

Epidermal Growth Faktör Reseptörlerin (EGF-R) Erişkin ve Yenidoğan Pankreas Dokularındaki Dağılımının İmmunohistokimyasal Olarak Belirlenmesi

IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR IN ADULT AND NEWBORN PANCREAS

Gülçin ABBAN*, Müfide GÖRGÜN**, Deniz ERDOĞAN**

* Öğr.Gör.Dr., Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD, DENİZLİ

** Prof.Dr., Gazi Üniversitesi Tıp.Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD, ANKARA

Özet

Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor, EGF) polipeptid yapısında olup hücre yüzeyinde bulunur. EGF, EGF reseptörlerine bağlanarak hücrel olayları düzenler. Bu çalışmada EGF reseptörlerinin normal erişkin ve yeni doğan pankreas dokusunda tanımlanmasının ve bu dokulardaki dağılımlarının tam olarak belirlenmesinin önemli olacağı düşünüldü.

Erişkin ve yeni doğan Epidermal Growth Faktör reseptörlerinin dağılımını tanımlamak ereğiyle Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalından sağlanan biyopsi ve otopsi materyalleri kullanıldı.

Erişkin ve yeni doğan pankreas dokularında EGF reseptörlerinin dağılımı immünohistokimyasal yöntemlerle ışık mikroskobu düzeyinde incelendi. Bu erekle elde edilen doku kesitlerine avidin biotin immünohistokimyasal tekniği uygulandı.

EGF reseptörleri normal erişkin pankreas dokusunda, asinar hücrelerde ve Langerhans adacık hücrelerinde tanımlandı. Kanalları döşeyen epitel hücresi negatif immün boyanma gösterirken, kanalları çevreleyen bağ dokusu pozitif boyanma gösterdi. Yeni doğan pankreasında da asinar hücreler, Langerhans adacık hücreleri pozitif boyandı. Kanal epitel hücreleri bu grupta da negatif immün reaksiyon gösterdi

EGF-R her iki grupta da asinar hücrelerde ve Langerhans adacığında belirlendi. Yeni doğan Langerhans adacığındaki boyanma erişkin gruba göre daha fazla idi. Adacık hücrelerinde çoğalmanın ve farklılaşmanın devam ettiğini bu nedenle reseptörlerin bu bölgede daha fazla reaksiyon verdiğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Pankreas, Epidermal Growth Faktör (EGF) Reseptör, İmmunohistokimya

Summary

Epidermal Growth Factor (EGF) is a mitogenic polypeptide that binds to the EGF receptors and regulates a variety of a cellular processes. EGF makes its activity by binding to its receptors on the cell surface.

We aimed in this study to examine the distribution of EGF receptors in adult pancreas and newborn pancreas by immunohistochemistry under the light microscope. Tissues were obtained by surgical operations and autopsies at Gazi University Hospital.

Tissues samples were fixed in neutral formaline. The avidin – biotin technique with polyclonal antibodies was performed to demonstrate EGF-R localisation in these tissues.

Exocrine pancreas and pancreatic islets showed EGF receptor immunoreactivity while pancreatic ducts were nonreactive in the adult pancreas. However, connective tissues which were around the pancreatic ducts showed positive immunostaining. In newborn pancreas, EGF receptor immunostaining resembled to those observed in the adult pancreas but, a slightly stronger staining in Langerhans islets. This result was related with the maturation of Langerhans islets after birth.

Key Words: Pancreas, Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor, Immunohistochemistry

T Klin J Med Sei 2002, 22:471-478

T Klin Tıp Bilimleri 2002, 22:471-478

Büyüme faktörlerinden olan epidermal growth faktör ilk kez 1962 yılında S. Cohen tarafından erkek farelerin submandibular bezinden elde edilmiştir (1,2). S.Cohen Sinir Büyüme Faktörü, Nerve Growth Faktörü (NGF) izole etmek üzere çalışmalar yaparken bezlerden hazırladığı ekstrenin NGF'den farklı etkide bulunduğunu gözlemiştir. Bunu yeni doğan farelere her gün enjekte ettiğinde göz kapaklarının erken açıldığını, dişlerin erken patladığını

saptamıştır. Daha sonraki çalışmalarında bu etken maddeyi izole etmiş ve bunun epidermin gelişimini hızlandırdığını saptamıştır. Bu etken maddeye Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Faktör , EGF) adını vermiştir (1).

EGF 53 aminoasitli olup alanin, fenil fenilalanin ve lizin dışında tüm aminoasitleri bünyesinde bulundurur. Molekül ağırlığı 6040 daltondur. Epidermal ve mezotelyal hücrelerde mitojenik özelliğe sahiptir. İdrarda, mide ve

pankreas sıvısında, seminal sıvıda, prostat sıvısı, süt ve kanda bulunmaktadır. Aynı zamanda çok çeşitli dokularda varlığı saptanmıştır (1-4).

EGF hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanarak işlev yapar (3,4). EGF reseptörleri ilk kez O'Keefe ve arkadaşları tarafından çeşitli memeli dokularından hazırlanmış hücre zarı parçacıklarında belirlenmiştir. Triton-100 çözücüsü ve agaroz içeren kromatografi kullanılarak, EGF reseptörü ilk olarak yine Dr. Cohen tarafından izole edilmiştir (5,6). Bu reseptörler kan hücreleri dışında çok geniş hücre ve dokularda tanımlanmıştır. Yüksek bağlama kapasiteli reseptörler fibroblastlarda, kornea ve lenste, ince bağırsak epitelinde, glia hücrelerinde gösterilmiştir (7-10).

EGF reseptörünün molekül ağırlığı 170.000 daltondur. Reseptörde bulunan tirozin özgün protein kinaz aktivitesi gösterir. Tirozin kinazlar ile tirozinin fosforilasyonu mitojenler tarafından başlatılan ilk intrasellüler sinyaldir (6).

Büyüme faktörlerinin hücre çoğalmasında ve farklanmasında önemli rol oynadıkları pek çok çalışmada belirtilmiştir. Normal dokularda çoğalma ve farklanma, çok yönlü olarak büyüme faktörlerin kontrolü altındadır. Son yıllardaki araştırmalarda yara iyileşmesinde ve karsinogenezde de büyüme faktörlerin etkili oldukları gösterilmiştir. Bununla birlikte, bazen işlem kontrolden çıkmakta ve sonuçta tümör dokuları oluşmaktadır (13-17).

Fötal ve erişkin dokularda EGF reseptörlerinin varlığını belirlemeye yönelik çalışmalar sürdürülmektedir (18-20). Bu çalışmada EGF reseptörlerinin normal erişkin ve yeni doğan pankreas dokusunda tanımlanmasının ve bu dokulardaki dağılımlarının tam olarak belirlenmesinin önemli olacağı düşünüldü. Bunun için yeni doğan ve erişkin EGF reseptörlerinin dağılımları immünohistokimyasal yöntemlerle saptanmaya çalışıldı. Işık mikroskobu düzeyinde elde edilen sonuçlar karşılaştırılmalı olarak değerlendirildi.

Gereç ve Yöntem

Erişkin ve yeni doğan Epidermal Growth Faktör reseptörlerinin dağılımını tanımlamak ereğiyle Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalından 20 biyopsi ve 20 otopsi örnekleri sağlandı. Biyopsi ve otopsi materyallerine indirekt (iki aşamalı) immün boyama yöntemi uygulandı. Bu erekle elde edilen doku kesitlerine uygulanan primer antikor antijene tutundu. Daha sonra biyotinlenmiş sekonder antikor bu komplekse bağlandı. Bundan sonra ortama substrat DAB (diominobenzidin) eklenerek gereken gözle görülebilir ürün ortaya kondu.

Dokuların Elde Edilmesi:

Normal erişkin pankreas dokusu Patoloji Laboratuvarına diagnostik karar için gönderilen ve normal

raporu alan biyopsi örneklerinden sağlandı. Yeni doğan pankreas dokusu ölü doğumlar nedeniyle yine aynı laboratuvara gönderilen otopsi örneklerinden elde edildi.

İmmünohistokimyasal Yöntem:

Pankreas dokuları nötral formalinle tesbit edildi. Dokulara alışılagelmiş ışık mikroskop takip yöntemi uygulandı ve dokular parafine gömüldüler. Daha sonra 4.5 µm kalınlığında kesitler önceden polilizinle kaplanmış lamlara alındı.

İmmün boyamada kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada EGF reseptörlerini immünohistokimyasal olarak belirleyebilmek için Oncogene Research Production EGF reseptör kit kullanıldı. (Cat HCS16, Lot, DO1460)

■ Primer antikor (AB-4 Polyclonal Rabbit IgG, Cat = PC19, Lot#799501- 1 Oncogene Research Primer antikor) PBS içinde dilue edildi. Sulandırma 1:40 (Khadija Hornietal 1994)

■ Bloking Serum (Normal Tavşan IgG, Lot=962207, Cat=N101) 1ml. PBS içine 1 damla bloking serum eklenmesiyle elde edildi.

■ Biotinlenmiş sekonder antikor (Anti Tavşan Total Ig, Lot = A 1566). 1ml PBS içine 1 damla biyotinlenmiş sekonder antikor eklenerek hazırlandı.

■ ABC solüsyonu

A (Lot = A 1565) 1 damla A solüsyonu 1ml PBS içine damlatıldı ve karıştırıldı, aynı solüsyon içine 1 damla B solüsyonu (Lot= A 1563) damlatıldı ve karıştırıldı.

■ Sponin: (Lot= 960815) Distile su ile 1:40 oranında dilue edildi.

■ DAB: (Lot = A 1553) 1 tablet DAB 20 ml PBS/%0.3 H₂O₂ içinde çözüldü. Taze olarak kullanıldı.

Fosfat buffer solüsyon (PBS)= 8 g NaCl, 0.24 g. 0.2 g KCl, 1.44 g.

N₂HPO₄ KH₂PO₄, 800ml distile suda çözüldü. pH'nın 7.4 olması için ortama HCl eklendi. Tekrar bir litre distile su eklenerek PBS solüsyonu elde edildi.

Boyama Yöntemi:

Kesitler, ksilolde 3 kez 5'er dakika tutuldu. Sonra %100 alkolde 10 dakika %95 alkolde 10 dakika bekletildi. Distile suda yıkandı. %0.1 H₂O₂ de 30 dakika bekletildi.

Distile suda yıkandı. Antijenik belirtilerin maskelenmemesi için saponin ile 30 dakika inkübe edildi. İmmüoglobulinlerin özgül olmayan bağlamalarını engellemek için bloking serumda 20 dakika bekletildi. PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Primer antikor ile +4°C'de 1 gece süresince inkübe edildi. PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Sekonder antikor ile 30 dakika inkübe edildi. PBS

Tablo 1. Erişkin ve yenidoğan pankreas dokusunda mikrofotografik alanlara özgü farklı bölgelerde EGF reseptörlerinin tanımlanması

	Erişkin Pankreas Dokusu	Yenidoğan Pankreas Dokusu
Asinar hücre	++*	++
Asinar apikal sitoplazması	++**	++
Asinar hücre apikal zarı	+++	+
Asinar hücre bazal sitoplazması	-	-
Asiner hücre bazal zarı	++	++
Sentroasinar hücre	+	+/-
İntralobüler salgı Kanalı	-	-
İnterlobüler salgı Kanalı	-	-
Bağ dokusu	++	++
Langerhans adacığı kenar bölge hücreleri	++	+++
Langerhans adacığı orta bölge hücreleri	+	+++
Sinuzoit duvarı	+++	+++
Septalar	+++	+++

*Boyanma daha yoğun

ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. ABC solüsyonu ile 30 dakika inkübe edildi. 3 kez PBS ile yıkandı. DAB solüsyonu ile 1-3 dakika arasında inkübe edildi. Distile su ile yıkandı. Zıt boyama için hematoksilin (Harris) ile 2 dakika boyandı. Distile su ile yıkandı. %95 alkolde 2 kez 10'ar dakika bekletildi. %100 alkolde 2 kez 10'ar dakika kaldı. Ksilolden 2 kez 10'ar dakika geçirildi. Yapıştırıcı solüsyonla kesitler lamelle kapatılıp ışık mikroskopunda incelendi ve resimleri çekildi.

Boyanmanın değerlendirilebilmesinde aşağıdaki skala kullanıldı.

(-) : Boyanma yok

(/+/-) : Çok zayıf boyanma

+

 : Zayıf boyanma

++

 : Orta boyanma

+++

 : Kuvvetli boyanma

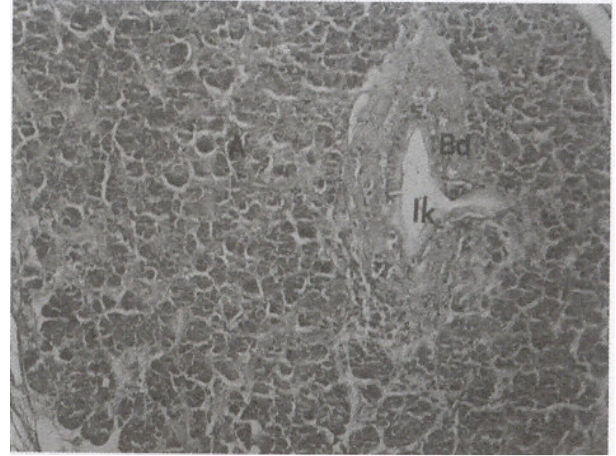
Bulgular

Erişkin ve yeni doğan pankreas dokularında epidermal growth faktör (EGF) reseptörlerinin dağılımı immünohistokimyasal yöntemlerle ışık mikroskopu düzeyinde incelendi.

Erişkin insan pankreas dokusu

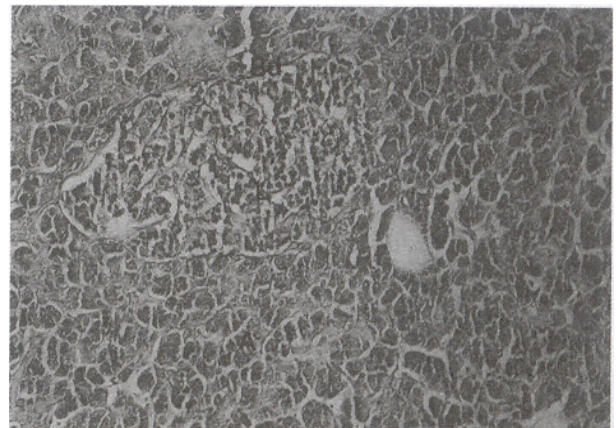
EGF reseptörleri normal erişkin pankreas dokusunda, asinar hücrelerde ve Langerhans adacıklarında tanımlandı (Şekil 1-6). Asinar hücrelerde immün boyanma hücrenin apikal zarında ve sitoplazmasında granüller şeklinde izlenirken, bazal sitoplazmanın boyanmaması dikkati çekiyordu. Ancak bazal hücre zarında yoğun pozitif boyanma gözlemlendi (Şekil, 3-5).

Büyük büyültmeli resimlerde, salgılama anında olan



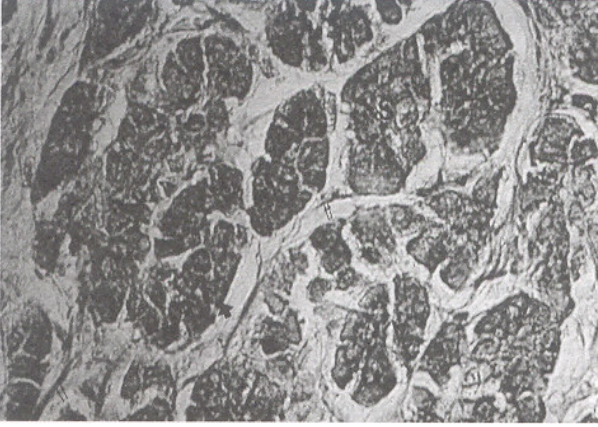
Şekil 1. Normal erişkin pankreas dokusundan bir görünüm. Asinar hücre (A), Interlobüler kanal (Ink), Kanal çevresini saran bağ dokusu (Bd).

(İmmünperoksidaz, Hematoksilin, X200)



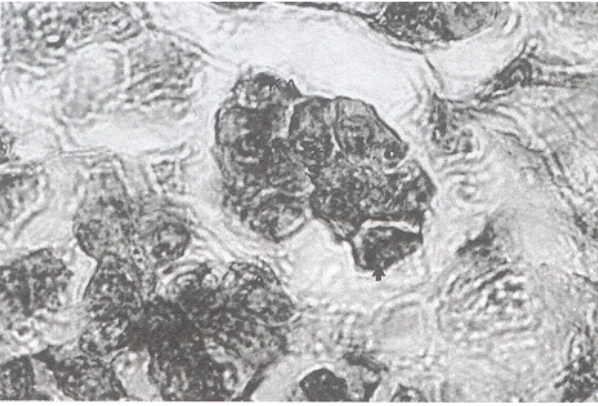
Şekil 2. Aynı gruptan bir diğer kesit. Asinar hücre (A), Langerhans adacığı (L), Langerhans adacığını çevreleyen pozitif reaksiyon gösteren bağdoku (Bd).

(İmmünperoksidaz, Hematoksilin, X200)



Şekil 3. Aynı gruptan daha büyük büyültmede asinar hücreler (A), hücrenin apikal zarındaki ve sitoplazmasındaki pozitif boyanma (*), bazal hücre zarı (kalın ok), sentroasinar hücreler (S), asinar hücreler arasında pozitif reaksiyon gösteren septumlar (çift ok).

(İmmünperoksidaz, Hematoksilen, X400)



Şekil 4. Erişkin pankreasından daha büyük büyültmede bir görünüm. Asinar hücreler (A), zayıf reaksiyon gösteren asinar hücreler (ZA), çekirdek; (Ç), pozitif boyanan hücre apikali (*) ve bazal hücre zarı (kalın ok), sentroasinar hücre (S), septumlar (çift ok).

(İmmünperoksidaz, Hematoksilen, X1000)

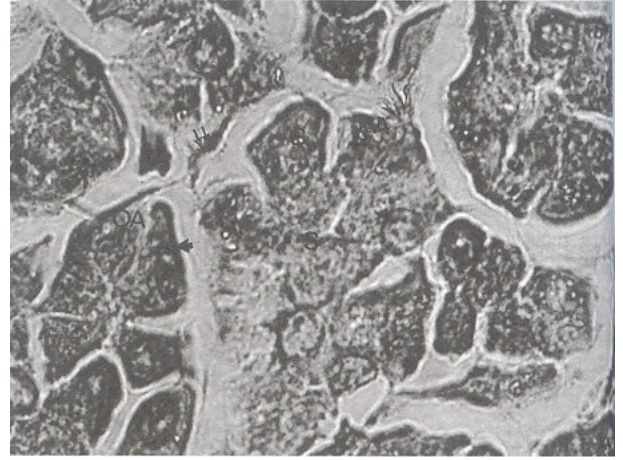
asinar hücrelerde boyanma, salgılamasını yapıp yeniden sentez aşamasına geçen hücrelere karşın pozitifliği (Şekil 4,5). Kesitlerde asinar hücreler, zayıf, orta ve yoğun boyalı olarak üç şekilde izleniyordu. (Şekil 4,5). Sentroasinar hücrelerde, asinar hücre fizyolojisine koşut az, orta ve koyu olmak üzere 3 tip boyanma gösterdi (Şekil 4,5).

Langerhans adacıklarında çevresel yerleşim gösteren hücrelerdeki reaksiyon, orta bölgede yerleşim gösterenlere karşın daha pozitifliği (Şekil 6).

Bu grupta, pankreasın interlobüler kanallarında immünreaksiyon negatif olarak tanımlandı (Şekil 1). Kanalları çevreleyen bağ dokusunda zayıf bir boyanma izlendi (Şekil 1). Bununla birlikte, Langerhans adacığını asinar hücrelerden ayıran bağ dokusunda, adacık içindeki sinüzoidlerde ve asinüsler arasındaki septumlarda da pozitif immün boyanma ilgi çekiciydi (Şekil 6).

Yenidoğan Pankreas Dokusu:

Yenidoğan pankreas dokusunda, tüm yapılar erişkindeki şeklini almıştı (Şekil 7). Genel olarak Langerhans adacıklarında ve asinar hücrelerde pozitif



Şekil 5. Aynı gruptan bir diğer görünüm. Orta derecede immünreaksiyon gösteren asinar hücreler (OA), zayıf reaksiyon gösteren asinar hücreler (ZA), pozitif boyanan hücre bazalı (kalın ok), sentroasinar hücre (S), Septumlar; (çift ok).

(İmmünperoksidaz, Hematoksilen, X1000)

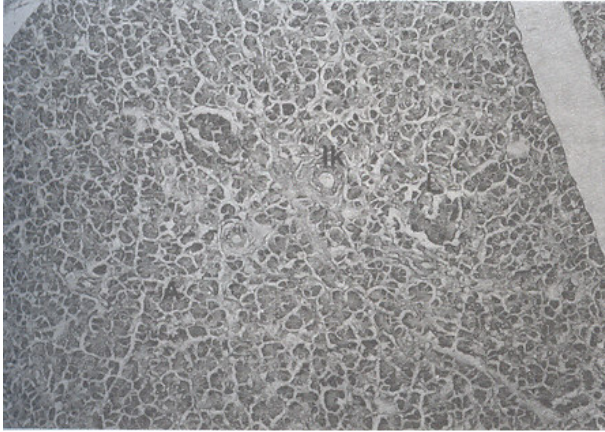


Şekil 6. Aynı gruptan büyük büyültmede Langerhans adacığı (L) görülüyor. Adacık çevresinde yerleşim gösterip daha koyu boyanan hücreler; (ince ok), Ortada yerleşim gösteren ve daha zayıf immün boyanma gösteren hücreler (ok başı), adacığı çevreleyen bağ dokusu (Bd) ayırdediliyor.

(İmmünperoksidaz, Hematoksilen, X1000)



Şekil 7. Yenidoğan pankreas dokusundan bir görünüm. Asinar hücreler (A), Langerhans adacığı (L), intralobüler kanal (Ik). (İmmünperoksidaz, Hematoksilen, X40)



Şekil 8. Aynı gruptan Asinar hücreler (A), oldukça yoğun pozitif boyanma gösteren Langerhans adacığı (L), negatif boyanan intralobüler kanal (Ik) izleniyor.

(İmmünperoksidaz, Hematoksilen, X100)

boyanma izlendi (Şekil 7-10). Ancak asinar hücrelerdeki reaksiyon Langerhans adacık hücrelerdekine göre zayıftı. (Şekil 10). Bu gruptaki boyanma erişkin pankreasıyla paralellik göstermekteydi. Langerhans adacık hücreleri, erişkin Langerhans adacık hücrelerine karşın daha kuvvetli boyanmıştı. Asinar hücrelerde boyanmanın daha zayıf olduğu belirlendi (Şekil 10,11).

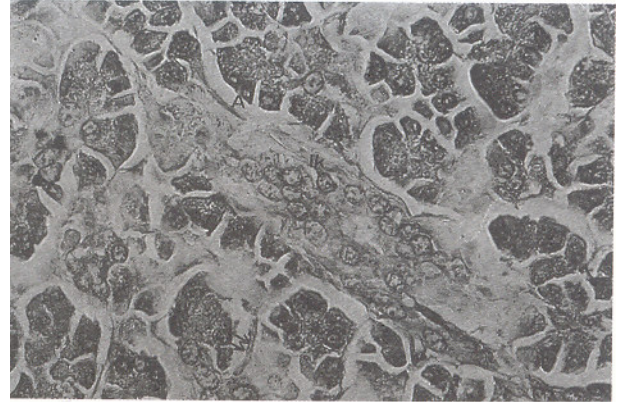
Sentroasinar hücrelerde de zayıf immün boyanma gözlemlendi. Bu grupta da bazal hücre zarında ve Langerhans adacığını çevreleyen bağ dokusunda pozitif boyanma dikkati çekti (Şekil 9-11), kanallar negatif boyanmıştı (Şekil 9). Kanalları çevreleyen bağ dokusu ve asinar hücreler arasındaki septumlar da pozitif immünreaksiyon sergiliyordu (Şekil 9-11).

Tartışma ve Sonuç

Epidermal Growth Faktör (EGF) reseptörü 170kD molekül ağırlığında olup hücre yüzeyinde bulunur (1,6). EGF, EGF reseptörlerine bağlanarak mitojenik olayları başlatır (22). Bu bağlanmaya koşut tirozin kinazın otofosforilasyonu gerçekleşir (23).

EGF + EGF reseptörleri hücre gelişiminin düzenlenmesinde ve farklanmasında önemli işlev görürler (24). EGF reseptörleri birçok dokunun hücre yüzeyinde tanımlanmış olmakla birlikte, bazı yayınlarda hücre içinde de yerleşik olabilecekleri bildirilmektedir (25).

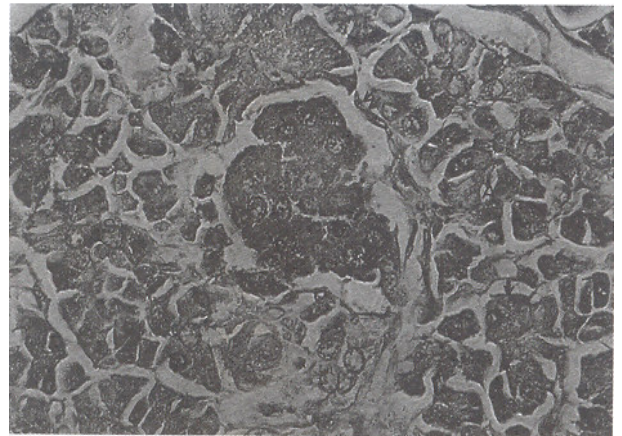
Bu çalışmada EGF reseptörlerinin normal erişkin ve yeni doğan pankreas dokusunda tanımlanmasının ve bu dokulardaki dağılımlarının tam olarak saptanmasının önemli olacağı düşünüldü. EGF reseptörü avion



eritroblastosis virüs oncogen V-erb ile homologdur (26).

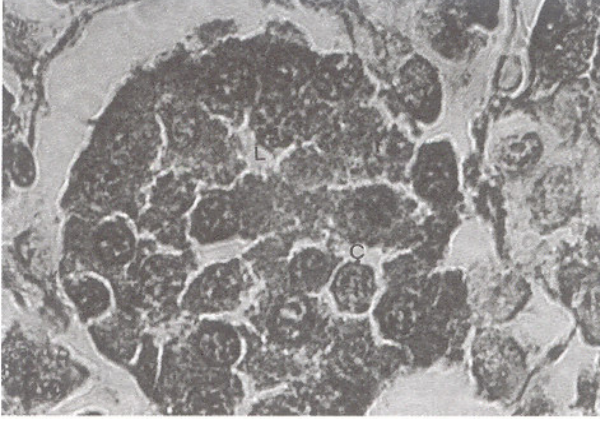
Şekil 9. Aynı gruptan asinar hücreler (A), negatif boyanma gösteren intralobüler kanal (Ik), asinar hücrede apikal bölgedeki pozitif reaksiyon (*), pozitif boyanan bazal hücre zarı (kalın ok) ve asinuslar arasındaki septumlar (çift ok) belirgin.

(İmmünperoksidaz, Hematoksilen, X400)



Şekil 10.Yenidoğan pankreas dokusunda Langerhans adacığı (L), asinar hücreler (A), çekirdek (Ç), sentroasinar hücre (S), asinar hücreler arasındaki septumlar (çift ok), bazal hücre zarı (kalın ok).

(İmmünperoksidaz, Hematoksilen, X400)



Şekil 11. Aynı gruptan büyük büyültmede, pozitif reaksiyon gösteren Langerhans adacığı (L), çekirdek (C).

(İmmünperoksidaz, Hematoksilen, X1000)

V-erb B oncogeni ile EGF reseptörünün protooncogen C-erb' den üretildiği savunulmaktadır (27).

Domjonow ve arkadaşları (24), deri (epidermis, dermis, kıl follikülü), meme bezi, kolon, karaciğer, pankreas, testis, epididimis, endometrium ve tiroid gibi pek çok dokuda EGF reseptörlerini immünohistokimyasal olarak tanımlamışlardır. Çalışmada pankreas kanal hücreleri, asinar hücreler ve Langerhans adacıkları ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Sonuçta pankreas kanal hücrelerinde ve asinar hücrelerinde sitoplazmik granüller şeklinde immün boyanma gözlenmiş, adacık hücrelerinde ise herhangi bir reaksiyon saptanmamıştır .

Bir diğer çalışma da Vaughan ve arkadaşları (28) tarafından domuz böbreği ve pankreasında, EGF reseptörlerini tanımlanması ereğiyle yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda yalnızca asinar hücrelerin reaksiyon verdiği görülmüştür.

Kajikawa ve arkadaşları (29) EGF ve EGF reseptörlerini immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak çeşitli dokularda belirlemeye çalışmışlardır. Radioimmünasseye ölçülen EGF'nin pankreastaki miktarı diğer dokulara karşın oldukça az bulunmuştur. İmmünperoksidaz yöntemiyle belirlenen EGF reseptörleri bazı asinar hücrelerde tanımlanabilmiştir. Kanallarda ve Langerhans adacığında pozitif immün boyanma izlenmemiştir .

Bir diğer çalışmada ergin sıçanların pankreas dokusunda EGF reseptör alanları otoradyografik olarak ışık mikroskopuyla gösterilmiş. ¹²⁵I işaretli EGF, sıçanlara intravenöz olarak enjekte edilmiştir. Otoradyografik olarak asinar hücrelerde, interlobüler kanallarda ve Langerhans

adacık hücrelerinde EGF reseptörlerinin varlığı saptanmıştır (30).

Bu çalışmada yalnızca immünohistokimyasal yöntem kullanıldı. EGF reseptörleri immünperoksidaz yöntemiyle asinar hücrelerde ve Langerhans adacığında tanımlandı. Asinar hücrelerde immün boyanma apikal hücre sitoplazmasında ve apikal hücre zarında belirlendi. Önceki çalışmaların tümünde asinar hücrelerde boyanmanın olduğu bildirilmektedir (24,28,29,30). Pankreas kanalları çalışmaların çoğunda negatif boyanma göstermiştir (28,29). Bu çalışmada da kanallarda boyanma negatif olarak belirlendi. Otoradyografik çalışma (30) dışında, immünohistokimyasal olarak yapılan çalışmaların çoğunda Langerhans adacığında EGF reseptörleri belirlenememiştir (24,28,29). Oysa bizim çalışmamızda EGF reseptörleri Langerhans adacığında ve Langerhans adacığını çevreleyen bağ dokusunda belirgin olarak tanımlanmıştır.

Transforming Growth Faktör - α (TGF- α) ve EGF yapısal ve işlevsel açıdan birbirlerine çok benzeyen iki büyüme faktörüdür (31). EGF ve TGF α nın biyolojik yapısının %35'i homologdur. Bu büyüme faktörlerin her ikisi de çeşitli epitelyal ve mezenşimal hücrelerin farklanmasında ve çoğalmasında rol oynarlar. (1,6,32). İki büyüme faktörü de hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanarak işlev yaparlar.

Araştırmaların bir kısmında, EGF ve TGF- α nın, hücre yüzeyindeki aynı reseptöre bağlandığını bildirilmiştir (8,32). TGF- α da, EGF gibi onkogenik v-erb-B ile benzerlik gösterir. Derynck ve arkadaşları(18) 1987'de yayınladıkları bir çalışmada TGF- α nın, EGF'nin embriyonik bir versiyonu gibi işlev yapabiliyor olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu nedenle birçok çalışmada TGF- α ve EGF reseptörleri birlikte incelenmiştir.

Bunlardan biri 1994 yılında bir grup araştırmacı tarafından yapılmıştır (7). Bu çalışmada TGF- α ve EGF reseptörlerinin gelişimini immünohistokimyasal olarak, sindirim sistemi kanalı boyunca incelenmiştir. Araştırmada immünperoksidaz yöntemiyle EGF ve TGF α belirlenmeye çalışılmıştır. EGF primer antikoru olarak Ab:4 Pc19, TGF- α primer antikoru olarak Ab:2 GF10 onkogene science ürünü kullanılmış. Fötal dokular 9-10, 14-18, 22-24 haftalık spontan düşüklerden ergin dokular ise çeşitli nedenlerle operasyon geçiren hastalardan elde edilmiş. Çalışmadan şu sonuçlar çıkarılmıştır.

9-10 haftalık fötüslerin ekzokrin ve endokrin pankreas bölümleri tam olarak farklanmadığı için değerlendirmeye alınmamıştır. 14-18 haftalık fötüslerde, TGF- α yalnızca Langerhans adacıklarında orta derecede reaksiyon göstermiştir. 20-24 haftalık fötüslerde ise asinar hücreler, kanallar orta derecede, Langerhans adacıkları ise çok

kuvvetli olmamakla birlikte biraz daha pozitif boyanmıştır. EGF reseptörleri 14-18 haftalık dokulardaki asinar hücrelerde ve kanallarda negatif reaksiyon gösterirken Langerhans adacığında oldukça kuvvetli pozitif reaksiyon saptanmıştır. 20-24 haftalık fütüslerde ise EGF asinar hücrelerde zayıf, Langerhans adacıklarında kuvvetli, kanallarda ise çok zayıf şekilde reaksiyon vermiştir. Çalışmada erişkin pankreas dokusunda EGF reseptörleri tüm kesitlerde, adacık hücrelerinde kuvvetli, asinar hücrelerde ve kanallarda orta derecede boyanma göstermiştir (7).

Buna benzer bir diğer çalışma Oliver tarafından (23) yapılmıştır. Araştırma, yaşa bağlı olarak birçok dokudaki EGF reseptörlerinin gelişimini immünohistokimyasal olarak tanımlamak ereğiyle yapılmıştır. Dokular 14-19 haftalık düşük materyallerinden elde edilmiştir. Çalışmada pankreasla birlikte safra kesesi, kalp, böbrek, karaciğer, akciğer, deri, dalak, mide, tiroid gibi pek çok doku incelenmiştir. 17 haftalık fütüslerde asinar hücrelerde ve kanallarda oldukça zayıf bir reaksiyon izlenmiştir. Çalışmada endokrin pankreas dokusu değerlendirmeye alınmamıştır. 18. ve 19. haftalık fütüslerde ise asinuslarda daha kuvvetli reaksiyon olduğu bildirilmiştir.

1992 yılında Miettinen ve arkadaşları (32) pankreas adacık kültüründe TGF- α ve EGF reseptörlerini immünohistokimyasal olarak belirlemeye çalışmışlardır. Bu çalışmada da fetal dokular 13-21 haftalık düşük materyallerinden elde edilmiştir. Fetal pankreas dokuları. Kültüre edilen Langerhans adacıklarında EGF reseptörlerinin oldukça kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdiği saptanmıştır.

Fetal dokularla yapılan çalışmaların hemen tümünde EGF reseptörleri, 14.,15.,16. ve 17. haftalarda zayıf reaksiyon göstermekte olup 17. haftadan sonra bu reaksiyon kuvvetlenmektedir. Pankreasın endokrin ve ekzokrin kısmının tam olarak farkedildiği haftanın 17. hafta olduğu bildirilmektedir (8,32). EGF reseptörleri de bu gelişmeye koşut olarak 17. haftadan sonra açık şekilde belirlenebilmektedir.

Bizim çalışmamızda fetal pankreas dokusu kullanılmadı. 2 adet 36 haftalık, 1 adet 37 haftalık, 1 adet de 28 haftalık olmak üzere, doğduktan hemen sonra ölen bebeklerin pankreas dokuları, EGF reseptörleri açısından değerlendirildi. Langerhans adacıkları ve asinar hücreler pozitif immün boyanma gösterirken kanallarda herhangi bir reaksiyon belirlenemedi. Bu çalışmada, Langerhans adacığı asinar hücrelerden daha pozitif boyanma gösterdi. Bu grupta asinar hücrelerdeki boyanma erişkin gruba benzer ancak daha zayıftı. Langerhans adacığı ise daha pozitif boyanmıştı.

EGF-R her iki grupta da asinar hücrelerde ve Langerhans adacığında belirlendi. Yeni doğan Langerhans

adacığındaki boyanma erişkin gruba göre daha fazla idi. Adacık hücrelerinde çoğalmanın ve farkedilmesinin devam ettiğini bu nedenle reseptörlerin bu bölgede daha fazla reaksiyon verdiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Cohen S. Isolation of Mouse Submandibular Gland Protein Elevating Incisor Eruption and Eyelid Opening in the Newborn. *Animal J Biol Chem* 1962; 237,5:1555-62.
2. Cohen S. Epidermal Growth Factor, *Bioscience Reports* 198 ; 6: 1017-28.
3. Breyer JA and Cohen S. The EGF Precursor Isolated From Murine Kidney Membrane, *The Journal of Biological Chemistry*.1990; 265: 16564-70.
4. Cartilage SA. and Elder J.B. TGF α and EGF Levels in Normal Human Gastrin Testinal Mucosa, *Br J Cancer* 1989; 60, 657-660, (1989).
5. O'Keefe EJ, Pledger WJ. A Model of Cell Cycle Control Sequential Events Regulated by Growth. *Mol Cell Endocrinol* 1983; 167-86.
6. Carpenter G. Receptors for EGF and Other Polypeptide Mitogens. *Ann Rev Biochem* 1987; 56:881-914.
7. Hormi K, Lehy T. Developmental Expression of TGF- α and EGF Receptor Protein in the Human Pancreas and Digestive Tract, *Cell and Tissue Research* 1994; 278, 130-50.
8. Miettinen PJ, Otonkoski, T. and Voutilainen, R. Insulin Like Growth Factor - II and TGF- α in Developing Human Fetal Pancreatic Islets. *J of Endocrinology*. 1993; 138,127-36.
9. Yamanaka Y, Friess H. Coexpression of EGF Receptor and Ligands in Human Pancreatic Cancer is Associated with Enhanced Tumor Aggressiveness, *Anti-cancer-Res* 1993; 13,3: 565-9.
10. Chaudary A., Funa K and Obeng K. Expression of Growth Factor Peptides and Their Receptors in Neuroendocrine Tumors of the Digestive System, *Acta Oncologica* 1993; 32, 107-14.
11. Smith JJ, Derynck R., Korc M. Production of TGF- α in human pancreatic cancer cells. Evidence for a superagonist autocrine cycle, *Proc. Natl. Acad Sci* 1987; 84, 7567-70.
12. Wright, NA, Poulsem, R, Stamp, GW. EGF Induces Expression of Regulatory Peptides in Damaged Human Gastrointestinal tissues. *J Pathol* 1996; 162,4: 279-84.
13. Friess F, Yamanaka Y, Bucher M. Cripto a Member of the EGF Family is Over Expressed in Human Pancreatic Cancer and Chronic Pancreatitis. *Int J Cancer* 1994; 56,5: 668-74.
14. Fukuyama M, Ogawa M, Hayashi Y and Koike M. Development of Human Pancreas, *Differentiation* 1986; 31, 127-38.
15. Jensen CH, Krogh TN. Protein Structure of Fetal Antigen 1 (FA1) A Novel Circulations Human Relation to the Gene Products at dlk and pG2, *Eur-J- Biochem*, 1994; 225,1: 83-92.
16. Pratt RM. Role of EGF in embryonic development in current Topics in *Developmental Biology* 1987; 22, 75, (1987).
17. Savage CR, Ingani T., Cohen S. The primary structure of EGF, *The Journal of Biological Chemistry* 1972; 247, 7612-21 (1972).
18. Derynck R, Goeddel DV, Ullrich A. Synthesis of Messenger RNAs for TGF- α and β and the EGF Receptor by Human Tumors. *Cancer Research* 1987; 47, 707-12 (1987).
19. Das M. Epidermal Growth Factor: Mcehanism of Action. *Int Reviev of Cytology* 78, 1982; 233-46.

20. Korc M, Friess H, Yamanaka Y. Chronic Pancreatitis is Associated with Increased Concentrations of EGF Receptor, TGF- α and Phospholipase, Gut 1994; 35,10: 1468-73.
 21. John BD, Alan S. Histological technique 2. baskı, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1982.
 22. Morquaardt H, Hunkapiller MW, Hood LE. TGF type 1: Structure and Relation of EGF. Science 1984; 223, 1079-82.
 23. Oliver AM. Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Human Fetal Tissues is Age - Dependant, Brif. Cancer 1988; 58, 461-3.
 24. Domjonow I, Mildner B and Knowles BB. Immunohistokimyasal Localization of the EGF Receptor in Normal Human Tissues, Lab Inves 1986; 55-588.
 25. Ozowa, S., Ueda, M, Ando, M. EGF Receptors in Cancer Tissues of Esophagus, Lung, Pancreas, Colorectum, Breast and Stomach, Jpn. J Cancer Res 1988; 79,1201-07.
 26. Downword J, Yarden Y, Mayes E. Close Similarity of EGF Receptor and Verb B oncogene Protein Sequences. Nature 1984; 307, 521-7.
 27. Ullrich A, Coussens C, Hcyflick J. Human EGF receptor C DNA Sequence and Aberrant Expression of Amplified Gene in A431 Epidermoid Carcinoma Cells, Nature 1984; 309, 418-25.
 28. Vaughan TJ, Little Wood CJ. EGF Concentration in Pig Tissues and Body Fluids Measured Using a Homologs Radioimmunassay. J Endocrin 1992; 135, 1: 77-83.
 29. Kajikawa K, Yasut W, Sumiyoshi H, Ayhan A. Expression of EGF in Human Tissues, Virchows Archiv A Pathol Anat 1991; 418, 27-32.
 30. Chabot JC, Walker P, Pelletier G. Demonstration of EGF Binding Sited in The Adult Rat Pancreas by Light Mikroskopobic Autoradiography, Pancreas 1987; 2, 6: 653-7.
 31. Orsini B, Calabro A, Milani S. Localization of EGF / TGF- α Receptor in the Human Gastric Mukoza, Virchows Archiw A Pathol Anat 1993; 423, 57-63.
 32. Miettinen PJ and Heikinheimo K. TGF- α and İnsulin Gene Expression in Human Fetal Pancrease, Development 1992; 114, 833-40.
-
- Geliş Tarihi:** 23.11.2001
Yazışma Adresi: Dr.Gülçin ABBAN
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji AD
Kınıklı, DENİZLİ
gabban@pamukkale.edu.tr