerinin bazı maddelerle kaplanması gerekir. Bu amaçla kollajen, endotel hücre yapışma faktörü (endothelial cell attachment factor; ECAF), jelatin veya fibronektin kullanılabilir^(29,31,33-35,38,39,50). Tümü aşağı yukarı benzer etkilerdir. Ancak endotel hücrelerinin in vivo olarak bağlandığı madde olduğu için seçim olarak fibronektin tercih edilebilir.

Yukarıdaki kültür koşulları uygulanarak yapılan HUVEC kültüründe endotel hücreleri 6-8 günde konfluent olmakta ve %94'lerin üzerinde bir canlılık oranıyla sağlıklı bir endotel hücre kültürü elde edilebilmektedir⁽²⁶⁾.

ENDOTEL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ÖNEMLİ NOKTALAR

Kültürde pasajlama sırasında endotel hücrelerini yapıştırdıkları yüzeyden kaldırmak için kullanılan tripsin-EDTA solüsyonunun uygulama süresini beş dakikanın mümkün olduğunca altında tutmak bu hücrelerin canlılık oranlarını artırır. Sonuçta çalışmaların güvenilirliği artar⁽²⁶⁾.

Hücreler dondurulma ve çözülme aşamalarında, kullanılan dondurma solüsyonunda bulunan dimetil sülfoksit ile endotel hücreleri mümkün olduğunca kısa süre temas etmelidir. Bu süre ne kadar kısa olursa hücrelerin sağlıklı olarak yaşamaları o kadar yüksek olur⁽²⁰⁾. Kültürdeki hücreler enfekte olursa endotel hücrelerinin çoğalma hızları hemen azalarak ölüm oranları artar⁽²⁶⁾.

Endotel hücrelerine verilen medyum içindeki FBS konsantrasyonu %20'den daha az, özellikle %10'ların altına indiğinde, 12-24 saat içinde sitoplazmik vakuollerinde artışla birlikte hücrelerin kısmen yapıştırdıkları yerden ve birbirlerinden ayrılmaya başladıkları görülür. Bu durum devam ettiğinde bağlandıkları yerden tamamen ayrılarak yüzeye çıkıp öldükleri ve canlılık oranlarının hızla azaldığı görülür⁽²⁶⁾.

Sonuç olarak; vasküler patolojilerde önemli rollere sahip olan ve vücudun her yerine dağılan damarları içten döşeyen endotel hücreleri, önemli fonksiyonlara sahiptir. Antitrombotik yüzey oluşturmaları, seçici bariyer görevi yapmaları, nitrik oksit, endotelin-1 ve adezyon molekülleri gibi önemli maddeler sentezlemeleriyle vücutta olagelen fizyolojik ve patolojik olaylarda etkin rol almaktadır. Henüz bilinmeyen yönleriyle de diğer birçok vasküler olayda önemli rolleri olabileceği düşünüldüğünde, endotel hücreleriyle ilgili selektif kültür çalışmaları oldukça değerli olacaktır. Bunun için organizmadan uzaklaştırılarak kültür

ortamına alınıp, burada vücut şartlarına en yakın ortamlarda devamlılığını sağlaması ve üretilmesi gerekir. Ayrıca, kültür koşullarını sürekli olarak iyileştirme yönündeki tüm çabalar sonuçta en iyi araştırma sonuçlarını sağlar. Endotel hücreleriyle ilgili yapılacak yeni hücre kültür çalışmaları sayesinde, vasküler patolojilerin aydınlatılması ve daha yeni tedavilerin önünü açmak mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91:3527-61.
2. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology*. 10th ed. International Edition. Mc Graw-Hill, 2003:215-31.
3. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:73-91.
4. Sadler TW. *Medikal Embriyoloji. Başaklar C (editör). 7. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık, 1996:65-87, 175-220.*
5. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology*. 2nd ed. International Edition. WB Saunders Company, 2001:251-71.
6. Dejana E. Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J Clin Invest* 1996;98:1949-53.
7. Kumar S, West DC, Ager A. Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels. *Differentiation* 1987;36:57-70.
8. Levin EG, Osborn KG. The expression of endothelial cell tissue plasminogen activator in vivo: a function defined by vessel size and anatomic location. *J Cell Sci* 1997;11:139-48.
9. Morin O, Patry P, Lafleur L. Heterogeneity of endothelial cells of adult rat liver as resolved by sedimentation velocity and flow cytometry. *J Cell Physiol* 1984;119:327-34.
10. Zhu D, Cheng C, Pauli BU. Mediation of lung metastasis of murine melanoma by a lung-specific endothelial cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9568-72.
11. Milici AJ, Furie MB, Carley WW. The formation of fenestrations and channels by capillary endothelium in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:6181-5.
12. Meredith IT, Yeung AC, Weidinger FF, et al. Role of impaired endothelium-dependent vasodilation in ischemic manifestations of coronary artery disease. *Circulation* 1993;87(Suppl V):V56-66.
13. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. *Histology*. 4th ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 2003:96-111, 326-55.
14. Ganong WF. *Tıbbi Fizyoloji. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği Çevirisi*. 19. Baskı. İstanbul: Barış Kitabevi, 1999;12:627-42.
15. Epstein HF, Levin ER. Endothelins. *New Engl J Med* 1995;333:356-63.
16. Forstermann U, Mugge A, Alheid U, Haverich U, Frolich JC. Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ Res* 1988;62:185-90.
17. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG. Culture of human endothelial cells derived from umbilical cord veins: identification by morphologic criteria. *J Clin Invest* 1973;52:2745-56.
18. Jaffe EA. Culture and identification of large vessel endothelial cells. *Biology of Endothelial Cells*. Jaffe EA (ed). Martinus Nijhoff. Boston. 1984:1-13.

19. Can Z, Adanalı G, Yılmaz S. Doku kültürü. *Türkiye Tıp Dergisi* 1997;4:53-7.
20. Freshney RI. *Culture of animal cells*. 3rd Ed. USA. Chapter: 1, 7, 9. 1994:1-7, 71-103.
21. Gargett CE, Bucak K, Rogers PAW. Isolation, characterization long-term culture of human myometrial microvascular endothelial cells. *Hum Reprod* 2000;15:293-301.
22. Santos WLC, Rahman J, Klein N, Male DK. Control of lymphocyte adhesion to brain and aortic endothelium: ICAM-1, VCAM-1 and negative charge. *J Neuroimmunol* 1996;66:125-34.
23. Bhat S, Shim JS, Zhang F, Chong CR, Liu JO. Substituted oxines inhibit endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Org Biomol Chem* 2012. [Epub ahead of print].
24. Xing D, Li P, Gong K, Yang Z, Yu H, Hage FG, et al. *Endothelial Cells Overexpressing Interleukin-8 (IL8) Receptors Reduce Inflammatory and Neointimal Responses to Arterial Injury*. *Circulation*. 2012 Feb 23. [Epub ahead of print]
25. Di Pietro R, Mariggio MA, Guarnieri S, Sancilio S, Giardinelli A, Di Silvestre S, et al. 2005. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) regulates endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity and its localization within the human vein endothelial cells (HUVEC) in culture. *J Cell Biochem* 2006;97:782-94.
26. Yazır Y. İnsan umbilikal venlerinden elde edilen endotel hücre kültüründe, vasküler endotelial büyüme faktörünün, vasküler hücre adezyon molekülü-1 ve intersellüler adezyon molekülü-1 ekspresyonu üzerine etkilerinin incelenmesi. Kocaeli; KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, 2004.
27. Marconcini L, Marchio S, Morbidelli L, Cartocci E, Albini A, Ziche M, et al. C-fos-induced growth factor/VEGF-D induces angiogenesis in-vivo and in-vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9671-6.
28. Grooby W, Krishnan R, Russ GR. Characterization of ovine umbilical vein endothelial cells and their expression of cell adhesion molecules: comparative study with human endothelial cells. *Immunol Cell Biol* 1997;75:21-8.
29. Kotowicz K, Dixon GLJ, Klein MJ, Peters MJ, Callard RE. Biological function of CD40 on human endothelial cells: costimulation with CD40 ligand and interleukin-4 selectively induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 and P-selectin resulting in preferential adhesion of lymphocytes. *Immunology* 2000;100:441-8.
30. Gho YS, Kim PN, Li H, Elkin M, Klenman HK. Stimulation of tumor growth by human soluble ICAM-1. *Cancer Research* 2001;61:4253-7.
31. Boehme MWJ, Raeth U, Scherbaum WA, Galle PR, Stremmel W. Interaction of endothelial cells and neutrophils in vitro. *Clin Exp Immunol* 2000;119:250-4.
32. Grabner R, Till U, Heller R. Flow cytometric determination of E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 in formaldehyde-fixed endothelial cell monolayers. *Cytometry* 2000;40:238-44.
33. Miro X, Casacuberta JM, Gutierrez-Lopez MD, De Landazuri MO, Puigdomenech P. Phosphodiesterases 4D and 7A splice variants in the response of huvec cells to TNF- α . *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:415-21.
34. Zapolska-Downar D, Zapolski-Downar A, Markiewski M, Ciechanowicz A, Kaczmarczyk M, Naruszewicz M. Selective inhibition by α -tocopherol of vascular cell adhesion molecule-1 expression in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:609-15.
35. Faehling M, Koch ED, Raithel J, Trischler G, Waltenberger J. Vascular endothelial growth factor-A activates Ca²⁺-activated K⁺ channels in human endothelial cells in culture. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:337-46.
36. Yue X, Tomanek RJ. Effects of VEGF₁₆₅ and VEGF₁₂₁ on vasculogenesis and angiogenesis in cultured embryonic quail hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H2240-47.
37. Zhang X, Wang L, Jiang TY, Zhang HP, Dou Y, Zhao JH, et al. Effects of testosterone and 17- β -estradiol on TNF- α -induced E-selectin and VCAM-1 expression in endothelial cells analysis of the underlying receptor pathways. *Life Sciences* 2002;71:15-29.
38. Qi J, Kreutzer DL, Piela-Smith TH. Fibrin induction of ICAM-1 expression in human vascular endothelial cells. *J Immunol* 1997;158:1880-6.
39. Murakami S, Morioka T, Nakagawa Y, Suzuki Y, Arakawa M, Oite T. Expressions of adhesion molecules by cultured human glomerular endothelial cells in response to cytokines: comparison to HUVEC and human dermal microvascular endothelial cells. *Microvascular Research* 2001;62:383-91.
40. Gao Y, Zhou Q, Qu M, Yang L, Wang Y, Shi W. In vitro culture of human fetal corneal endothelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249:663-9.
41. Tille JC, Wood J, Mandriota SJ, Schnell C, Ferrari S, Mestan J, et al. VEGF receptor-2 antagonists inhibit VEGF and basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in-vivo and in-vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:1073-85.
42. Gao Y, Zhou Q, Qu M, Yang L, Wang Y, Shi W. In vitro culture of human fetal corneal endothelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249:663-9.
43. Zhang F, Yu W, Hargrove JL, et al. Inhibition of TNF- α induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium. *Atherosclerosis* 2002;161:381-6.
44. Lorenzon P, Vecile E, Nardon E, Ferrero E, Harlan JM, Tedesco F, et al. Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. *J Cell Biol* 1998;142:1381-91.
45. Santos WLC, Rahman J, Klein N, Male DK. Control of lymphocyte adhesion to brain and aortic endothelium: ICAM-1, VCAM-1 and negative charge. *J Neuroimmunol* 1996;66:125-34.
46. Simard M, Drolet R, Blomquist CH, Tremblay Y. Human type 2 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in umbilical vein and artery endothelial cells: differential inactivation of sex steroids according to the vessel type. *Endocrine* 2011;40:203-11.
47. Mustjoki S, Alitalo R, Elonen E, Carpen O, Gahmberg CG, Vaheri A. ICAM-1 in extravasation of normal mononuclear and leukaemia cells. *Br J Haematol* 2001;113:989-1000.
48. Morgan DML. *Human Cell Culture Protocols*. (Jones GE (ed). "Isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells" Chapter: 9. 1996: 101-10.
49. İvanov D, Philipova M, Tkachuk V, Erne P, Resink T. Cell adhesion molecule t-cadherin regulates vascular cell adhesion, phenotype and motility. *Exp Cell Res* 2004;293:207-18.
50. Bala K, Ambwani K, Gohil NK. Effect of different mitogens and serum concentration on HUVEC morphology and characteristics: implication on use of higher passage cells. *Tissue Cell* 2011;43:216-22.