

Preeklampitik ve normotansif plasentalarda VEGF ve Vimentin ekspresyon düzeylerinin immunohistokimya ve Western Blot yöntemleri ile incelenmesi

Examining the expression level of VEGF and vimentin by immunohistochemistry and Western Blot in preeclamptic and normotensive placentas

Sevgi İrtegin¹, Elif Ağaçayak², Engin Devenci³

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada anjiogenezi stimule eden vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve bir mezenşimal marker olan vimentin proteinlerinin preeklampitik ve normotansif plasentalardaki ekspresyon düzeylerini araştırmayı amaçladık.

Yöntemler: Çalışmaya 35-38. haftalardaki doğum sonrası plasentalar dahil edildi. 10 adet preeklampitik ve 10 adet normal plasenta kullanıldı. %10' luk formaldehit solüsyonuna atılan doku parçaları rutin parafin takiplerinden sonra histopatolojik olarak incelendi. VEGF ve vimentin protein düzeyleri Western Blot yöntemiyle ölçüldü.

Bulgular: Preeklampitik plasentalarda sinsisyal proliferasyonun artmış olduğu izlendi. İntravillous sinsityal düğümler, sinsityal ödem, kollajen artışı ve damarlarda endotel hasar gözlemlendi. Preeklampsisi (PE) sonucu plasentadaki VEGF ve vimentin protein düzeylerinin artış gösterdiği gözlemlendi.

Sonuç: Preeklampitik plasenta dokusunda fonksiyonel olmayan VEGF ligandının reseptörüne bağlanamadığı için VEGF miktarının arttığı ve bu durumun yetersiz anjiogeneze neden olduğu olasıdır. Ayrıca preeklampitik plasentadaki vimentin artışının vasküler permeabilitenin azalmasına neden olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Preeklampsisi, plasenta, VEGF, vimentin

ABSTRACT

Objective: In this study, we aimed to investigate the expression levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) which stimulates angiogenesis and vimentin, an intermediate cytoskeleton filaments, in both preeclamptic and normotensive placentas.

Methods: In this study, placentas after birth in 35-38 weeks were included. Ten preeclamptic placentas and ten normal placentas were used. Tissue pieces which had been soaked in 10% formaldehyde solution were examined histologically after routine paraffin follow. The expression levels of VEGF and vimentin were measured by Western Blot.

Results: It was found that syncytial proliferation was increased in preeclamptic placentas. Intervillous syncytial knots, syncytial edema, collagen increase and vascular endothelial damage were observed. It was observed that VEGF and vimentin expression levels were increased as a result of preeclampsia.

Conclusion: Nonfunctional VEGF which could not bind to its receptor leading to increased VEGF level may lead to inadequate angiogenesis in preeclamptic placenta. In addition, it is thought that an increase in vimentin level in preeclamptic placenta may cause reduced vascular permeability.

Key words: Preeclampsia, placenta, VEGF, vimentin

GİRİŞ

Preeklampsisi (PE) gebeliğe özgü olup gestasyonun 20. haftasından sonra hipertansiyonun (kan basıncı >140/90) görüldüğü bir sendromdur. PE hipertan-

siyonla birlikte proteinüri (≥ 300 mg /24 saat) yada diğer belirti ve semptomların (serebral ve görme semptomları, pulmoner ödem, karaciğer transaminazlarında artış, serum kreatin düzeyinde artış, pla-

¹ Dicle Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Diyarbakır, Türkiye

² Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Diyarbakır, Türkiye

³ Dicle Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Diyarbakır, Türkiye

Yazışma Adresi /Correspondence: Sevgi İrtegin,

Dicle Üniversitesi. Tıp fak. Tıbbi Biyoloji AD. Diyarbakır, Türkiye Email: irtegunsevgi@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received: 18.05.2016, Kabul Tarihi / Accepted: 07.06.2016

Copyright © Dicle Tıp Dergisi 2016, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

telet sayısında düşüş) eşlik ettiği multisistemik bir hastalıktır [1,2]. Sistolik kan basıncının 160 mmHg veya daha fazla ve diastolik kan basıncının ise 110 mmHg veya daha fazla olarak seyretmesi şiddetli PE olarak tanımlar [1].

PE tüm gebeliklerin % 3-8' inde görülür ve maternal ve perinatal morbidite ve mortalitenin ana sebebidir. PE' nin etiyojisi, patogenezi ve patofizyolojisi tam olarak anlaşılmamakla beraber, gebeliğin erken dönemlerinde anormal plasantasyonun hastalığın oluşumunda önemli bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir [3,4]. Anormal plasantasyon PE' nin klinik manifestasyonlarına yol açan endotelial disfonksiyona ve maternal inflamatuvar yanıtı neden olmaktadır [5,6].

Plasenta, trofoblast ve endotel hücrelerinden oluşmakta, ve maternal ve fetal faktörlerin (gaz ve besin alışverişi ve atık maddelerin eliminasyonu gibi) kompleks moleküler etkileşimlerinin gerçekleştiği bir yapıdır [7,8]. Plasentanın dış tabakasını oluşturan trofoblast, sitotrofoblast denilen iç tabaka ile sinsityotrofoblast denilen dış tabakadan oluşmaktadır [7,8]. Normal hamilelikte sitotrofoblastlar plasentadan ayrılıp uterusu yerleşirler ve uterin duvarından spiral arterlere invaze olurlar. Spiral arterler sitotrofoblastların invazyonu sonucu plasentanın yeterince perfüze olabilmesi için gerekli olan fizyolojik özellikleri kazanmış olur. Preeklampitik hastalarda sitotrofoblastların yetersiz migrasyonu ve invazyonu sonucu spiral arterlerde bu normal fizyolojik değişiklikler olmamakta veya spiral arterlerin sadece desidual kısmı ile sınırlı kalmaktadır [9-12].

PE' de spiral arterlerin remodelenmesi bozulduğu için plasental hipoksi oluşur. Hipoksi sonucu plasenta pro- ve anti- anjiogenik özelliği olan plasental faktörler üretir. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) bu üretilen pro-anjiogenik faktörlerden biridir [13,14]. VEGF ve VEGF reseptörü (VEGFR) hem fizyolojik hemde patolojik anjiogenez (kanser) için önemli rol oynar. VEGF fetal ve plasental gelişim için majör faktördür [15].

Epitelyal-mezankimal dönüşüm (EMT) trofoblast invazyonu ve kanser progresyonu için önemli bir mekanizmadır [16]. Vimentin bir ara filaman proteini olup EMT sırasında hücre-hücre adezyonlarının kaybolduğunu gösteren mezenşimal bir markırdır. Trofoblast invazyonunda ve kanser metas-

tazında vimentin ekspresyonu artış göstermektedir [17].

Çalışmamızda, PE' nin patofizyolojik mekanizmasını daha iyi anlayabilmek için normal ve preeklampitik plasentalarda VEGF ve vimentin ekspresyon düzeylerini immünohistokimya ve Western Blot yöntemlerini kullanarak araştırmayı amaçladık.

YÖNTEMLER

Plasental doku örnekleri

Çalışmanın etik onayı Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi girişimsel olmayan klinik araştırmalar etik kurulundan alınmıştır. Çalışmada Dicle Üniversitesi kadın doğum kliniğinde yatmakta olan hasta onayı alınan hamile kadınların 35-38. haftadaki doğum sonrası plasentaları alındı. Bu çalışmada 10 adet preeklampitik ve 10 adet normal plasenta (kontrol grubu) kullanıldı. Preeklampitik grubun belirlenmesinde kan basınçları yüksek seyreden gebelerden sistolik >140 mm/Hg ve diastolik >90 mm/Hg olanlar ve proteinürisi 300mg/24 saat seyreden preeklampitik hastalar seçildi. Çalışmaya dahil edilen hasta grubunun yaş ortalaması 30, kontrol grubunun yaş ortalaması ise 29 du. Doku örnekleri plasentanın maternal yüzünden alındı ve %10' luk formaldehitte fikse edildikten sonra, yıkama, dehidratasyon ve şeffaflaştırma işlemleri ardından 58 °C' de parafin bloklara alındı.

İmmünohistokimyasal inceleme

Parafine gömülü plasenta dokularından 4-6 µm kalınlığında kesitler alındı ve deparafinizasyon işleminin ardından alkol serilerinden geçirilerek kesitler distile suya alındı. Preparatlar antijen retrieval için sitrat solüsyonunda mikrodalga fırında 3x5 dk bekletildi. Oda sıcaklığında 10 dk soğumaya bırakıldıktan sonra kesitler fosfat buffer solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra %3' lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile 10 dk muamele edildi. Distile su içinde çalkalanan kesitler PBS (pH 7,6) ile yıkandı. Daha sonra kesitler mouse monoclonal anti-vimentin antibody (Santacruz, 1:100) ve mouse monoclonal anti-VEGF antibody ile (Santacruz, 1:100) inkübe edildi. Kesitler 3 kez PBS ile yıkama sonrasında 10 dk sekonder antikor solüsyonunda (Biotinylated Goat Anti-Mouse, LabVision,) tutuldu. 3 kez PBS' de yıkanan kesitlere 3x5 dk streptavidin peroksidaz solüsyonu (Strep-

tavidin Peroxidase, LabVision,) uygulandı. PBS ile yıkama sonrasında kesitlere 3-amino 9 etil karbazol (AEC) kromojen solüsyonu 8 dk uygulandı. Kesitler, distile su ile yıkandıktan sonra 2 dk mayer hematoksilen uygulanarak zıt boyama yapıldı ve ışık mikroskopunda (Nikon) değerlendirildi.

WESTERN BLOT

Hücre lizisi ve total protein ölçümü

Sıvı azotta dondurulmuş plasenta dokusu porselen havanda toz haline getirildi. 50 mg toz haline getirilmiş plasenta dokusu proteaz inhibitörü karışımı içeren 250 µl RIPA lizis solüsyonunda 1 saat buz içerisinde bekletildi. Liziz edilmiş plasenta örnekleri -86 °C' de muhafaza edildi. Protein degradasyonunu önlemek için bütün basamaklar buz üzerinde gerçekleştirildi. Total hücresel protein konsantrasyonu BCA kiti (Pierce, Thermo scientific) kullanılarak firmanın talimatlarına uyularak yapıldı. BCA ölçümü 96-kuyucuklu plaka içerisinde mikropilaya okuyucu ile (Multiscan™ GO, Thermo Scientific) yapıldı.

SDS-PAGE

Protein örnekleri 1xSDS yükleme solüsyonunda (%2 SDS, %5 gliserol, %0,01 bromofenol mavisi, %8 DTT) hazırlanarak 5 dakika 95 °C sıcaklıkta kaynatıldı. 20 µg total protein örneği %10' luk poliakrilamid jele yüklendi ve SDS koşuturma solüsyonunda (2.4 mM Tris, 19.2 mM glisin, %0,01' lik SDS) 200 V' da 1 saat elektroforez edildi.

Proteinlerin membrana transferi ve antikorla boyama

Ayrıştırılmış proteinler SDS-PAGE' den 100V' da 1 saat süreyle transfer solüsyonu (25 mM Tris, 192 mM glisin, %20 metanol, pH 8.3) içerisinde PVDF membrana transfer edildi. Transferden sonra membran PBS-T (PBS+ %1 Tween-20) solüsyonu içerisinde hazırlanmış %5' lik süt tozu içerisinde 1 saat oda sıcaklığında bloke edildi. Bloklama işleminden sonra membran primer antikorlar (anti-VEGF 1:200 dilüsyon Santa Cruz, anti-vimentin 1:1000 dilüsyon Abcam ve anti-β-aktin 1:1000 Abcam) ile 2 saat oda sıcaklığında muamele edildi. Daha sonra membran

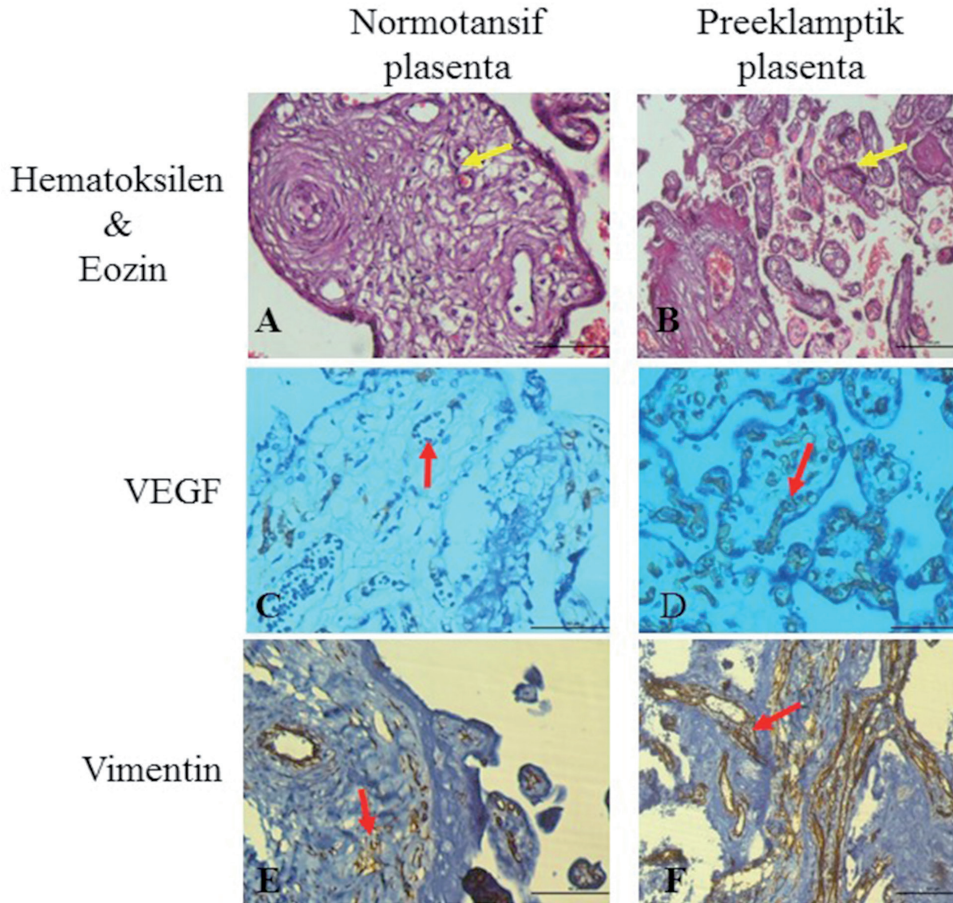
4 defa PBS-T ile 30 dakika süre boyunca yıkandı. Yıkama işleminden sonra membran sekonder antikorlarla 1:10000 dilüsyon oranında 1 saat oda sıcaklığında muamele edildi. Membran tekrar 4 defa PBS-T ile 30 dakika süre boyunca yıkandı. Protein bantları ECL kimyasalı (Bio-Rad) kullanılarak görüntüldü. Fotoğraflar ChemiDoc™ MP- Bio-Rad cihazı kullanılarak alındı.

BULGULAR

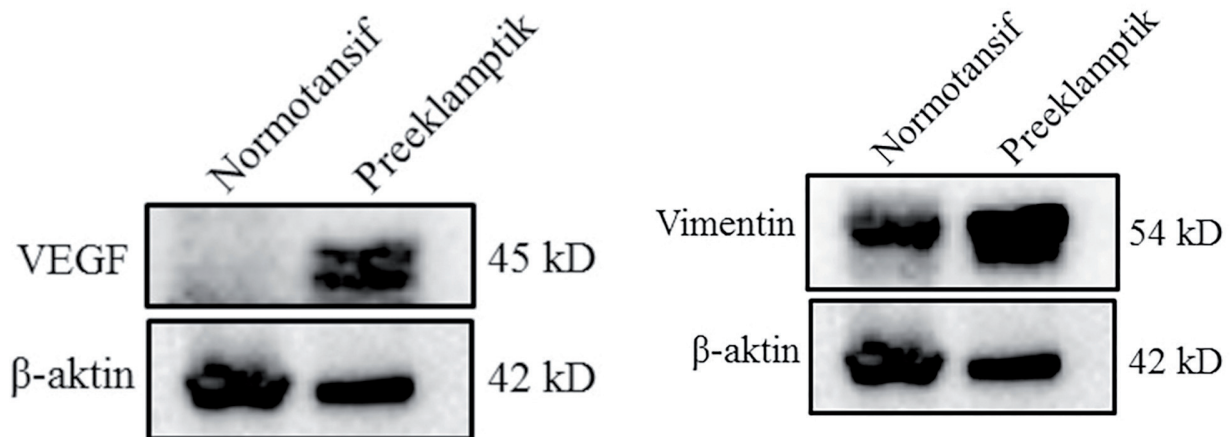
Preeklampitik hasta grubuna ait plasentalarda villuslarda parsiyel veya total tromboz ve villüs kapillerlerinde konjesyon izlendi. Kontrol grubuna ait normal plasentalarda ise bu bulgulara rastlanmadı (Resim 1A). Preeklampitik plasentaların hepsinde sinsisyal proliferasyon artmış olarak izlendi. İntravillous sinsityal düğümler, sinsityal ödem, kollajen artışı ve damarlarda endotel hasar gözlemlendi (Resim 1B).

Normal plasentalarda zayıf VEGF ekspresyonu izlendi (Resim 1C). Buna karşın normal plasentalara oranla preeklampitik hasta grubuna ait plasentalarda ise VEGF ekspresyonunun belirgin bir biçimde artış gösterdiği gözlemlendi (Resim 1D). Benzer şekilde preeklampitik plasentalarda fibrin oluşumuna paralel biçimde koryonik bağ dokusundaki fibröz dokunun vimentin ekspresyonu ile birlikte artış gösterdiği tespit edildi (Resim 1E). Preeklampitik plasentaların koryon villuslarındaki damarlarda endotel hasarı nedeniyle kan bileşenlerinin ekstravazasyonu ve büzülme sonucu koryon damar duvarında fibrin oluşumu gerçekleşmiştir. Özellikle damarları destekleyen bazal tabaka yakınında yoğun vimentin ekspresyonu gözlemlenmiştir (Resim 1F).

Preeklampitik ve normotansif plasentalardaki VEGF ve vimentin proteinlerinin ekspresyon düzeyindeki farklılıklar ayrıca Western Blot yöntemiyle gösterildi. İmmünohistokimya sonuçlarımızla uyumlu bir şekilde preeklampitik hasta grubuna ait plasentalarda VEGF ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna (normal plasenta) oranla şiddetli bir şekilde artış gösterdiği saptandı (Şekil 1). Benzer şekilde vimentin protein ekspresyon düzeyinde de preeklampitik hasta grubuna ait plasentalarda normal plasentaya kıyasla önemli bir artış gösterdiği tespit edildi (Şekil 2).



Resim 1: Preeklampitik ve normotansif plasentaların yapısal ve immunohistokimyasal incelenmesi. **A:** Normotansif hasta grubuna ait plasental bulgular. **B:** Preeklampitik hasta grubuna ait plasental bulgular. **C:** Normotansif plasentada VEGF ekspresyonu. **D:** Preeklampitik plasentada VEGF ekspresyonu. **E:** Normotansif plasentada vimentin ekspresyonu. **F:** Preeklampitik plasentada vimentin ekspresyonu



Şekil 1: Preeklampitik plasentada VEGF ekspresyonu normal plasentaya kıyasla dramatik bir şekilde artmıştır. 20 µg total protein jelde koşturuldu. Anti-VEGF ve anti-β-aktin antikorları kullanılarak Western Blot yöntemi ile analiz edildi. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

Şekil 2: Preeklampitik plasentada vimentin ekspresyonu normal plasentaya kıyasla önemli bir oranda artmıştır. 20 µg total protein jelde koşturuldu. Anti-vimentin ve anti-β-aktin antikorları kullanılarak Western Blot yöntemi ile analiz edildi. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, preeklampitik plasentanın koryon villuslarında sinsityal düğüm, sinsityal ödem, kollajen lif artışı, sinsityal köprülerde heterokromatin ve büyük çekirdeklerde dejeneratif değişiklikler olduğunu saptadık. Ayrıca VEGF ve vimentin ekspresyon düzeylerinin preeklampitik plasentada normal plasentaya oranla artış gösterdiğini hem immunohistokimya hem de Western Blot yöntemleriyle gösterdik.

PE perinatal bakımdaki önemli ilerlemeye rağmen hala maternal ve fetal morbidite ve mortalitenin başlıca sebebi olmaya devam etmektedir [18]. Bu nedenle çalışmalar prediktif markır bulabilmek için PE patogenezinde rol alan olası faktörler üzerine yoğunlaşmıştır. VEGF endotel hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerinde stimule edici bir etkiye sahip olan güçlü anjiogenik bir faktördür [19]. VEGF plasentanın gelişim sürecindeki anjiogenezde ve uterin damarlarının remodellenmesinde majör bir role sahip olduğu için uzun süreden beri PE patogenezinde araştırma konusu olmuş ve plasentanın vaskülürizasyonuna yardımcı olan sitotroblastik invazyon sırasında kritik bir öneme sahip olduğu gösterilmiştir [20,21].

VEGF' nin PE patogenezindeki rolü üzerine birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, PE' de VEGF ekspresyonu hala tartışmalı bir konudur. Birçok yayın PE sonucu PE' li hastaların serumunda veya plasentalarında VEGF düzeyinin azaldığını gösterirken [22,23], bunun aksi olarak bazı yayınlar ise PE' li hastaların serum ve plasentalarında VEGF düzeylerinin arttığını ifade etmektedir [24,25]. Bizde bu çalışmada hem immunohistokimya hem de Western Blot sonuçlarımıza göre VEGF ekspresyon düzeyinin preeklampitik plasentalarda normal plasentalara oranla daha fazla olduğunu gözlemledik.

Daha önce yapılan immunohistokimyasal bir çalışmada bizim sonuçlarımızla uyumlu bir şekilde preeklampitik plasentadaki VEGF ekspresyonunun normal plasentadan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [24]. Sonuçlarımızla uyumlu bir şekilde VEGF mRNA ekspresyon düzeyinin de yine preeklampitik plasentada normal plasentaya oranla daha yüksek olduğu rapor edilmiştir [25]. Başka bir çalışma preeklampitik kadınların serumunda VEGF reseptör-1 (VEGFR-1) düzeylerinin kontrol grubundan daha

fazla olduğunu açıklamıştır [26]. Yakın bir zamanda yapılan bir çalışmada da aynı şekilde şiddetli PE' li hastaların serumundaki VEGF miktarının kontrole kıyasla önemli derecede yüksek olduğu rapor edilmiştir [27]. Plasental hipoksiye yanıt olarak VEGF sistemi aktive olur [28]. Plasental hipoksiye yanıt olarak artmış olan VEGF' nin PE patogenezi süresince fonksiyonel olmadığı ve ligand-reseptör arasındaki bağlanma (VEGF-VEGFR) bozulduğu için preeklampitik plasentada serbest miktardaki VEGF miktarının artış gösterdiği ve endotel hücre hasarı sonucu vasküler fonksiyonun bozulduğu olası mekanizmadır. PE patogenezi kompleks bir moleküler mekanizmaya dayandığı için fonksiyonel olmayan VEGF artışının PE patogenezinde yetersiz plasental anjiogenez neden olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, preeklampitik plasentalarda vimentin ekspresyonunun normal plasentalara oranla artış gösterdiği ve vimentinin plasental kök villusları damarlarının etrafında artan konsantrik tabakalar şeklinde düzenlendiği gösterildi. Bu sonuç bize PE' nin vimentin ekspresyonunun stimule ettiğini göstermektedir. Vimentinin PE patogenezindeki rolü üzerine yapılan direk bir çalışma olmamasına rağmen, vimentinin trofoblast invazyonu için gerekli olduğu bilinmektedir [16,17]. Yapılan bir çalışmada embriyonik gelişim sürecinde sıçan vasküler trofoblast hücrelerinde artış gösteren vimentinin embriyonik vasküler sistemin büyümesi ve gelişmesinde rol olan faktörler (VEGF/VEGFR1) ile immünopozitif reaksiyon gösterdiği açıklanmıştır [29]. Başka bir çalışmada sıçan glioma modelinde hipoksi sonucu VEGF miktarındaki artışla vimentin miktarındaki artışın pozitif korele olduğu ve vimentinin vasküler permeabilitede rol aldığı rapor edilmiştir [30]. Bizim de çalışmamızda preeklampitik plasentanın kan damarlarının etrafında gözlenen vimentin ekspresyonundaki artışın vasküler permeabilitenin azalmasına neden olabileceğini işaret etmektedir.

Sonuç olarak; bu çalışmada VEGF ve vimentin' nin PE patogenezindeki rolü araştırıldı. VEGF vimentin ekspresyon düzeylerinin preeklampitik plasentada normal plasentaya oranla yüksek olduğu tespit edildi. Vimentin ve VEGF miktarının preeklampitik plasentada pozitif korele bir şekilde artış göstermesinin her iki proteininde trofoblast invazyonu, anjiogenez ve vasküler permeabilitede birlikte rol aldığını işaret etmektedir. PE patogenezinde

VEGF ve vimentinin plasental gelişim sürecinde özellikle hangi moleküler mekanizmada birlikte rol aldığını açıklayacak daha fazla çalışmaya gerek duyulmaktadır.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma her hangi bir fon tarafından desteklenmemiştir.

Declaration of Conflicting Interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Financial Disclosure: No financial support was received.

KAYNAKLAR

- American College of Obstetricians and Gynecologists. Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol* 2013;122:1122–31.
- Stegers E, Von Dadelszen P, Duvekot J, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet* 2010;376:631–44.
- Saleh L, Verdonk K, Visser W, et al. The emerging role of endothelin-1 in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2016; DOI: 10.1177/1753944715624853.
- Sak S, Erdemoğlu M, Ağaçayak E, et al. Evaluation of serum Troponin I Levels in preeclampsia. *Dicle Med J* 2015;42:186–91
- Verdonk K, Visser W, Van Den Meiracker A, Danser A. The renin–angiotensin–aldosterone system in pre-eclampsia: the delicate balance between good and bad. *Clin Sci (Lond)* 2014;126:537–44.
- Maynard S, Epstein F, Karumanchi S. Pre-eclampsia and angiogenic imbalance. *Annu Rev Med* 2008;59:61–78.
- Valentin K, Hinze C, Schmidt-Ott KM. The basal chorionic trophoblast cell layer: An emerging coordinator of placenta development. *Bioessays* 2016;38:254–65.
- Davies JE, Pollheimer J, Yong HEJ, et al. Epithelial-mesenchymal transition during extravillous trophoblast differentiation. *Cell Adh Migr* 2016; DOI: 10.1080/19336918.
- Patel A and Dash PR. Formation of atypical podosomes in extravillous trophoblasts regulates extracellular matrix degradation. *Eur J Cell Biol* 2012;91:171–9.
- Lyall F, Robson SC, Bulmer JN. Spiral artery remodeling and trophoblast invasion in preeclampsia and fetal growth restriction: relationship to clinical outcome. *Hypertension* 2013;62:1046–54.
- Chaiworapongsa T, Chaemsathong P, Yeo L, Romero R. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol* 2014;10:466–80.
- Zhou Y, Damsky CH, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? *J Clin Invest* 1997;99:2152–64.
- Lee ES, Oh MJ, Jung JW, et al. The levels of circulating vascular endothelial growth factor and soluble Flt-1 in pregnancies complicated by preeclampsia. *J Korean Med Sci* 2007;22:94–8.
- Procopciuc LM, Caracostea G, Zaharie G, Stamatian F. Maternal/newborn VEGF-C936T interaction and its influence on the risk, severity and prognosis of preeclampsia, as well as on the maternal angiogenic profile. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2014;27:1754–60.
- Kalay S, Cakcak B, Oztekin O, et al. The role of VEGF and its soluble receptor VEGFR-1 in preterm newborns of pre-eclamptic mothers with RDS. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013;26:978–83.
- Shirakawa T, Miyahara Y, Kenji Tanimura K, et al. Expression of Epithelial-Mesenchymal Transition-related Factors in Adherent Placenta. *Int J Gynecol Pathol* 2015;34:584–9.
- Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta* 2009;1796:75–90.
- Cantwell R, Clutton-Brock T, Cooper G, et al. Saving mothers' lives: reviewing maternal deaths to make motherhood safer: 2006–2008. The Eighth Report of the Confidential Enquiries into Maternal Deaths in the United Kingdom *BJOG* 2011;118:1–203.
- Sezer SD, Küçük M, Döğer FK, et al. VEGF, PlGF and HIF-1 α in placentas of early- and late-onset pre-eclamptic patients. *Gynecol Endocrinol* 2013;29:797–800.
- Vuorela P, Hatva E, Lymboussaki A, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta. *Biol Reprod* 1997;56:489–94.
- Anthony FW, Evans PW, Wheeler T, et al. Variation in detection of VEGF in maternal serum by immunoassay and the possible influence of binding proteins. *Ann Clin Biochem* 1997;34:276–80.
- Kupfermine MJ, Daniel Y, Englender T, et al. Vascular endothelial growth factor is increased in patients with preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* 1997;38:302–6.
- Livingston JC, Chin R, Haddad B, et al. Reductions of vascular endothelial growth factor and PGF concentrations in severe pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:1554–57.
- Akercan F, Cirpan T, Terek MC et al. The immunohistochemical evaluation of VEGF in placenta biopsies of pregnancies complicated by preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2008;277:109–14.
- Chung JY, Song Y, Wang Y, et al. Differential expression of VEGF, EG-VEGF, and VEGF receptors in human placentas from normal and pre-eclamptic Pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2484–90.
- Koga K, Osuga Y, Yoshino O, et al. Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1(sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2348–51.
- Kurtoglu E, Avci B, Kokcu A, et al. Serum VEGF and PGF may be significant markers in prediction of severity of preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016; 29: 1987–92.
- Trollmann R, Amann K, Schoof E, et al. Hypoxia activates the human placental vascular endothelial growth factor system in vitro and in vivo. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:517–23.
- Andrade-Scherholz PL, Cristina de Souza P, Spadacci-Morena DD, Godosevicus Katz S. Vimentin is synthesized by mouse vascular trophoblast giant cells from embryonic day 7.5 onwards and is a characteristic factor of these cells. *Placenta* 2003;34:518–25.
- Woolf EC, Curley KL, Liu Q, et al. The ketogenic diet alters the hypoxic response and affects expression of proteins associated with angiogenesis, invasive potential and vascular permeability in a mouse glioma model. *PLoS ONE* 2015;10: e0130357. doi:10.1371/journal.pone.0130357.