

Lokalizacja i ekspresja VEGF-A i jego receptorów: VEGFR-1 i VEGFR-2 w naczyniach chłonnych VSP więzadła szerokiego macicy świni

ANNA POSTEK, MARCIN CHRUSCIEL, ANETA ANDRONOWSKA

Zakład Histofizjologii Rozrodu Oddziału Endokrynologii i Patofizjologii Rozrodu
Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn

Postek A., Chruściel M., Andronowska A.

Expression of VEGF-A and its two receptors: VEGFR-1 and VEGFR-2 in the lymphatic endothelial cells of VSP in the porcine uterine broad ligament

Summary

The purpose of the present study was to determine the immunoreactivity of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors: VEGFR-1 (flt-1, fms-like tyrosine kinase) and VEGFR-2 (flk-1, fetal liver kinase) on the endothelial cells of the lymphatic vessels in the area of the vascular subovarian plexus (VSP) of the broad ligament during different phases of the estrous cycle in pigs. The authors also investigated the expression and correlation between investigated factors and phases of the estrous cycle. The highest immunoreactivity for VEGF-A was observed in the lymphatic vessels of VSP at the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. VEGFR-1 displayed the same pattern of immunostaining intensity as VEGF-A and VEGFR-2 revealed the highest immunoreactivity in the early luteal and late luteal phases of the estrous cycle. Additionally, VEGF-A, VEGFR-1 and VEGFR-2 expression was assessed by semi-quantitative Western Blot analysis, which revealed significantly higher levels of VEGF-A and VEGFR-2 proteins during the early-luteal and the follicular phase of the estrous cycle ($P \leq 0.001$) and a very weak expression of VEGFR-1 during the whole estrous cycle. All factors displayed phase-related differences in the immunostaining intensity of the endothelial cells of the lymphatic vessels (VSP) in the porcine broad ligament of the uterus, suggesting that they are hormone-dependent during the estrous cycle in pigs.

Keywords: VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2, lymphatic vessels, VSP, estrous cycle, pig

Naczynia krwionośne i chłonne tworzą wspólnie system, którego główną rolą jest transport płynu śródmiąższowego, substancji metabolicznych, komórek, białek, absorpcja tłuszczu, a także zaangażowanie w procesy patologiczne. W odróżnieniu od zamkniętego systemu naczyń krwionośnych, naczynia chłonne formują system otwarty, zbierający bogatą w białka limfę z płynu tkankowego do krwi. Specyficzny układ naczyń krwionośnych i limfatycznych, przebiegających wzdłuż granicznego brzegu więzadła szerokiego macicy, tworzy naczyniowy splot podjajnikowy (vascular subovarian plexus, VSP). System leżących blisko siebie tętnic, żył i naczyń limfatycznych oraz sieci drobnych naczyń, jako ogniwo w łańcuchu czynnościowych i funkcjonalnych powiązań między jajnikiem, jajowodem i macicą, wskazał na ważną rolę naczyń limfatycznych w hormonalnej regulacji czynności tych narządów (5, 12, 17, 18). Szczególną aktywnością w naczyniach krwionośnych i limfatycznych charakteryzuje się śródbłonek. Komórki śródbłonka

wydzielają różne czynniki, które mają wpływ na kontrolę lokalnego krążenia krwi i limfy podczas cyklu płciowego u samic (2, 8, 9) i pozostają pod wpływem regulacji innych, jak hormony steroidowe prowadzące do zmian morfologicznych śródbłonka, a tym samym regulacji napięcia ścian naczyń, ciśnienia krwi i przepływu tkankowego (26).

Czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (VEGF) występujący w ok. 6 znanych postaciach (VEGF-A, -B, -C, -D, -E, -F), określany również czynnikiem przepuszczalności naczyń, odgrywa ogromną rolę w proliferacji komórek śródbłonka, kontroli angiogenezy, waskulogenezy, limfangiogenezy oraz specyficznej stymulacji przepuszczalności (10, 11). VEGF jest cytokiną o bardzo specyficznym działaniu. Produkowany przez liczne komórki, wpływa przede wszystkim na komórki śródbłonka. Występuje w postaci glikozylowanego homodimeru o masie cząsteczkowej 32-46 kDa. Ekspresja VEGF-A zachodzi poprzez izoformy powstające w wyniku „alternative splicing” – alterna-

tywnego składania genu. Znanych jest co najmniej pięć izoform składających się ze 121, 145, 165, 189 i 206 aminokwasów zwanych, odpowiednio, VEGF¹²¹⁻²⁰⁶ (13, 22, 23). Wszystkie te izoformy stymulują proces angiogenezy. Regulację ekspresji VEGF kontroluje kilka mechanizmów: hypoxia, wahania poziomu glukozy, różnicowanie komórkowe oraz hormony steroidowe, PDGF, EGF, TGF- β , onkogeny (27, 31). VEGF-A działa poprzez receptory kinazy tyrozynowej: VEGFR-1 o większym powinowactwie do VEGF-A oraz VEGFR-2 główny przekaźnik sygnału VEGF-A dla komórek śródbłonka (16, 32). Oba receptory zaangażowane są w różne biologiczne mechanizmy *in vivo*: VEGFR-1 uczestniczy w mitogenezie, zmianach morfologicznych oraz różnicowaniu komórek, natomiast VEGFR-2 w chemotaksji i migracji komórek (7, 14, 22).

Niewiele wiadomo na temat lokalizacji i ekspresji czynnika VEGF-A oraz jego receptorów w komórkach śródbłonka naczyń limfatycznych układu rozrodczego osobników dojrzałych. Wcześniejsze badania dowodziły występowania w naczyniach limfatycznych dwóch innych typów VEGF (VEGF-C i VEGF-D), które poprzez receptor VEGFR-3 wiążą się z limfatycznymi komórkami śródbłonka (LECs). Wydaje się zatem istotnym uzupełnienie i rozszerzenie wiedzy na temat związku między cyklem rujowym i sterującymi nim hormonami steroidowymi oraz czynnikiem VEGF-A w komórkach śródbłonka naczyń chłonnych w obrębie jednego ze specyficznych obszarów więzadła szerokiego macicy świni, jakim jest podjajnikowy splot naczyniowy (VSP). Celem pracy jest określenie lokalizacji i ekspresji VEGF-A i jego receptorów: VEGFR-1 i VEGFR-2 w naczyniach chłonnych VSP więzadła szerokiego macicy świni.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły tkanki z obszaru VSP więzadła szerokiego macicy pochodzące od świń cyklicznych. Tkanki pobierano bezpośrednio po uboju od zwierząt podzielonych według faz cyklu rujowego na 4 grupy: faza pęcherzykowa (dzień 17.-21., $n = 4$), faza wczesnolutealna (dzień 1.-5., $n = 4$), faza środkowolutealna (dzień 6.-12., $n = 4$) oraz faza późnolutealna (dzień 13.-16., $n = 4$). Fazę cyklu określano metodą makroskopowej obserwacji jajników i *endometrium* (19).

W celu lokalizacji poszczególnych czynników zastosowano metodę immunohistochemiczną, natomiast w celu potwierdzenia ich obecności i określenia ekspresji posłużono się metodą Western Blot. Do badań użyto pierwotnych poliklonalnych przeciwciał króliczych: anti-VEGF (A-20, sc-152), anti-VEGFR-1 (c-17, sc-316) oraz anti-VEGFR-2 (N-931, sc-505) (Santa Cruz Biotechnology) w odpowiednich rozcieńczeniach (1/200, 1/150, 1/100) oraz biotynylowanych przeciwciał wtórnych (biotynylated anti-rabbit IgG, Vector Laboratories; w rozcieńczeniu 1/400).

Do badań immunohistochemicznych pobrane tkanki utrwalano w 4% paraformaldehydzie na 0,1 M buforze fosforanowym (PB, pH = 7,4), krojono na kriostatowe skraw-

ki (10 μ m) przyklejone do odpowiednio przygotowanych szkiełek (chromogelatin/chrome-alum). Po inkubacji skrawków z odpowiednimi przeciwciałami pierwotnymi (noc, temp. pokojowa) oraz wtórnymi (1 godz., temp. pokojowa), skrawki płukano w PBS, a następnie inkubowano w kompleksie ABC (ABC Reagent, Vectastain Kit, Vector Laboratories). Ostateczny produkt reakcji uzyskiwano po zastosowaniu 3,3'-diaminobenzydyny (DAB, Sigma Aldrich, 0,3 mg/ml). Kontrolę negatywną uzyskano inkubując skrawki w NGS (normal goat serum) w rozcieńczeniu 1/10, zastępując nim pierwotne, wtórne lub obydwie przeciwciała. Całą procedurę zakończono odwodnieniem skrawków i zamknięciem ich DPX-em. Skrawki poddano obserwacji i analizie w mikroskopie optycznym (Nikon – Microphot FXA, Japan).

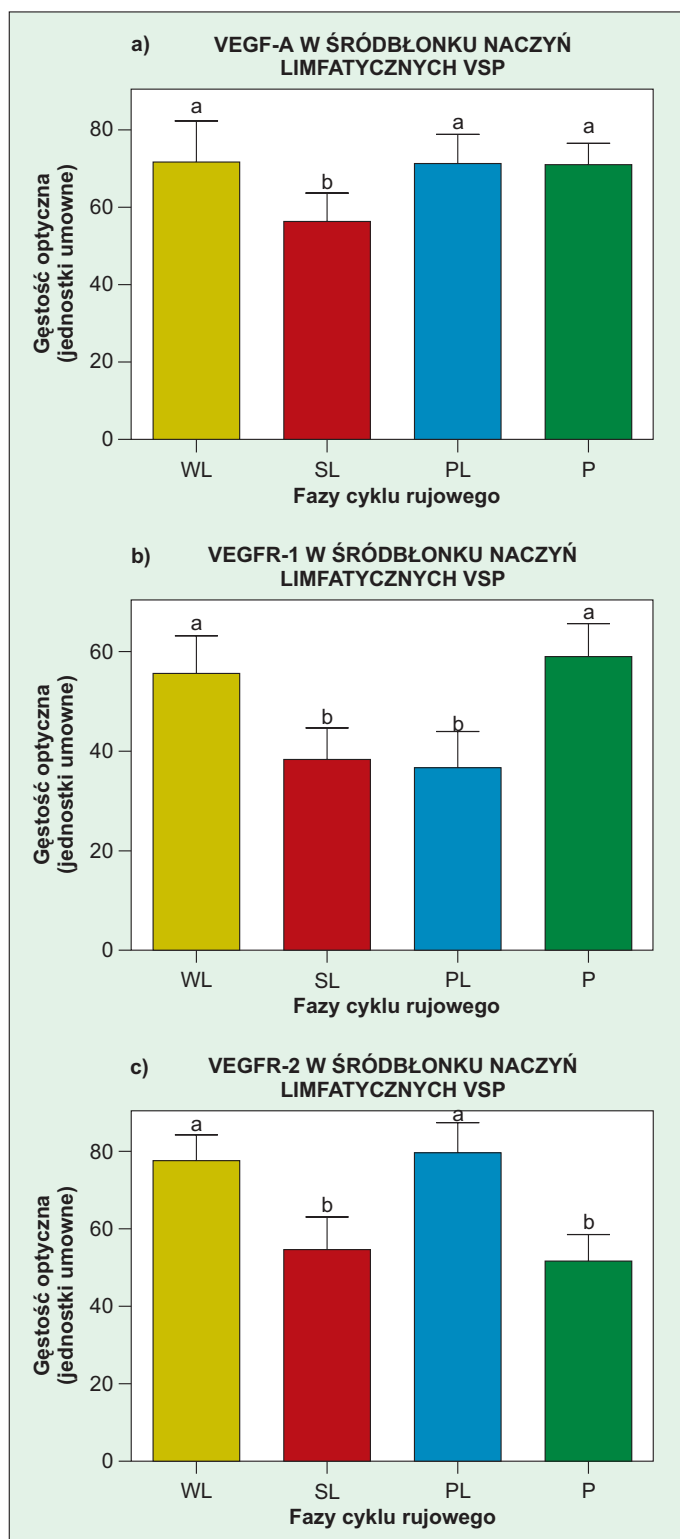
Ekspresję białka VEGF-A określano za pomocą analizy Western Blot. Zamrożone w ciekłym azocie tkanki homogenizowano w buforze homogenizacyjnym (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 z 1 μ M pepstatyny A, 5 μ g/ml leupeptyny, 5 μ g/ml aprotininy, 100 mM PMSF; Sigma P-8340) i pozostawiano na lodzie ok. 30 minut. Homogenaty poddawano wstępnemu wirowaniu przy 2500 g przez 10 min., a następnie zebrany supernatant poddano wirowaniu właściwemu przy 105 000 g przez 1 godz. w 8°C. Frakcję cytozolową i membranową przeznaczono do analizy ekspresji VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR-2. Poziom białka określono w próbkach metodą Bradforda (6). Jednakowe ilości (20 μ g) próbek gotowano w 95°C przez 4 min. z buforem obciążającym (1 : 1) (Sample buffer – Sigma, S-3401). Elektroforezę przeprowadzono na 15% (VEGF-A) i 6% (VEGFR-1, VEGFR-2) żelu rozdzielającym w 200 mA przez 3 godziny. Transfer białek na membranę nitrocelulozową przeprowadzono w 160 V przez 1,5 godziny. Do blokowania wiązań niespecyficznych zastosowano 5% odtłuszczone mleko w proszku w TBS-T (1,5 godz., temp. pokojowa). Membrany poddano inkubacji z przeciwciałami pierwotnymi (noc, temp. pokojowa). W celu sprawdzenia specyficzności przeciwciał wykonano próbę z blokowaniem przeciwciał pierwotnych (specific control peptide, sc-152P – 6 μ g; Santa Cruz Biotechnology).

Kolejnym etapem była inkubacja membran z przeciwciałem wtórnym (biotynylated anti-rabbit IgG, Vectastatin ABC Kit, Vector Laboratories) w rozcieńczeniu 1 : 15 000 (1,5 godz., temp. pokojowa). Białko wykrywano za pomocą metody wizualizacyjnej z zastosowaniem DAB.

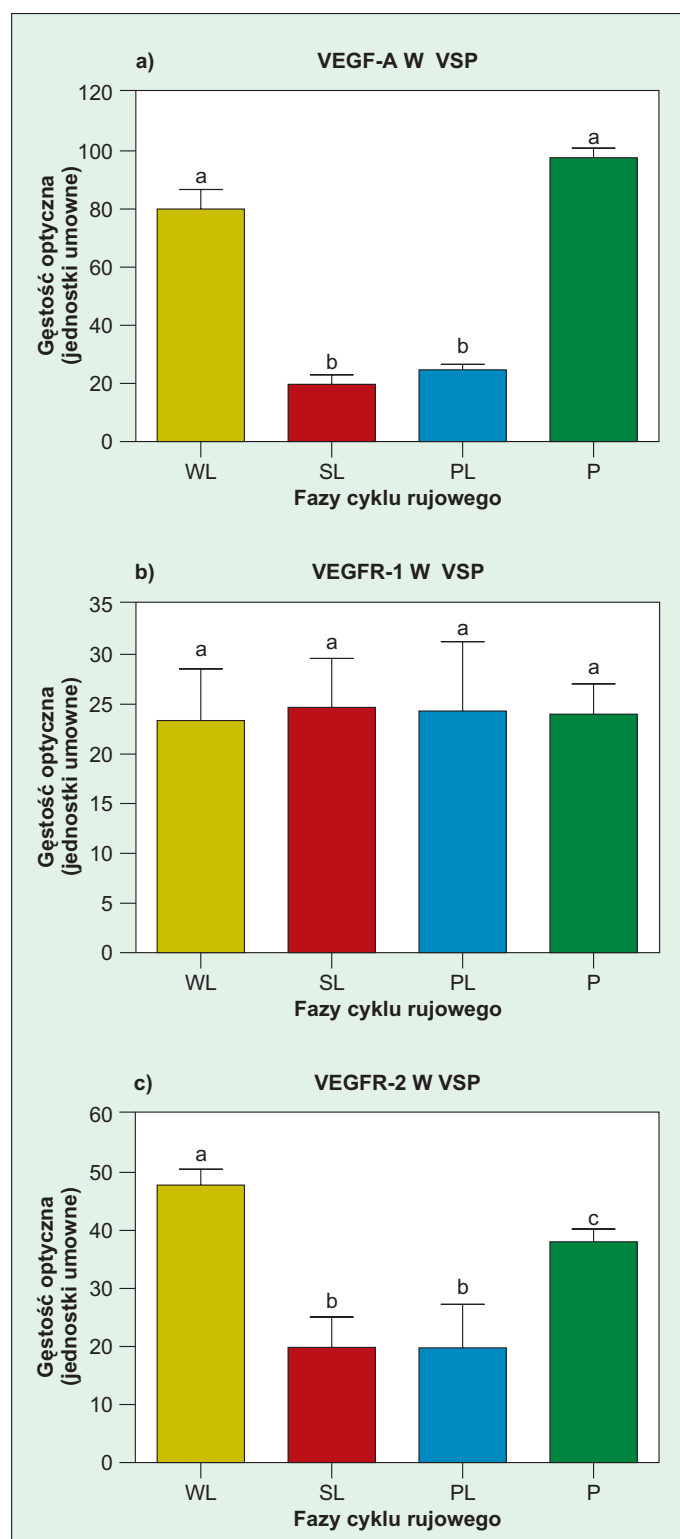
Intensywność reakcji immunohistochemicznej oraz Western Blot poddano analizie gęstości optycznej (PC_IMAGE, Froster Findlay Associates), na podstawie której uzyskano dane wykorzystane do analizy statystycznej. Dane przedstawiono jako średnią \pm SEM, a różnice statystyczne oszacowano testem Bonfferoniego (GraphPad Prism v.4.0, GraphPad Software). Istotność statystyczną przedstawiono za pomocą małych liter przy $p < 0,05$.

Wyniki i omówienie

Obserwacje w mikroskopie optycznym wykazały obecność VEGF, VEGFR-1 oraz VEGFR-2 w komórkach śródbłonka naczyń limfatycznych VSP więzadła szerokiego macicy świni podczas cyklu rujowe-



Ryc. 1 (a-c). Graficzne porównanie intensywności (gęstość optyczna) immunoreaktywności VEGF, VEGFR-1 i VEGFR-2 w śródłonku naczyń limfatycznych VSP w różnych fazach cyklu rujowego. Małe litery wskazują na istotne różnice pomiędzy poszczególnymi fazami cyklu rujowego ($p \leq 0,05$). Wartości zaprezentowano jako: średnia \pm SEM. WL – faza wczesnolutealna, SL – faza środkowolutealna, PL – faza późnolutealna, P – faza pęcherzykowa



Ryc. 2 (a-c). Graficzne porównanie poziomów ekspresji białka dla VEGF-A oraz receptorów VEGFR-1 i VEGFR-2 w VSP. Poziomy te podano jako wartości średnie (\pm SEM) gęstości optycznej, wyrażone jako jednostki umowne intensywności netto, otrzymane z 2-3 powtórzeń. Małe litery wskazują istotne różnice pomiędzy poszczególnymi fazami cyklu rujowego ($p \leq 0,05$). WL – faza wczesnolutealna, SL – faza środkowolutealna, PL – faza późnolutealna, P – faza pęcherzykowa

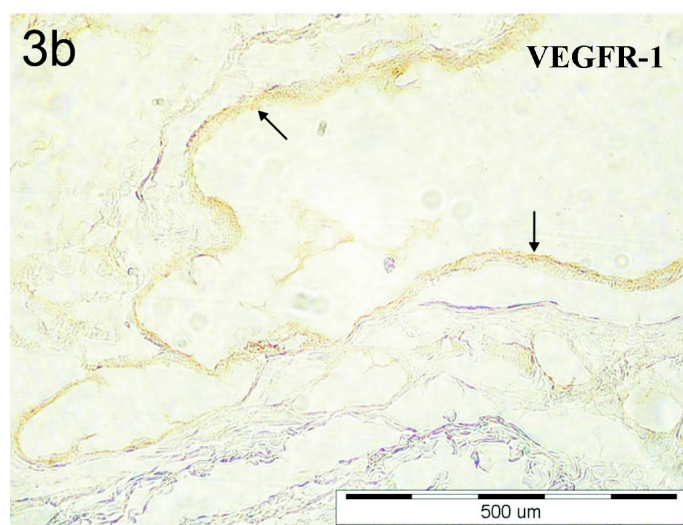
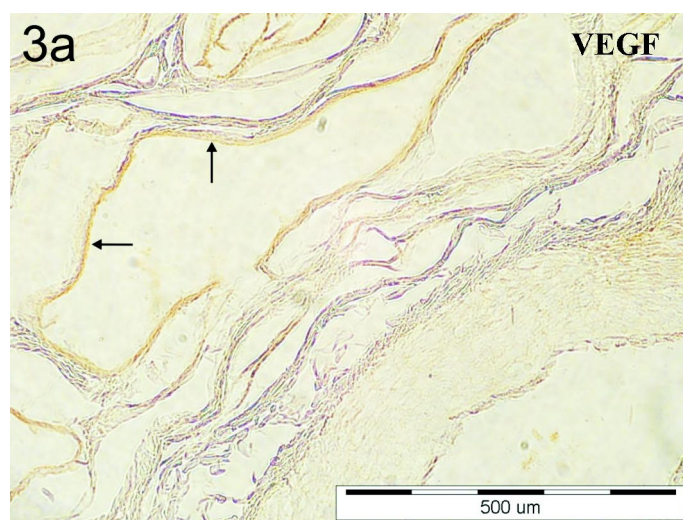
go (ryc. 1a-c). Analiza Western Blotting potwierdziła ekspresję badanych czynników w analizowanym obszarze więzadła szerokiego macicy świni (ryc. 2a-c).

Analiza wyników skrawków barwionych za pomocą metody immunohistochemicznej wykazała, że wysoka intensywność immunoreakcji VEGF-A w śród-

łonku naczyń limfatycznych VSP nie różniła się w poszczególnych fazach cyklu za wyjątkiem fazy środkowolutealnej, gdzie wystąpił wyraźny spadek obserwowanej reakcji ($p \leq 0,001$, ryc. 1a, ryc. 3a). Immunoreaktywność poszczególnych receptorów była bardziej zróżnicowana: VEGFR-1 wykazywał wyższą intensywność reakcji immunohistochemicznej we wczesnolutealnej i pęcherzykowej fazie cyklu rujowego, natomiast zdecydowanie słabszą w fazie: środkowo- i późnolutealnej ($p \leq 0,001$, ryc. 1b, ryc. 3b). VEGFR-2 wykazywał optycznie silną reakcję immunopozytywną w fazach wczesno- i późnolutealnej oraz wyraźny spadek immunozabarwienia w fazach środkowolutealnej i pęcherzykowej ($p \leq 0,001$, ryc. 1c, ryc. 3c).

Profil białka uzyskanego w trakcie analizy Western Blot różni się od wyników barwień immunohistochemicznych, jakkolwiek uzyskano potwierdzenie jego obecności. Różnica ta wynika z zastosowania do badań Western Blot tkanek, w skład których wchodziły zarówno naczynia krwionośne, jak i limfatyczne. W trakcie trwania cyklu rujowego najwyższą ekspresję białka VEGF-A obserwowano podczas faz: wczesnolutealnej oraz pęcherzykowej ($p < 0,001$), podczas gdy malała ona zdecydowanie w fazach środkowo- oraz późnolutealnej (ryc. 2a). Podobną tendencję wykazała analiza Western Blot badanego VEGFR-2 (ryc. 2b), natomiast analiza VEGFR-1 również przyniosła potwierdzenie obecności badanego białka, ale jest to reakcja zdecydowanie słabsza (ryc. 2c). Otrzymane wyniki sugerują, że zarówno VEGF-A, jak i badane receptory rozmieszczone są w komórkach śródbłonka naczyń limfatycznych. Nie znaleziono jednakże prac porównawczych wskazujących na obecność VEGF-A i VEGFR-1 w śródbłonku naczyń limfatycznych. Wcześniejsze badania dotyczyły głównie lokalizacji i ekspresji systemu ligand-receptor w śródbłonku naczyń krwionośnych macicy (3, 30) i jajnika (15), jako miejsca gwałtownej angiogenezy podczas normalnego cyklu płciowego oraz jajowodu (29). Dostępne prace traktujące o naczyniach limfatycznych ograniczają się do analizy czynników VEGF-C, VEGF-D oraz związanego z nimi receptora VEGFR-3. Silną ekspresję VEGFR-2 tłumaczyłaby zatem zdolność wiązania czynnika VEGF-A oraz VEGF-C i VEGF-D wykazujących regulatorowy wpływ na wzrost naczyń limfatycznych (10). VEGFR-2 jest przekaźnikiem silnego sygnału dla zapoczątkowania angiogenezy zależnej od VEGF-A, jak również limfangiogenezy kolektorowych naczyń limfatycznych oraz limfatycznych kapilar zależnej od VEGF-C i/lub VEGF-D (24, 28). Słabsza natomiast ekspresja VEGFR-1 wynika najprawdopodobniej z zawężenia obszaru regulacji tego receptora do naczyń krwionośnych i brak powinowactwa do typów VEGF-C i VEGF-D inicjujących limfangiogenezę.

Z dostępnych źródeł piśmiennictwa wynika, że są to pierwsze badania dotyczące zmiennej ekspresji



Ryc. 3 (a-c). Wybrane zdjęcia prezentujące immunolokalizację VEGF, VEGFR-1 i VEGFR-2 w komórkach śródbłonka naczyń limfatycznych (strzałki) VSP podczas cyklu rujowego (najsilniejsze reakcje). 3a – faza wczesnolutealna, 3b – faza pęcherzykowa, 3c – faza wczesnolutealna

VEGF-A i jego dwóch receptorów w śródbłonku naczyń limfatycznych w obszarze VSP w czasie trwania cyklu płciowego. Zainteresowanie to wynika również z dostępnych danych na temat zachodzącego w obsza-

rze splotu podjajnikowego lokalnie docelowego i zwrotnego przenikania hormonów, które umożliwiające jest poprzez specyficzne przystosowania morfologiczne – współdziałanie sieci żyłno-żylną okrywającej tętnicę jajnikową oraz pasm przedkolektorowych naczyń chłonnych (26). W wielu badaniach udowodniono wpływ hormonów steroidowych na ukrwienie narządów rozrodczych poprzez m.in. syntezę działających lokalnie czynników lub ich receptorów (3). Choć są to prace dotyczące śródbłonna naczyń krwionośnych, niemniej potwierdzają obserwacje własne w tym zakresie, jak i możliwość wpływu na śródbłonek naczyń limfatycznych. Niezaprzeczalnie, ekspresja VEGF modulowana jest przez E_2 *in vivo* i *in vitro* (3, 25). Dodatkowo Meduri i wsp. (21) wykazał, że zarówno E_2 jak i E_2 łącznie z progesteronem posiadają modulujący wpływ na cykliczne zmiany w ekspresji VEGFR-1 i VEGFR-2. W niniejszej pracy sugeruje się, że wyraźne różnice w immunoreaktywności i ekspresji VEGF-A oraz jego receptorów w śródbłonku naczyń limfatycznych w trakcie trwania cyklu rujoowego, w dużej mierze mogą wynikać z wpływu hormonów steroidowych, gdyż droga limfatyczna jest zdecydowanie skuteczniejsza i bardziej efektywna w transporcie hormonów, a ich koncentracja w naczyniach chłonnych znacznie wyższa niż w naczyniach krwionośnych (1). Nie wyklucza się jednak roli VEGF-A jako czynnika naczyniowo-ochronnego (4, 20, 30, 32).

Piśmiennictwo

1. Abdel Rahim S. E., Bland K. P.: The lymphatic drainage of the cranial part of the sheep's uterus and its possible functional significance. *J. Anat.* 1985, 4, 705-709.
2. Bachetti T., Morbidelli L.: Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacol. Res.* 2000, 42, 9-19.
3. Bausero P., Cavaille F., Meduri G., Freitas S., Perrot-Appianat M.: Paracrine action of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: production and target sites, and hormonal regulation. *Angiogenesis* 1998, 2, 167-182.
4. Belgore F., Blann A., Neil D., Ahmed A. S., Lip G. Y. H.: Localisation of members of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family and their receptors in human atherosclerotic arteries. *J. Clin. Pathol.* 2004, 57, 266-272.
5. Bendz A.: Countercurrent exchange in the human female reproductive tract. A study on extrinsic utero-ovarian blood vessels. *Dep. Obst. Gynecol.* 1982, 1-52.
6. Bradford M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254.
7. Clauss M.: Functions of the VEGF Receptor-1 (FLT-1) in the vasculature. *TCM* 1998, 8, 241-245.
8. Davies M. G.: The vascular endothelium. A new horizon. *Ann. Surg.* 1993, 218, 593-609.
9. Doboszyńska T., Andronowska A., Modzelewska B.: Immunohistochemical localisation of ET-1 and eNOS in lymphatic stomata of porcine broad ligament of the uterus. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2001, 1, 15-22.
10. Farnsworth R. H., Achen M. G., Stacker S. A.: Lymphatic endothelium: An important interactive surface for malignant cells. *Pul. Pharmacol. Therap.* 2006, 19, 51-60.
11. Ferrara N.: VEGF and its receptors. *ICS* 2004, 1262, 283-286.
12. Heap R. B., Fleet I. R., Hamon M.: Prostaglandin F2 α is transferred from the uterus to the ovary in the sheep by lymphatic and blood vascular pathways. *J. Reprod. Fert.* 1985, 74, 645-656.
13. Houck K. A., Ferrara N., Winter J., Cachianes G., Li B., Leung D. W.: The vascular endothelial growth factor family – identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol.* 1991, 5, 1806-1814.
14. Houck K. A., Leung D. W., Rowland A. M., Winter J., Ferrara N.: Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 26031-26037.
15. Kaczmarek M. M., Kowalczyk A. E., Waclawik A., Schams D., Zięcik A. J.: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the porcine corpus luteum during the estrous cycle and early pregnancy. *Mol. Reprod. Dev.* 2006, 9999, 1-10.
16. Klagsbrun M., D'Amore P. A.: Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996, 7, 259-270.
17. Kotwica J.: Mechanism of prostaglandin F2 α penetration from the horn of the uterus to ovaries in pigs. *J. Reprod. Fert.* 1980, 59, 237-241.
18. Krzymowski T., Kotwica J., Stefańczyk-Krzybowska S.: Uterine and ovarian countercurrent pathways in the control of ovarian function in the pig. *J. Reprod. Fert.* 1990, 40, 179-191.
19. Leiser R., Zimmermann W., Sidler X., Christen A.: Normal-zyklische Erscheinungen im Endometrium und Ovar des Schweines. *Tierärztl. Prax.* 1988, 16, 261-280.
20. Maharaj A. S. R., Saint-Geniez M., Maldonado A. E., D'Amore P.: Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *Am. J. Pathol.* 2006, 168, 639-648.
21. Meduri G., Bausero P., Perrot-Appianat M.: Expression of vascular endothelial growth factor receptors in the human endometrium: modulation during the menstrual cycle. *Biol. Reprod.* 2000, 62, 439-447.
22. Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., Poltorak Z.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999, 13, 9-22.
23. Poltorak Z., Cohen T., Sivan R., Kandelis Y., Spira G., Vlodavsky I., Keshet E., Neufeld G.: VEGF145: a secreted VEGF form that binds to extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 7151-7158.
24. Saharinen P., Tammela T., Karkkainen M. J., Alitalo K.: Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunology* 2004, 7, 387-395.
25. Shifren J. L., Tseng J. F., Zaloudek C. J., Ryan I. P., Meng Y. G., Ferrara N., Jaffe R. B., Taylor R. N.: Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996, 8, 3112-3118.
26. Stefańczyk-Krzybowska S., Krzymowski T., Wąsowska B., Chłopek J.: Retrograde transfer of ovarian steroid hormones to the ovary in the porcine periovarian vascular complex. *Exp. Phys.* 2002, 3, 361-371.
27. Sugino N., Kashida S., Takiguchi S., Karube A., Kato H.: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000, 85, 3919-3924.
28. Veikkola T.: Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J.* 2001, 20, 1223-1231.
29. Wijayagunawardane M. P., Kodithuwakku S. P., Yamamoto D., Miyamoto A.: Vascular endothelial growth factor system in the cow oviduct: a possible involvement in the regulation of oviductal motility and embryo transport. *Mol. Reprod. Dev.* 2005, 72, 511-520.
30. Winther H., Ahmed A., Dantzer V.: Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two specific receptors, Flt-1 and KDR, in the porcine placenta and non-pregnant uterus. *Placenta* 1999, 1, 35-43.
31. Yancopoulos G. D., Davis S., Gale N. W., Rudge J. S., Wiegand S. J., Holash J.: Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000, 407, 242-248.
32. Zachary I.: Signalling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001, 280, 1375-1386.

Adres autora: mgr inż. Anna Postek, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn;
e-mail: anula@pan.olsztyn.pl