

Anöstrus Süresince Sıçan Uterusunda Vasküler Endotel Büyüme Faktörü ve Reseptörleri ile Vasküler Endotel Büyüme İnhibitörünün Dağılımı

Mehmet Erdem AKBALIK¹, Berna GÜNEY SARUHAN¹, Uğur TOPALOĞLU¹,
Muzaffer Aydın KETANİ¹, Mehmet KILINÇ², Hakan SAĞSÖZ¹

¹Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 21280, Diyarbakır, Türkiye

²Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, 21280, Diyarbakır, Türkiye

Özet

Bu çalışmada vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve reseptörleri ile vasküler endotelial büyüme inhibitörünün (VEGI) fizyolojik rollerini daha iyi anlamak için, immünohistokimya kullanılarak anöstrustaki sıçan uterusunda bu faktörlerin hücrel lokalizasyonu araştırıldı. Çalışmanın materyalini 10 adet dişi sıçan oluşturdu. Uterustan elde edilen doku örnekleri rutin histolojik işlemler için % 10'luk formaldehitte tespit edildi. Anöstrus süresince sıçan uterusunda luminal ve bez epitel hücreleri, stromal ve düz kas hücreleri ile damarların endotel ve düz kas hücrelerinin VEGF ve reseptörleri ile pozitif immunreaksiyon gösterdiği belirlendi. Bununla beraber luminal ve bez epitel hücrelerinin flk1 için, aynı şekilde stromal hücrelerin de flt4 için immunoreaktivite göstermediği izlendi. Sonuç olarak VEGF ve reseptörleri ile VEGI'nın olası bir genital siklus hazırlığında fonksiyonel rollerinin olabileceği belirlendi.

Anahtar Sözcükler: Anöstrus, Sıçan, Uterus, VEGF, VEGI

The Distribution of Vascular Endothelial Growth Factor and its Receptors with Vascular Endothelial Growth Inhibitor in Rat Uterus during Anestrus

Summary

In this study, to gain a better understanding of the physiological roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors with vascular endothelial growth inhibitor (VEGI), were investigated cellular localization of these factors in the rat uterus during anestrus by immunohistochemistry. For this study, 10 female rats were used. Tissue samples from uterus were fixed in 10% formaldehyde for routine histological processing. Positive immunoreaction for VEGF and its receptors with VEGI was determined in the luminal and gland epithelial cells, stromal, smooth muscle cells and endothelial and smooth muscle cells of blood vessels in the rat uterus during anestrus. However, luminal and gland epithelial cells did no exhibit flk1 immunoreactivity and also stromal cells for flt4. As a result, VEGF and receptors with VEGI might be a functional roles in the preparation for a possible reproductive cycle.

Key words: Anestrus, Rat, Uterus, VEGF, VEGI

Giriş

Dişilerde seksüel siklusun başlaması ile bağ dokuda, kan damarları ve uterus bezlerinin genişlemesini içeren birtakım periyodik değişiklikler oluşur (1). Bu değişiklikler, uterusun epitel hücreleri ve stromasından salgılanan (epidermal büyüme faktörü-EGF, vasküler endotel büyüme faktörü-VEGF v.s.) lokal büyüme faktörleri arasındaki kompleks etkileşim ve steroid hormonlar (östrojen, progesteron v.s.) tarafından düzenlenmektedir (2).

Anjiyogenezis, genital siklus sırasında endometriyumda çoğalma ve yenilenmeyi sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda gebeliği desteklemek için implantasyon sırasında endometriumun gelişimi ve farklılaşması için de gereklidir (3). Anjiogenik moleküller içinde en önemlisi ve üzerinde en çok durulanı VEGF'dür. Başta VEGF-A (birçok makalede VEGF olarak isimlendirilen büyüme faktörü, aslında VEGF-A'yı tanımlamaktadır) olmak üzere VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, Plasental büyüme faktörü (PlGF) ve yılan zehiri VEGF'ü (VEGF-F) olmak üzere yedi üyeden oluştuğu bildirilmektedir (4). VEGF, aktivitesini üç reseptör ile gerçekleştirir. Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörleri VEGF reseptör-1 (VEGFR-1, flt1), VEGF reseptör-2 (VEGFR-2, flk1) ve VEGF reseptör-3 (VEGFR-3, flt4)'dür. Bunlardan VEGFR-1 ve R-2 endotel hücreleri üzerinde, VEGFR-3 ise lenf damarları üzerinde bulunur. VEGF reseptörlerinin aktivasyonu; fosfoinositol-3 kinaz, fosfolipaz-C ve ras GTPaz aktivatör proteinleri gibi bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinini fosforile ederek endotel hücrelerinin çoğalma, göç ve farklılaşmasına neden olur (2, 5).

VEGF ve iki reseptörü flt1 ve flk1'in endometriyumdan, desidual dokudan ve trofoblastlardan ekspresse olduğu insanlarda (6), koyunlarda (7) ve domuzlarda (8) gösterilmiştir. İlk olarak insan umbilikal ven endotel hücrelerinden identifiye edilen vasküler endotel büyüme inhibitörünün (VEGI) ise, erişkin dokularının çoğunda damarlaşmanın dengeli devamlılığı için fizyolojik bir role sahip olduğu vurgulanırken örneğin erişkin sığır aortik ve pulmoner arter endotel hücrelerinde büyümeyi sınırlandırdığı ve apoptoza neden olduğu bilinmektedir (9, 10).

Yapılan literatür taramalarında, anöstrustaki sıçan uterusunda VEGF ve reseptörleri (flt1, flk1 ve flt4) ile ilgili yeterli bilgiye rastlanılmaması, buna karşın VEGI'ne ilişkin herhangi bir bilgiye ulaşılamamış olması, bu çalışmanın planlanmasında etkili olmuştur. Bu çalışma, anöstrus dönemindeki sıçanların uterusunda VEGF ve reseptörleri ile VEGI'nün hücrel lokalizasyonlarını ve olası fizyolojik rollerini ortaya koymak, aynı zamanda konu ile ilgili literatüre katkı sağlamak amacıyla tasarlandı.

Materyal ve Metot

Deney Hayvanları

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu (DÜHADEK) tarafından onaylanmıştır (karar sayısı 2005-40).

Çalışmada, ortalama ağırlıkları 220-250 gr olan erişkin, 10 adet diş Sprague-Dawley cinsi sıçanlar kullanıldı. Deneye reproduktif fenomenlerden biri olan Lee-Boot (11) etkisine (birlikte barındırılan diş sıçan gruplarında anöstrus gözlenmesi) sahip hayvanlar seçildi. Sıçanlar Dicle Üniversitesi

Prof. Dr. Sabahattin PAYZIN Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi (DÜSAM) Müdürlüğü'nden temin edildi. Hayvanlar, çalışma süresince 21°C oda ısısında 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlıkta barındırılırken ad libitum olarak beslendiler.

Histolojik analiz

Hayvanlara, 60 mg/kg ketamin hidroklorür ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorit periton içi enjekte edilerek genel anestezi sağlandı ve uterusları dişeke edilerek dışarı alındı. Uterusun sağ ve sol kornularından küçük parçalar alınarak %10 nötral formalin solüsyonunda 24 saat fikse edildi. Fiksasyonu takiben dokular bir dizi metil benzoat, benzol ve kademeli alkol serilerinden geçirilip parafin içine gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan 5 mikrometre kalınlığında seri kesitler alındı. Bu kesitlerden birincisi histolojik incelemeler için normal lama diğerleri ise 3-aminopropyl-triethoxysilane (APES) ile kaplanmış adhesivli lamlara alındı. Normal lamlara alınan kesitler Crossman'ın üçlü boyaması ile boyandı ve uterusta anöstrusa bağlı histolojik değişiklikler belirlendi (12).

İmmunohistokimyasal boyama

Parafin bloklardan adhesivli lamlara 5 µm kalınlığındaki kesitlere, Zymed Histostain Plus Bulk Kit (code: 85-9043, Histostain Plus Bulk Kit, Zymed, South San Francisco, CA, USA) kullanılarak streptavidin-peroxidase immunohistokimyasal yöntemi uygulandı (13). Deparafinizasyon ve rehidrasyonu takiben kesitler, metanolde hazırlanmış % 3'lük H₂O₂'de 20 dakika süreyle tutularak endoperoksidan aktivite engellendi ve preparatlar 5 dk 0.01M phosphate buffer saline (PBS)'de iki kez yıkandı. Yıkamadan sonra, antijen retrieval işlemi için sitrat tamponu (0.01

M, pH 6.0) hazırlanarak 30 dk süreyle 95 °C'de kaynatıldı ve soğumaya bırakıldı. Kesitler spesifik olmayan boyanmayı önlemek üzere protein blocking çözeltisi (Ultra V Block) ile oda ısısında 15 dk. inkübasyona bırakıldı. Hemen ardından kesitler, 4 °C'de 1:200 seyreltme ve 20 saat boyunca VEGF'ne karşı fare monoklonal antikor (Santa Cruz Biotechnology, sc-53462), flt-1'e karşı tavşan poliklonal antikor (Santa Cruz Biotechnology, sc-316), flk-1'e karşı fare monoklonal antikor (Santa Cruz Biotechnology, sc-6251), flt-4'e karşı tavşan poliklonal antikor (Santa Cruz Biotechnology, sc-321), VEGI'ne karşı tavşan poliklonal antikor (Santa Cruz Biotechnology, sc-32945) ile inkübe edildi. İnkübasyon periyodunun bitiminde 5 dk boyunca 0.01M PBS'de dört kez yıkanan preparatlar, oda ısısında 20 dk boyunca biotinlenmiş sekonder antikor ile inkübe edildi ve yine 5 dk boyunca 0.01M PBS'de dört kez yıkandı. Daha sonra preparatlar, 20 dk. süre ile streptavidin peroksidaz solüsyonuna etkin bırakıldı ve son kez 5 dk boyunca 0.01M PBS'de dört kez yıkandı. Reaksiyonu görselleştirmek için AEC kromojen solüsyonu kullanılan kesitler üzerine aköz yapıştırıcı (Aqueous mounting medium) damlatılıp lamelle kapatıldı ve zemin boyaması için Gill hematoksilende 2-3 dk. tutuldu. Boyanmaların sağlamlığında negatif kontroller kullanıldı ve bu kontrollerde primer antikor yerine PBS kullanılarak inkübasyon sağlandı. Boyamalar sonrası preparatlar Nikon-Eclipse 400 dijital fotoğraf makinesi ataçmanlı araştırma mikroskopunda incelenerek fotoğraflandı.

İmmünohistokimyasal boyanma sonuçlarının değerlendirilmesi

İmmünohistokimyasal boyanma, yoğunluk skoru kullanılarak yarı kantitatif olarak değerlendirildi (14). Yoğunluk skorunda, hücrelerdeki pozitif boyanmalar (-) negatif, (+)

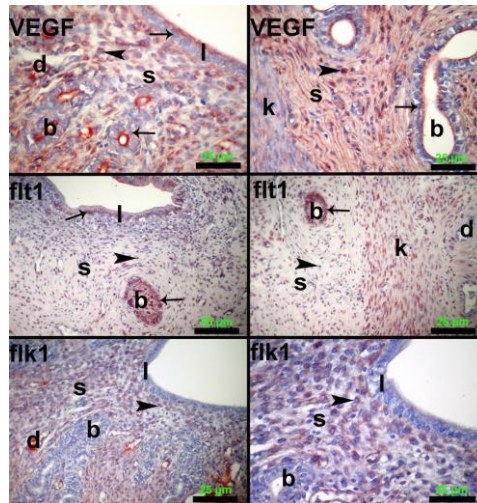
Bulgular

Anöstrus süresince uterusda luminal ve bez epitel hücreleri, stromal ve düz kas hücreleri ile kan damarlarının endotel ve düz kas hücrelerinde VEGF ve reseptörleri (flt1, flk1 ve flt4) için pozitif sitoplazmik boyanmalar elde edildi (Tablo 1).

Tablo 1. Anöstrustaki sıçan uterusunda vasküler endotel büyüme faktörü ve reseptörleri ile vasküler endotel büyüme inhibitörünün yarı kantitatif skoru.

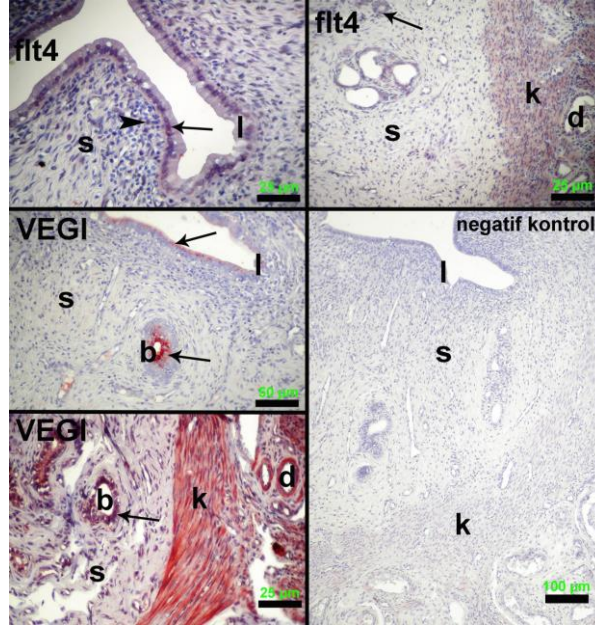
Uterus katmanları	VEGF	Flt1	Flk1	Flt4	VEGI
Luminal epitel	++/+++	++/+++	-	+	+/+++
Bez epiteli	++/+++	++/+++	-	+	+/+++
Stroma	++/+++	++/+++	+++	+	-
Kas doku	+/+++	++/+++	+	+++	+++

Uterusun luminal ve bez epitel hücreleri ile stromal hücrelerinin düz kas hücrelerine göre VEGF için daha güçlü bir sitoplazmik immunoreaktivite gösterdiği dikkati çekti. Bunun yanında luminal ve bez epitel hücrelerinde VEGF immunoreaktivitesinin apikal kısımda lokalize olduğu saptandı. Flt1'in luminal ve bez epitel hücreleri, stromal ve düz kas hücreleri ile damar endotel ve düz kas hücrelerinde reaksiyon yoğunluğunun orta şiddetten güçlü şiddete doğru farklı ve özellikle de nükleer olduğu görüldü. Luminal ve bez epitel hücrelerinde farklı bir bulgu olarak da flk1 immunoreaktivitesi gözlenmezken stromal hücrelerde güçlü sitoplazmik boyanmanın oluşu dikkat çekti ve damar endotelinde de benzer şekilde flk1 ile pozitif boyanma gözlendi (Şekil 1).



Şekil 1. Anöstrus süresince sıçan uterusunda VEGF, flt1 ve flk'in lokalizasyonu, AEC kromojen. l, luminal epitel; s, stroma; b, bez epiteli; d, kan damarı; k, düz kas hücreleri; ok, pozitif luminal ve bez epitel hücreleri; okbaşı, pozitif stromal hücreler.

Flt4, luminal ve bez epitel hücreleri ile stromal hücrelerde çok zayıf bir immunoreaktivite gösterirken pozitif immunreaksiyonun daha çok düz kas hücrelerinde yoğunlaştığı ve reaksiyon şiddetinin güçlü olduğu dikkati çekti. VEGI için pozitif immunoreaktivite luminal epitel ile bez epitel hücrelerinde apikal sitoplazmada iken düz kas hücrelerinde güçlü sitoplazmik boyanmanın olduğu belirlendi. Buna karşın stromal hücrelerde immunoreaktivitenin bulunmadığı dikkati çekti (Şekil 2).



Şekil 2. Anöstrus süresince sıçan uterusunda flt4 ve VEGI'nin lokalizasyonu, AEC kromojen. l, luminal epitel; s, stroma; b, bez epiteli; d, kan damarı; k, düz kas hücreleri; ok, pozitif luminal ve bez epitel hücresi; okbaşı, pozitif stromal hücreler.

Tartışma ve Sonuç

Erişkin memelilerde uterustaki anjiyogenezis'in, siklusta endometriumun yenilenmesini, embriyo gelişimi ve implantasyon için kanlanmayı artırarak gebeliğin başarılı bir şekilde devam etmesini sağladığı bildirilmiştir (15). Dişi genital kanalındaki fonksiyonları sebebiyle VEGF ve reseptörleri (flt1, flk1, flt4) araştırmalarda öncelik kazanmıştır.

İnsan (6), domuz (8), sıçan (16), rhesus maymunları (17, 18) ve köpekte (19) yapılan çalışmalara benzer olarak sunulan çalışmada da sıçan uterusunda anöstrus süresince luminal ve

bez epitel hücreleri, stromal ve düz kas hücreleri ile damarların endotel ve düz kas hücrelerinin VEGF ve reseptörleri ile pozitif immunreaksiyon gösterdiği belirlendi.

Kaczmarek ve ark. (8) domuz uterusunda VEGF'nin stromal hücreler ve damarlarda reaksiyon yoğunluğunun zayıf, luminal ve bez epitel hücrelerinde ise luteal faz süresince güçlü olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca Yi ve ark. (20) VEGF'nin östrustaki hamsterlerin uterus epitel hücrelerinde pozitif reaksiyona, buna karşın stromal hücrelerde negatif reaksiyona sahip olduğunu, Winthera ve

Dantzer (21) ise minklerde sadece bez epitel hücrelerinin pozitif reaksiyon verdiğini ortaya koymuşlardır. Bununla beraber Wei ve ark. (18) rhesus maymunlarında menstrual siklus süresince VEGF boyanmasının luminal ve bez epitel hücrelerinde, bazı immunosit benzeri hücrelerde, damarların endotel ve düz kas hücrelerinde immunreaksiyon gösterdiğini belirlemişlerdir. Bunun yanında düz kas hücrelerinde de zayıf bir VEGF reaksiyonu belirlemiş ve bunun da siklus süresince değişken olmadığını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada da maymunlardaki bulgulara benzer şekilde VEGF immunpozitif luminal ve bez epitel hücrelerinin reaksiyon yoğunluklarının düz kas hücrelerinden daha yüksek olduğu ortaya konmuştur. Bu bilgiler ışığında VEGF'nin uterus epitel hücrelerindeki salgı aktivitesi üzerinde rolünün olabileceği, olası bir östrus siklusu ile beraber gebelik için uygun ortamın hazırlanmasına aracılık edebileceği, aynı zamanda VEGF'nin damar endotel ve düz kas hücrelerinde çoğalma ve göçü uyararak olası fizyolojik değişimleri tetikleyebileceği düşünülmüştür. Bununla beraber sunulan çalışmada luminal ve bez epitel hücrelerinde gözlenen boyanmanın apikal kısma kaymış olmasının da, hücrenin davranışı ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Çeşitli türler üzerinde yapılan araştırmalar uterus flt1, flk1 ve flt4 pozitif boyanan hücrelerin sayı ve boyanma yoğunluklarının hayvan türlerine ve seksüel siklus fazlarına göre değişim gösterdiğini ortaya koymuştur (6, 8, 18, 20, 21). Yapılan bu çalışmada sıçan uterusunda pozitif boyanan hücrelerin boyanma yoğunluklarının uterus katmanlarına göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca köpeklerde (19)

bildirildiği gibi sıçanlarda da flt1 için luminal ve bez epitel hücreleri, stromal ve düz kas hücrelerinde boyanmanın olduğu saptanmıştır. Bunun yanında boyanmanın özellikle hücrenin çekirdeğinde gözlenmesi, fizyolojik faaliyetlerin bir belirtisi olarak çekirdek-sitoplazma etkileşiminin iyi olduğunu düşündürmektedir. Bununla beraber bazı çalışmalarda (21) bildirilen aksine, sıçan uterusunda flk1 pozitif stromal hücrelerinin boyanma yoğunluğunun anöstrus süresince güçlü yoğunlukta olduğu görülmüştür. Bu durum, flk1'in stromal hücreler üzerinde fonksiyonel bir rolünün olduğu, aynı zamanda epitel hücrelerinde reaksiyonun oluşmamasında sıçanların inaktif dönemde olması sebebiyle fizyolojik faaliyetin gelişmediği şeklinde yorumlanabilir. Bunlara ek olarak sunulan çalışmada sıçan uterusunda flt4 immunpozitif düz kas hücrelerinin boyanma yoğunluğunun uterusun diğer hücre katmanlarından daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durumda, flt4'ün myometriumdaki aktiviteye güçlü katkı sağladığı düşünülmektedir. Tüm bulgular ışığında her üç reseptörün nisbeten VEGF ile benzerlik göstermesi sinerjik etkiye sahip olduklarını ve olası bir genital siklus hazırlığında ise fonksiyonel rollerinin olabileceğini ortaya koymaktadır. Bununla beraber değişen yoğunluklardaki flt1, flk1 ve flt4 immunoreaktivitelerinin özellikle damar endotel ve düz kas hücrelerinde gözlenmesi, çoğalma ve göçün uyarıldığını ve böylece bu faktörlerin damarlarda fonksiyonel değişikliklere neden olduğunu düşündürmektedir.

Yapılan literatür taramalarında uterus VEGF'nin etkilerine ilişkin çok az sayıda bilgiye rastlanmış olup bu çalışma anöstrustaki

sıçanların uterusunda VEGI'nin lokalizasyonuna ilişkin ilk çalışmadır. Daha önce inek (2) ve köpek (19) uterusunda yapılan çalışmalarda bildirildiği gibi bu çalışmada da epitel, düz kas hücreleri ile orta ve büyük çaplı kan damarlarının endotel ve düz kas hücrelerinde VEGI pozitif sitoplazmik reaksiyonlar dikkati çekti. VEGI immunreaksiyonunun epitel hücreleri ile kan damarlarında gözlenmesi, VEGI'nin uterusu olası bir patolojik oluşumun engellenmesi ve patolojik anjiogenesisin baskılanmasında rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Bununla beraber VEGI immünoreaktivitesinin düz kas hücrelerinde yoğunlaştığı dikkat çekerken bu durumun, VEGI'nin düz kas hücre çoğalması ve farklılaşmasının baskılanmasında fizyolojik rolünün olabileceğini akla getirmiştir.

Sonuç olarak, anöstrustaki sıçan uterusunda VEGF ve reseptörleri ile VEGI ekspresyonunun hücre tiplerine göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bağlamda VEGF ve reseptörlerinin sinerjik etkiye sahip oldukları ve olası bir genital siklus hazırlığında ise fonksiyonel rollerinin olabileceği söylenebilir. Sıçan uterusunda VEGI immünoreaktivitesinin ise uterusu olası bir patolojik oluşumun engellenmesi ve patolojik anjiogenesisin baskılanmasında rol oynayabileceği sonucuna varılabilir. Ancak, anöstrustaki sıçanların uterusunda çalışılan bu faktörlerin kesin rollerinin aydınlatılması için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynaklar

1. Karaca T, Yörük M, Uslu S. (2007). Distribution and Quantitative Patterns of Mast Cells in Ovary and Uterus of Rat. Arch. Med. Vet. 39: 135-139.
2. Sağsöz H, Saruhan BG. (2011). The Expression of Vascular Endothelial Growth Factor And its Receptors (Flt1/Fms, Flk1/KDR, Flt4) and Vascular Endothelial Growth Inhibitor in the Bovine Uterus During the Sexual Cycle and Their Correlation with Serum Sex Steroids. Theriogenology 75: 1720-1734.
3. Pavelock K, Braas KM, Ouafik L, Osol G, May V. (2001). Differential Expression and Regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptors Neuropilin-1 and Neuropilin-2 in Rat Uterus. Endocrinology 142: 613-622.
4. Yazır Y. (2007). Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (Vegf): Reseptörleri ve Fonksiyonları. C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 29: 128-136.
5. Nishimura S, Maeno N, Matsuo K, Fischer MB, Steiner GE, Hollemann D, Gedlicka C, Saaristo A, Burian M. (2002). Human Lactiferous Mammary Gland Cells Produce Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Express the VEGF Receptors, Flt-1 and KDR/Flk-1. Cytokine 18: 191-198.
6. Sugino N, Kashida S, Karube-Harada A, Takiguchi S, Kato H. (2002). Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its Receptors in Human Endometrium Throughout the Menstrual Cycle and in Early Pregnancy. Reproduction 123: 379-387.
7. Cheung CY, Singh M, Ebaugh MJ, Brace RA. (1995). Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression in Ovine Placenta and Fetal Membranes. Am J Obstets Gynec 173: 753-759.
8. Kaczmarek MM, Waclawik A, Blitek A, Kowalczyk AE, Schams D, Ziecik AJ. (2008). Expression of the Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor System in the Porcine Endometrium Throughout the Estrous Cycle and Early Pregnancy. Mol Reprod Dev 75: 362-372.

9. Xiao Q, Hsu CY, Chen H, Ma X, Xu J, Lee JM. (2005). Characterization of Cis-Regulatory Elements of the Vascular Endothelial Growth Inhibitor Gene Promoter. *Biochem J* 388: 913-992.
10. Metheny-Barlowa LJ, Lib LY. (2006). Vascular Endothelial Growth Inhibitor (VEGF), an Endogenous Negative Regulator of Angiogenesis. *Ophthalmology* 21: 49-58.
11. Sharp PE, LaRegina MC. (1998). The Laboratory Rat. s. 15-19. CRC Press, New York.
12. Westwood FR. (2008). The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *Toxicologic Pathology* 36: 375-384.
13. Akbalık ME, Sağsöz H, Erdoğan S. (2015). Osteopontin Expression in the Intestine of Chukar Partridge (*Alectoris chukar*, Gray, 1830). *Animal Biology* 65: 287-298.
14. Akbalık ME, Ketani MA. (2013). Expression of Epidermal Growth Factor Receptors and Epidermal Growth Factor, Amphiregulin and Neuregulin in Bovine Uteroplacental Tissues during Gestation. *Placenta* 34: 1232-1242.
15. Lopes FL, Desmarais J, Gevry NY, Ledoux S, Murphy BD. (2003). Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Isoforms and Receptors Flt-1 and KDR during the Peri-Implantation Period in the Mink, *Mustela vison*. *Biol Reprod* 68: 1926-1933.
16. Cullinan-Bove K, Koos RD. (1993). Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor Expression in the Rat Uterus: Rapid Stimulation by Estrogen Correlates with Estrogen-Induced Increases in Uterine Capillary Permeability and Growth. *Endocrinology* 133: 829-837.
17. Wang H, Li Q, Lin H, Yu X, Qian D, Dai J, Duan E, Zhu C. (2003). Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and its Receptors in the Rhesus Monkey (*Macaca Mulatta*) Endometrium and Placenta during Early Pregnancy. *Mol Reprod Dev* 65: 123-131.
18. Wei P, Chen XL, Song XX, Han CS, Liu YX. (2004). VEGF, bFGF, and Their Receptors in the Endometrium of Rhesus Monkey during Menstrual Cycle and Early Pregnancy. *Mol Reprod Dev* 68: 456-462.
19. Sağsöz H, Liman N, Küçükbaşlan I, Saruhan BG. (2013). Immunolocalization of Vascular Endothelial Growth Factor, its Receptors (Flt1/Fms, Flk1/KDR, Flt4) and Vascular Endothelial Growth Inhibitor in the Bitch Uterus during the Sexual Cycle. *Anim Reprod Sci.* 140: 241-254.
20. Yi XJ, Jiang HY, Lee KK, O WS, Tang PL, Chow PH. (1999). Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its Receptors during Embryonic Implantation in the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). *Cell Tissue Res* 296: 339-349.
21. Winther H, Dantzer V. (2001). Co-Localization of Vascular Endothelial Growth Factor and its Two Receptors Flt-1 and KDR in the Mink Placenta. *Placenta* 22: 457-465.

Yazışma Adresi: Yrd. Doç. Dr. M. Erdem

AKBALIK

Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,
21280, Diyarbakır, Türkiye

E-posta: eakbalik@dicle.edu.tr

Tel: 0412-2488020