



Sıçan Karaciğerinde Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü ve Reseptörlerinin Dağılımı

Bayram BAYRAM^{1,a}, Hakan SAĞSÖZ^{1,b,✉}

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

^aORCID: 0000-0002-5738-918X; ^bORCID: 0000-0002-5456-697X

Geliş Tarihi/Received
05.03.2020

Kabul Tarihi/Accepted
10.06.2020

Yayın Tarihi/Published
30.06.2020

Öz

Karaciğerin çeşitli hasarlardan sonra yenilenmesi, metabolizmanın ve detoksifikasyon gibi önemli fonksiyonlarının sürdürülmesi için gerekli bir olaydır. Rejenerasyon olayı histolojik olarak çok iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Özellikle ilgi çekici olan, karaciğer rejenerasyonunun farklı fazlarını kontrol eden sitokinler ve büyüme faktörleridir. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) mikrovasküler geçirgenliği artırır ve endotelial hücreler için spesifik bir mitojendir ve anjiyogenezde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Sunulan çalışmada, VEGF ve reseptörlerin (flt1 / fms, flk1 / KDR ve flt4) ekspresyonu immünohistokimyasal olarak incelendi. Bu çalışmada 10 adet sıçan kullanıldı. VEGF ve reseptörleri için pozitif immünoreaksiyon, sıçan karaciğerindeki hepatositler ile kan damarlarının endotel ve düz kas hücrelerinde belirlendi. Bununla birlikte, vena sentralis çevresindeki hepatositlerde flt1/fms immünoreaktivitesi VEGF, flk1/KDR ve flt4 ile karşılaştırıldığında oldukça güçlü idi. Sonuç olarak, VEGF ve reseptörlerin (flt1/fms, flk1/KDR ve flt4) sıçan karaciğerinin fizyolojik değişikliklerinde önemli roller oynadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Flt4, hepatosit, karaciğer, VEGF

Distribution of Vascular Endothelial Growth Factor and Receptors in Rat Liver

Abstract

The liver regenerate after various damages is a phenomenon essential for the maintenance of its important functions such as detoxification and metabolism. The regeneration process is histologically well described. Of particular interest are cytokines and growth factors, which control different phases of liver regeneration. Vascular endothelial growth factor (VEGF) increases microvascular permeability and is a specific mitogen for endothelial cells and is thought to take an important role in angiogenesis. The present study examined VEGF and receptors (flt1/fms, flk1/KDR and flt4) expression immunohistochemically. In this study, ten rats were used. Positive immunoreaction for VEGF and its receptors was determined in the hepatocyte and endothelial and smooth muscle cells of blood vessels in the rat liver. However, the flt1/fms immunoreactivity in hepatocytes around the vena centralis was quite strong compared to VEGF, flk1/KDR and flt4. As a result, the findings also indicate that VEGF and receptors (flt1/fms, flk1/KDR and flt4) played important roles in the physiological changes of rat liver.

Key Words: Flt4, hepatocyte, liver, VEGF

GİRİŞ

Karaciğer vücuttaki metabolik olayların düzenlenmesinde ve aynı zamanda da detoksifikasyonda merkezi bir rol oynar. Bu fonksiyonlardan dolayı da, organdaki hücresel yenilenmenin hızlı bir şekilde gerçekleşmesi gerekir. Primer veya metastatik karaciğer hastalıkları, alkol veya ilaç kullanımları, otoimmün hastalıklar ile toksinler karaciğerde hücre kayıpları meydana getirerek hasara neden olur. İlginçtir ki, karaciğer tamamen yenilenmek için eşsiz bir yeteneğe sahiptir (1, 2). Hepatositler hücre döngüsüne ilk giren hücrelerdir ve 2-3 gün içerisinde bölünme geçirirler. Bu hücreler GO'dan çıkmak ve rejenerasyon için gereken bir dizi gen ekspresyonunu başlatmak için sinyaller alırlar. Daha sonra, hücre döngüsü ilerler ve mitoz geçirirler. Bunu da sırasıyla, hepatik stellat ve Kupfferin yıldız hücreleri ile biliyer epitel hücrelerinin çoğalması izler. Ayrıca, endotel hücrelerinin çoğalması ve filizlenen anjiyogenez, karaciğer damarlarını yeniden oluşturmak için ortaya çıkar (2).

Karaciğerdeki hücrelerin aktivasyonu, çoğalması, göçü, farklılaşması ve hayatta kalması hepatositlerden eksprese edilen veya dolaşım sistemi yolu ile karaciğere ulaşan çok sayıda büyüme faktörü ve sitokin tarafından kontrol edilir (3). Bu faktörlerden en önemlisi ve üzerinde en çok durulan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'dür. VEGF, 45 kDa'luk, homodimerik, heparin-bağımlı bir glikoprotein olup, çeşitli alt grupları tanımlanmıştır. VEGFA, B, C, D, E, ya da aminoasit sayılarına göre VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 ve VEGF206 gibi izoformları bulunmaktadır. VEGF, aktivitesini üç reseptör ile gerçekleştirir: Tirozin kinaz yapısında olan bu reseptörler VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (flk-1/KDR) ve VEGFR-3 (flt-4)'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 hücrelerdeki çoğalma, göç ve farklılaşmayı uyarır (4).

Karaciğer hepatositlerinden VEGFA'nın güçlü bir ekspresyon gösterdiği bildirilmiştir. Özellikle, VEGF-A'nın sıçanlara enjeksiyonunu takiben sinüzoidal endotel hücrelerinde ve hepatositlerde çoğalmayı uyardığı gösterilmiştir (5). VEGFA'nın hepatositlerdeki bu etkisini de VEGFR1'in aktivasyonu üzerinden gösterdiği ifade edilmiştir (6). Monacci ve ark. (1993) erişkin sıçanların normal akciğer alveolar hücrelerinde, böbrek glomerüllerinde, proksimal tübüllerinde ve düşük seviyede de olsa karaciğer hepatositleri ve beyinde VEGF'nin ekspresyonunu göstermişlerdir (7).

VEGF ve reseptörlerinin (flt1/fms, flk1/KDR ve flt4) normal damarlaşıma fizyolojisinde önemli roller oynadığı bilinmektedir. Karaciğerin normal ya da rejenerasyon sürecinde endojen büyüme faktörlerinin rolleri kısmen açıklanmıştır. Yapılan çalışmalarda sıklıkla tanımlayıcı ekspresyon çalışmalarına ve/veya hücre kültürü deneylerinden elde edilen sonuçlara dayanmaktadır (1,2,3,5-7). Bu çalışmada, sağlıklı sıçanların karaciğer dokusunda VEGF ve reseptörlerinin immunohistokimyasal lokalizasyonlarının belirlenmesi ve olası fizyolojik rollerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Deney Hayvanları

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

Çalışmada Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi (DÜSAM) Müdürlüğü'nden temin edilen 10 adet erişkin, 220-250 g ağırlığında Sprague-Dawley ırkı dişi sıçan kullanıldı. Hayvanlar, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ışık periyodunda barındırıldı. Pelet yem ve su ihtiyaçları ise ad libitum olarak karşılandı. Eter anestezisi ile uyutulan hayvanların karaciğerleri diseke edilerek dışarı alındı ve %10 nötral formalin solüsyonunda 24 saat tespit edildi. Rutin histolojik işlemleri takiben dokular parafinde bloklandı. Hazırlanan parafin bloklarından 5 mikrometre kalınlığında seri kesitler 3-aminopropyl-triethoxysilane (APES) ile kaplanmış lamlara alındı.

İmmunohistokimyasal boyama

Parafin kesitler, deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden sonra distile suda çalkalandı. Endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için kesitler distile suda hazırlanmış %3'lük H₂O₂ ile 20 dakika muamele edildikten sonra 0.01 M Fosfat BufferSaline (PBS)'de iki kez 5'er dakika yıkandı. Antijen retrieval işlemi uygulanmaksızın, immünoglobulinlerin özgül olmayan bağlanmalarını engellemek için bloking serumda 15 dakika muamele edilen kesitler VEGF'ye karşı fare monoklonal antikor (Santa Cruz Biotechnology, sc-53462), flt1/fms'e karşı tavşan poliklonal antikor (Santa Cruz Biotechnology, sc-316), flk1/KDR'e karşı fare monoklonal antikor (Santa Cruz Biotechnology, sc-6251), flt-4'e karşı tavşan poliklonal antikor (Santa Cruz Biotechnology, sc-321) ile +4°C'de 1 gece süresince inkübe edildi. İnkübasyonu takiben 0.01 M PBS'te 4 kez yıkanan kesitler, biotinlenmiş sekonder antikor (Histostain Plus Bulk Kit, Zymed) ile 20 dakika nem odasında, oda ısısında inkübe edilip, tekrar 4 kez PBS ile yıkandıktan sonra da enzim konjugatlı strepta-

vidinde (Histostain Plus Bulk Kit, Zymed) 20 dakika muamele edildi. Kesitler, tekrar 4 kez PBS ile yıkandıktan sonra DAB kromojen solüsyonlarında 5-15 dakika bekletildi. Gill'in hematoksileninde 1 dakika süreyle zıt boyama yapılan kesitler çeşme suyunda mavileşinceye kadar yıkandı. Kesitler alkoller ve ksilolden geçirilip entellan ile kapatıldı.

Bu çalışmada karaciğer dokularının kullandığımız sıçanların uterusunda epidermal büyüme faktörü reseptörleri ile VEGF ve reseptörlerinin lokalizasyonlarını daha önce göstermiştik ve pozitif kontrol olarak bu çalışmalarımızda uterusdaki VEGF ve reseptörlerinin immunreaksiyonlarının pozitif olması immunreaksiyonun doğruluğunu gösterdi (8,9). Ayrıca, boyanmaların doğruluğunu kanıtlamada negatif kontroller de kullanıldı. Negatif kontrol olarak alınan doku örnekleri ise primer antikor yerine PBS ile muamele edildi. Boyamalar sonrası preparatlar Nikon-Eclipse 400 dijital fotoğraf makinesi ataçmanlı araştırma mikroskopunda incelenerek fotoğraflandı.

İmmunohistokimyasal Boyanma Sonuçlarının Değerlenmesi

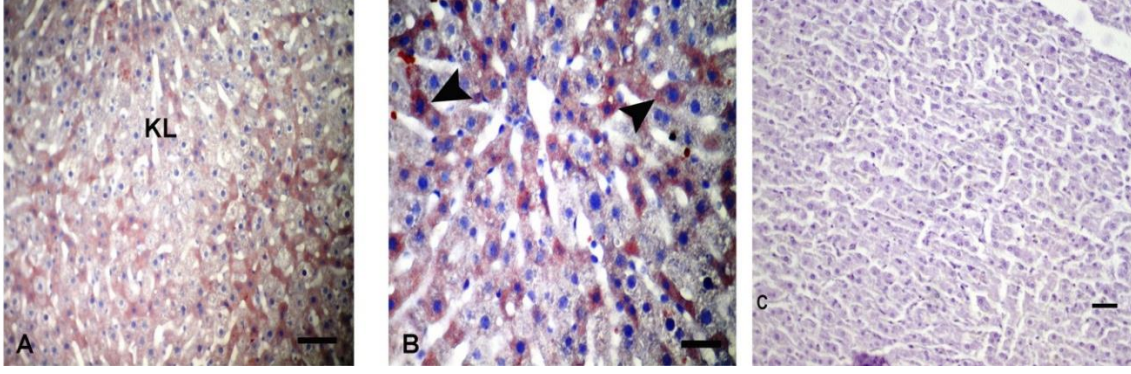
İmmunohistokimyasal boyanma, yoğunluk skoru (intensity score) kullanılarak semikantitatif olarak değerlendirildi (9). Yoğunluk skorunda (I), hücrelerdeki boyanmalar (-) negatif, (+) zayıf, (++) orta ve (+++) kuvvetli olarak derecelendirildi. Hücrelerde immunohistokimyasal reaksiyonların yoğunluk skoru iki bağımsız araştırmacı tarafından yapıldı (8,9). Sıçan karaciğerlerinde VEGF ve reseptörlerinin (flt1/fms, flk1/KDR ve flt4) ekspresyonları mikroskopta farklı büyütmelemler kullanılarak hepatositler, duktus biliferus epiteli, kan damarlarının endoteli hücreleri ile ekstrasellular matriks olmak üzere dört farklı hücre grubunda gerçekleştirildi.

BULGULAR

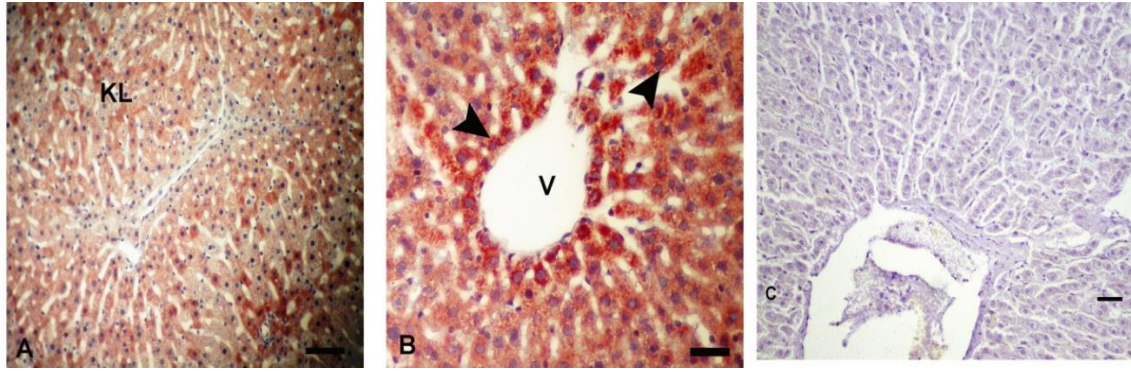
Erişkin sıçanların karaciğer hepatositlerinde VEGF ve reseptörlerinin (flt1/fms, flk1/KDR ve flt4) değişen yoğunluklarda sitoplazmik olarak eksprese olduğu tespit edildi. Hepatositlerde VEGF, flk1/KDR ve flt4'ün, flt1/fms ekspresyonuna göre daha zayıf olduğu tespit edildi (Tablo 1). Karaciğer hepatositlerinin bazılarında VEGF, flk1/KDR ve flt4 ekspresyonu gözlenirken, flt1/fms ekspresyonunun birçok hücrede olduğu görüldü (Şekil 1-4). Özellikle flt1/fms'nin v. sentralis çevresindeki karaciğer epitel hücrelerinde daha güçlü olduğu dikkati çekti (Şekil 2). Karaciğerin parankima ve stroması içinde lokalize olan kan damarlarının endotel hücrelerinde VEGF ve reseptörlerinin lokalize olduğu belirlendi (Şekil 1-4). Duktus biliferus epiteli ile ekstrasellular matrikste VEGF ve reseptörlerinin ekspresyonuna rastlanmadı.

Tablo 1. Sıçan karaciğerinde vasküler endotelial büyüme faktörü ve reseptörlerinin immunohistokimyasal lokalizasyonunun semikantitatif skoru

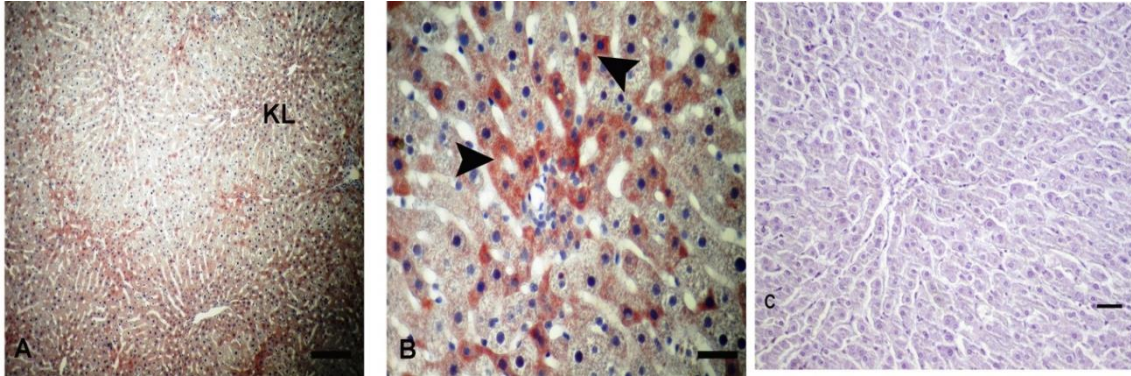
İmmunohistokimyasal Parametreler	Karaciğer Bölümleri			
	Hepatositler	Kan damarları	Duktus biliferus epiteli	Ekstrasellular matriks
VEGF	++	++	-	-
Flt1/fms	+++	++	-	-
Flk1/KDR	++	++	-	-
Flt4	++	++	-	-



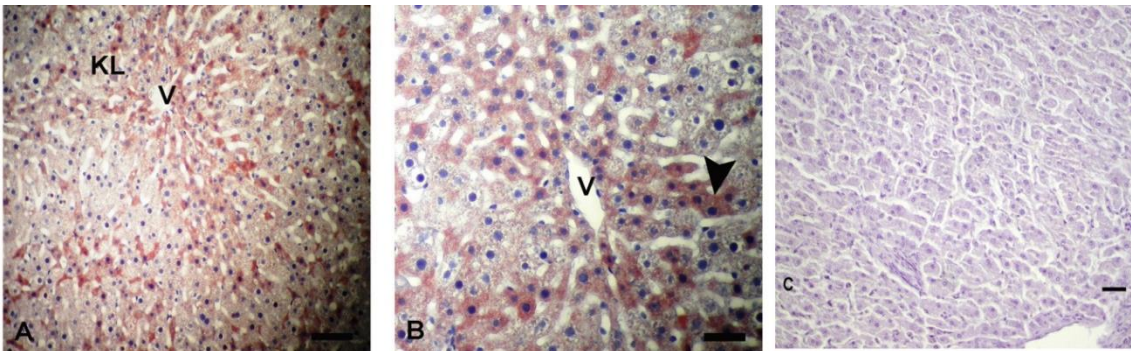
Şekil 1. (A,B) Sıçan karaciğerinde VEGF'nin lokalizasyonu. KL; karaciğer lopcuğu, okbaşı; pozitif immunreaksiyon gösteren hepatositler, (C) negatif kontrol. Bar: (A,C) 50 µm, (B) 25 µm.



Şekil 2. (A,B) Sıçan karaciğerinde flt1/fms'nin lokalizasyonu. KL; karaciğer lopcuğu, V: vena sentralis, okbaşı; pozitif immunreaksiyon gösteren hepatositler, (C) negatif kontrol. Bar: (A,C) 50 µm, (B) 25 µm.



Şekil 3. (A,B) Sıçan karaciğerinde flk1/KDR'nin lokalizasyonu. KL; karaciğer lopcuğu, okbaşı; pozitif immunreaksiyon gösteren hepatositler, (C) negatif kontrol. Bar: (A) 100 µm, (B) 25 µm, (C) 50 µm.



Şekil 4. (A,B) Sıçan karaciğerinde flt4 lokalizasyonu. KL; karaciğer lopcuğu, V: vena sentralis, okbaşı; pozitif immunreaksiyon gösteren hepatositler, (C) negatif kontrol. Bar: (A,C) 50 µm, (B) 25 µm.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Homeostazın devamlılığında çok önemli görevlere sahip olan karaciğerin, kendini yenileyebilme kapasitesi çok büyük önem taşımaktadır. Karaciğerin kendini yenileyebilme kapasitesini dolaşımdaki birtakım faktörlerin düzenlediği ve burada en önemli olanın hepatosit büyüme faktörü (HGF) olduğu ortaya konulmuştur (3). Özellikle, hepatositlerin çoğalmasında kontrol eden 20'den fazla büyüme faktörünün olduğu bildirilmiştir. Bu büyüme faktörlerinin hepatositlerin çoğalmasında tetiklediği düşünülmektedir (1). Son yıllardaki çalışmalarda, karaciğer yenilenmesinde HGF ile birlikte anjiyogenik faktörlerinde önemli roller üstlendiği bildirilmiştir. Anjiyogenik faktörler, endotel hücrelerinin çoğalması ve göçünü uyularak hasarlı dokularda damarlaşmayı sağlar ve bu şekilde dokuların iyileşmesinde rol oynar. Güçlü bir anjiyogenik faktör olan VEGF ve reseptörlerinin karaciğer hepatositlerinin yenilenmesinde önemli olabileceği gösterilmiştir (2).

Yetişkin sıçanlarda VEGF'nin akciğer alveol epitel hücreleri, böbrek glomerülleri, proksimal tubullerinde ve daha düşük seviyelerde karaciğer hepatositlerinde lokalize olduğu bildirilmiştir (7.). Karaciğer rezeksiyonu yapılan sıçanlarda rezeksiyonundan sonraki 72. saatte VEGF'nin rejenerasyon hepatositlerinde pik yaptığı belirlenmiştir (10). Senger ve ark. (1983) tarafından VEGF'nin fare, hamster ve kobayların hepatositlerinde lokalize olduğu gösterilmiştir (11). Başka bir çalışmada, normal fare karaciğer hepatositlerinde VEGF reseptörünün ekspresyonu olmadığı, fakat sinüzoidal endotel hücrelerinden ekspresyonu edildiği belirlenmiştir (12).

Berse ve ark. (1992)'nin insanlarda yapmış oldukları bir çalışmada VEGF'nin düşük düzeylerde karaciğer, dalak ve mide mukozasında bulunduğu (13), buna karşın Yamaguchi ve ark. (1998)'nin çalışmasında ise normal karaciğer dokusunda bulunmadığı bildirilmiştir (14). Chow ve ark. (1997)'nin çalışmalarında ise insanlarda normal karaciğer dokusunun portal aralığındaki ekstraselüler matriksinden VEGF'nin ekspresyonu olduğu, normal hepatositler ile duktus biliferus epitelinden ise ekspresyonu olmadığı ortaya konulmuştur (15).

Bizim çalışmamızda da, fare (12) ve insanlardaki bazı çalışmalarda bildirilenlerin aksine (14,15), insan (13), fare, sıçan, kobay (7,10,11) çalışmalarındaki benzer şekilde yetişkin sıçanların normal karaciğer dokusundaki hepatositlerinde VEGF'nin ekspresyonu olduğu, ayrıca VEGF reseptörlerinin de (flt1/fms, flk1/KDR ve flt4) değişen yoğunluklarda ekspresyonu edildiği ortaya konulmuştur. Chow ve ark. (1997)'nin bildirdiği gibi sunulan çalışmada da sıçanlarda duktus biliferus epitel ile ekstraselüler matrikste VEGF ve reseptörlerinin ekspresyonuna rastlanmamıştır. Bu çalışmalardakine (7,10-14) benzer şekilde, kan damarları ve sinüzoidlerin endotel hücrelerinde de VEGF ve reseptörlerinin ekspresyonları gösterilmiştir.

Daha önceki çalışmalarda karaciğer rejenerasyonu sırasında VEGF aracılığı ile sinüzoidal endotel hücreleri ile hepatositler arasında bir etkileşimin olduğu, parsiyal karaciğer rezeksiyonu sonrasında hepatositlerin mitozunu sinüzoidal endotel hücrelerinin mitozunun izlediği gösterilmiştir. Deneysel karaciğer rezeksiyonu çalışmalarında, kendini

yenileyen hepatositlerde VEGF'nin etkili olduğu ortaya konulmuştur (3). Endojen ve eksojen VEGF'nin parsiyal karaciğer rezeksiyonu sonrasında meydana gelen rejenerasyon esnasında sinüzoidal endotel hücrelerinin çoğalmasını uyardığını ve bunu takibinde parakrin yollar ile hepatositlerin çoğalmasını artırdığı gösterilmiştir (5). Parsiyal rezeksiyonun erken döneminde VEGF'nin eksojen uygulanmasının karaciğer rejenerasyonunu uyardığı da rapor edilmiştir (16). Yukarıdaki bilgiler ışığında, yetişkin fare karaciğerinde VEGF ve reseptörlerinin hepatositlerin mitozu, farklılaşması ve çoğalmasında önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak, sıçanlarda karaciğer hepatositleri ile kan damarları ve sinüzoidlerin endotel hücrelerinde VEGF ve reseptörlerinin (flt1/fms, flk1/KDR ve flt4) ekspresyonu gösterildi. VEGF ve reseptörlerinin (flt1/fms, flk1/KDR and flt4), hepatositler ve endotel hücrelerindeki farklı ekspresyon düzeyleri ve lokalizasyonları, bu hücrelerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde ve devamlılığında, ayrıca hücrelerde proliferasyon, farklılaşma, apoptozis ve anjiyogenezin sağlanmasında kritik bir öneme sahip olduğunu ortaya koydu.

KAYNAKLAR

1. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. (2006). Liver Regeneration. *Hepatology*. 43(2): 45-53.
2. Michalopoulos GK, Khan Z. (2005). Liver Regeneration, Growth Factors and Amphiregulin. *Gastroenterology*. 128: 503-506.
3. Michalopoulos G, Houck KA, Dolan ML, Luetke N C. (1984). Control of Hepatocyte Replication by Two Serum Factors. *Cancer Res*. 44: 4414-4419.
4. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. (2003). The Biology of VEGF and Its Receptors. *Nat Med*. (9): 669-676.
5. Taniguchi E, Sakisaka S, Matsuo K, Tanikawa K, Sata M. (2001). Expression and Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Liver Regeneration After Partial Hepatectomy in Rats. *J Histochem Cytochem*. 49(1): 121-130.
6. LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N. (2003). Angiogenesis-independent Endothelial Protection of Liver: Role of VEGFR-1. *Science*. 299(5608): 890-893.
7. Monacci WT, Merrill MJ, Oldfield EF. (1993). Expression of Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor in Normal Rat Tissues. *Am J Physiol*. 264: 995-1002.
8. Topaloğlu U, Akbalık ME, Saruhan BG, Ketani MA, Kılıç M, Sağsöz H. (2016). Sıçan Uterusunda Anöstrus Süresince Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörlerinin Dağılımı. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*. 1(5): 28-34.
9. Akbalık ME, Saruhan BG, Topaloğlu U, Ketani MA, Kılıç M, Sağsöz H. (2016). Anöstrus Süresince Sıçan Uterusunda Vasküler Endotel Büyüme Faktörü ve Reseptörleri ile Vasküler Endotel Büyüme İnhibitörünün Dağılımı. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*. 2(6): 83-90.
10. Mochida S, Ishikawa K, Inao M, Shibuya M, Fujiwara K. (1996). Increased Expressions of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors, flt-1 and KDR/flk-1, in Regenerating Rat Liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 226: 176-179.
11. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. (1983). Tumor Cells Secrete a Vascular Permeability Factor

- That Promotes Accumulation of Ascites Fluid. Science. 219(4587): 983-985.
12. Onori P, Morini S, Franchitto A, Sferra R, Alvaro D, Gaudio E. (2000). Hepatic Microvascular Features in Experimental Cirrhosis: A Structural and Morphometrical Study in CCl4-treated Rats. J Hepatol. 33(4): 555-563.
 13. Berse B, Brown LF, Van De Water L, Dvorak HF, Senger DR. (1992). Vascular Permeability Factor (Vascular Endothelial Growth Factor) Gene is Expressed Differentially in Normal Tissues, Macrophages, and Tumors. Mol Biol Cell. 3: 211-220.
 14. Yamaguchi R, Yano H, Lemura A, Ogasawara S, Haramaki M, Kojiro M. (1998). Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Hepatocellular Carcinoma. Hepatology. 28: 68-77.
 15. Chow NH, Hsu PI, Lin XZ, et al. (1997). Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Normal Liver and Hepatocellular Carcinoma: An Immunohistochemical Study. Hum Pathol. 28(6): 698-703.
 16. Assy N, Spira G, Paizi M, et al. (1999). Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on Hepatic Regenerative Activity Following Partial Hepatectomy in Rats. J Hepatol. 30(5): 911-915.

✉ **Yazışma adresi:**

Prof. Dr. Hakan SAĞSÖZ
Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 21280, Diyarbakır, TÜRKİYE
E-mail: hakansagsoz@hotmail.com