

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörünün (EGFR) Horozların Üropigi Bezinde Immunohistokimyasal Yerleşimi

Berrin ZİK*

Geliş Tarihi: 29.06.2004

Kabul Tarihi: 10.08.2004

Özet: Epidermal büyüme faktörü (EGF), düşük moleküler ağırlıklı bir polipeptittir. Epidermal büyüme faktörü, reseptöre (EGFR) bağlanarak hücrelerde bölünme ve farklılaşmayı uyarır. Çalışma epidermal büyüme faktör reseptörünün hücre bölünme ve farklılaşmasının fazla olduğu üropigi bezindeki dağılımı ve reseptörün hücre içi yerleşim yerinin belirlenmesi amacıyla planlandı. Üropigi bezinden elde edilen parafin bloklara indirekt Avidin-Biotin Peroksidaz immunohistokimyasal yöntem uygulandı.

Çalışmada EGFR'nin, özellikle bezin bazal bölgesinde yer alan tubulusların bazal membran üzerine yerleşen hücrelerinde fazla, lumene doğru yer alan diğer hücrelerde ise, çok az eksprese olduğu, apikal bölgedeki tubulusların duvarını oluşturan tüm hücrelerde ise EGFR ekspresyonunun orta şiddette olduğu belirlendi.

Sunulan çalışmada bazal hücrelerde EGFR ekspresyonunun yüksek seviyede gözlenmesi bu hücrelerin sık mitoz aktivite gösterdiği, glikojen bölgesi olarak tanımlanan, apikal bölgedeki tüm hücrelerde EGFR ekspresyonunun orta şiddette olması, EGFR'nin bu hücrelere glukoz transportunda rol oynadığını akla getirmektedir.

Anahtar Sözcükler: Üropigi bezi, Epidermal büyüme faktör reseptör (EGFR), İmmunohistokimya.

Immunohistochemical Localization Of Epidermal Growth Factor Receptors (Egfr) In The Uropygial Glands Of Cockrell

Summary: Epidermal growth factor (EGF) is a low molecular weight polypeptide. EGF stimulates cell proliferation and differentiation by binding to its receptors (EGFR). The aim of the present study was to determine the distribution and intracellular localization of epidermal growth factor receptor (EGFR) in the uropygial gland in which cell proliferation and differentiation is present. We applied Labelled Avidin Biotin Peroxidase immunohistochemistry method to paraffin sections to show the localization of EGFR.

In this study, particularly, the basal cells, which lie on the basement membrane of the tubules in the basal region, showed the strongest expression, the other cells towards the lumen of the tubule showed slightly expression to the EGFR antibody. Medium EGFR expression was observed in all cells of the apical region.

According to our results, strong EGFR expression in the basal cells show that these cells are mitogenic. The medium EGFR expression in all of the cells of apical region which is known as glikojen region supposes us that EGFR may have effects on glucose transportation.

Key Words: Uropygial gland, Epidermal growth factor (EGFR), Immunohistochemistry.

Giriş

Üropigi bezi kanatlıların son sakrum omuru üzerinde, kuyruğun büyük dümen tüylerinin alt kısmında yer alan çift loblu holokrin bir bezdir.

Çoğu kanatlılarda bulunur, bazı ekzotik kuşlarda ise oldukça büyüktür¹⁻⁴. Bez yerleşim bölgesi ve büyüklüğünde farklılıklar olmasına rağmen, memelilerdeki yağ bezlerine benzer özelliklere sahiptir, ayrıca histolojik ve histokimyasal çalışma-

* U.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

larda üropigi bezinin memelilerin yağ bezlerinin karşıtı olduğu belirtilmiştir⁵⁻⁷. Bezin her bir lobu bağdoku ile sarılı ve lumene doğru uzanan pek çok tubulden oluşur. Bu tubullerin alt yarımı yağ bölgesi, lumene bakan üst yarımı ise glikojen bölgesi olarak tanımlanır¹. Her bir tubul, bazal membran üzerine yerleşmiş küçük yassı bazal hücrelerden, tubulün lumenine doğru yuvarlak çekirdekli, poligonal şekilde hücrelerden ve tubulün lumenine en yakın bölgede ise, daha büyük ve piknotik çekirdekli hücrelerden oluşur^{5,7,8}. Yağ bölgesindeki hücrelerde lipid sentezi, memeli hayvanların yağ bezlerinde olduğu gibidir ve lipid metabolizmasında aktif olan enzimler bol miktardadır⁹⁻¹¹. Glikojen bölgesindeki hücrelerde glikojen ve asit fosfatazın bulunduğu bildirilmektedir¹. Üropigi bezi ile ratların yağ bezlerinin androjene bağımlı bir yapısı olduğu ve üropigi bezinin, yağ benzeri bezler üzerine androjenlerin etkisini incelerken bir model olabileceği ileri sürülmüştür^{7,8}. Ayrıca üropigi bezinin androjenite için iyi bir marker olabileceği⁹, üropigi bezinde androjen reseptörlerinin yerleştiği¹² ve bu reseptörlerin konsantrasyonunun testosteron ile kontrol edildiği bildirilmiştir¹³.

Epidermal büyüme faktörü (EGF) ise, ilk olarak fare submandibular bezinde¹⁴ ve insan idrarında bulunan¹⁵, 53 aminoasitten oluşan tek zincirli bir polipeptiddir. EGF, hücre yüzeyine lokalize olan 170 kDa ağırlığında glikoprotein yapısındaki epidermal büyüme faktör reseptöre (EGFR) bağlanarak, hem in vivo hem de in vitro ortamdaki çeşitli hücreler üzerinde güçlü bir bölünme ve farklılaşma özelliğine sahiptir. İn vitro çalışmalarla, büyüme faktörlerinin yağ bezi hücreleri¹⁶⁻²¹, hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının çok görüldüğü derideki keratinositler²²⁻²⁴ üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca in vitro ortamda bildiricinin embriyolarının üropigi bezi hücrelerinde, epidermal büyüme faktörün etkisi incelenmiştir²⁵. Kaynaklarda memelilerdeki yağ bezlerine benzer özellikte olan üropigi bezinde EGFR ile yapılan in vivo immunohistokimyasal çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışma, hücre bölünmesi ve farklılaşmasında önemli rol oynayan epidermal büyüme faktör reseptörünün (EGFR), hücre bölünmesinin ve farklılaşmasının fazla olduğu üropigi bezindeki dağılımının ve reseptörün hücre içindeki yerleşiminin belirlenmesi amacıyla planlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırmada özel bir tavukçuluk işletmesinden alınan 10 adet 1 günlük yaşta Isobrown erkek civcivler kullanıldı. Civcivler 20 hafta süre ile UÜ Veteriner Fakültesi Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan araştırma kümeslerinde, normal rasyonla beslenerek, barındırıldı.

Erişkin döneme gelen horozların boyunları kesilip öldürüldükten hemen sonra üropigi bezleri çıkartıldı ve %10'luk formol-alkol solusyonunda tespit edildi. Daha sonra dokular rutin histoloji tekniğiyle yüzeye paralel olarak parafinde bloklandılar. Parafin bloklardan elde edilen 5-7 µm kalınlığındaki kesitlere indirekt Avidin-Biotin Peroksidaz immunohistokimyasal yöntemi uygulandı²⁶.

Immunohistokimyasal prosedür

Immunohistokimyasal boyamada EGF reseptörünün karboksil ucundaki bir peptid bölgesine karşı tavşanda hazırlanmış poliklonal anti-EGFR primer antikor (Santa Cruz) kullanıldı.

EGFR'ün immunohistokimyasal olarak belirlenmesi için, standart Avidin Biotin Peroksidaz kompleks tekniği Avidin Biotin kompleks kit (Santa Cruz) kullanılarak yapıldı. Kesitler deparafinize edildikten sonra suyu giderildi ve proteoliz için % 0.05 Saponin solusyonunda 20dk. tutuldu. Endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için, distile su içinde hazırlanmış 3% H₂O₂ içinde 10 dk inkübe edildi. PBS ile yıkamayı takiben kesitler spesifik olmayan protein bağlanmalarını önlenmek amacıyla % 1,5 keçi serumunda 60 dk. muamele edildi. Daha sonra kesitler 1:1000 dilusyondaki primer poliklonal antikor anti-EGFR ile 37°C de 30 dk. inkübe edildi. Kesitler biotinlenmiş goat anti-rabbit sekonder antikor ile 30 dk. oda ısısında bekletildi ve yıkamayı takiben, avidin- biotin peroksidaz komplekste oda sıcaklığında 30dk. inkübe edildi. 3,3'-diaminobenzidine (DAB) kromojen olarak kullanıldı ve hematoksilin ile zıt boyama yapılarak preparatlar entellan yapıştırıcı ile kapatıldı. Negatif kontrol kesitlere primer antikor yerine PBS solusyonu uygulandı.

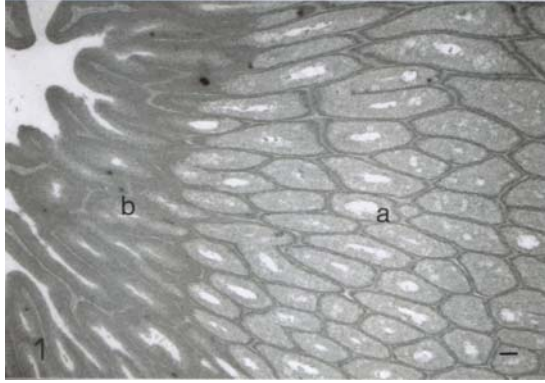
Tüm kesitler iki bağımsız gözlemci tarafından incelenerek aşağıdaki skorlamaya göre değerlendirilmeler yapıldı.

Boyanmama = -, Zayıf boyanma = +, Orta derecede boyanma = ++,

Kuvvetli boyanma = +++

Bulgular

Üropigi bezinin bağdokudan bir kapsülle sarılı olduğu ve bu bezi oluşturan çok sayıdaki tubullerin lumene doğru uzandığı gözlemlendi. EGFR boyanma yoğunluğu bakımından tubullerlerin, bazal ve apikal olmak üzere iki bölgeden oluştuğu belirlendi (Şekil 1).



Şekil 1:

Üropigi bezinde EGFR yerleşimi. a: Bazal kısım
b: Apikal kısım Bar 100µm

Fig. 1:

The localization of EGFR in the uropygial gland.
a. Basal region b. Apical region. Bar 50µm.

Bazal bölgede yer alan tubullerin duvarındaki hücrelerde EGFR boyanma yoğunluğuna bakıldığında, bazal membran üzerine yerleşmiş tek sıralı yassı hücrelerde kuvvetli boyanma, tubulün lumenine doğru yer alan 3-4 sıra halinde yerleşmiş yuvarlak çekirdekli poligonal hücrelerde çok zayıf boyanma, lumene bakan birkaç piknotik çekirdekli poligonal hücrelerde ise boyanmanın olmadığı gözlemlendi (Şekil 2, tablo). Tubulün apikal yarımında, bazal membran üzerine yerleşmiş yassı hücrelerde ve bunun üzerinde yer alan poligonal şekilli tüm hücrelerde EGFR boyanma yoğunluğunun orta şiddette olduğu gözlemlendi (Şekil 3, tablo).

Tablo. Horozların üropigi bezinde EGFR ekspresyonu gösteren skor değerleri.

Table. Shows the score evaluations of EGFR expression in the uropygial gland of Cockrell.

Bölgeler	I. katmandaki Hücreler	II. katmandaki Hücreler	III. katmandaki Hücreler
Bazal Bölge	+++	+/-	-
Apikal Bölge	++	++	++

Semboller: Boyanmama = -, çok zayıf boyanma = +/-, Orta derecede boyanma = ++, Kuvvetli boyanma = +++.

Reseptörün hücre içindeki yerleşimine bakıldığında, sitoplazma içinde boyanma yoğunluğuna bağlı olarak az yada çok yoğun granüller tarzda gözlemlendi (Şekil 3).

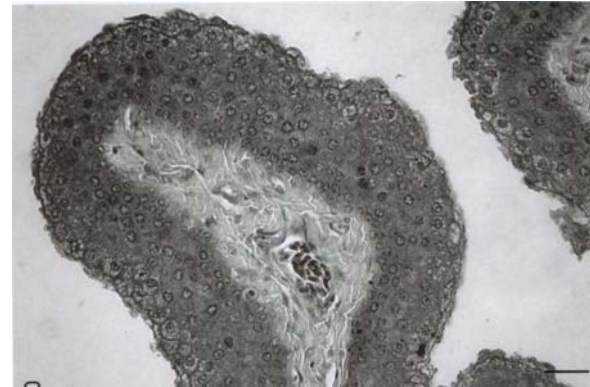


Şekil 2:

Tubullerin bazal bölümü. Bazal hücreler (okbaşı), II. katmandaki hücreler (II); III. katmandaki hücreler (ok) Bar 25 µm.

Fig. 2:

The basal region of the tubules. Basal cells (arrowhead); The cells of zone II. (II); The cells of zone III. (arrow) Bar 25 µm.



Şekil 3:

Tubullerin apikal bölümü. Bar 25 µm.

Fig. 3:

The apical region of the tubules. Bar 25 µm.

Tartışma

Kanatlılarda yapılan histolojik ve histokimyasal çalışmalarda tubullerlerin bazal yarımı yağ, apikal yarımı ise glikojen bölgesi olarak tanımlanmıştır^{5,7,8,27}. EGFR ile yapılan bu çalışmada genelde tubullerinin bazal ve apikal kısmındaki hücrelerde EGFR ekspresyonunun farklı olduğu gözlemlendi. Çalışmada bazal bölgede kapsülün hemen altında yerleşen tubullerinin bazal membran üzerinde bulunan tek sıralı yassı hücrelerinde EGFR boyanmasının daha yoğun olduğu gözlemlendi.

di. Fukui²⁵ EGF'nin varlığında, embriyonik bıldırcın üropigi bez epitel hücrelerinin daha erken geliştiğini ve EGF'nin hücre proliferasyonunu uyardığını belirtmiştir. Ayrıca hamsterlerin yağ bezlerinde EGF'nin mitoz aktiviteye sahip olduğu ve hücre içinde yağ damlacıklarının oluşumunun, bu yağ bezlerinde hücre proliferasyonuna bağlı olduğu belirtilmiştir¹⁶. Epidermisin bazal membran üzerine yerleşen epitel hücrelerinde, yağ bezlerinde, kıl folliküllerinde, dolayısıyla çoğalma kapasitesine sahip olan bölgelerdeki hücrelerde EGFR ekspresyonunun olduğunu bildirmişlerdir²²⁻²⁴. Çalışmada, literatürlerde^{16,22-25} belirtildiği gibi tubullerin bazal membran üzerine yerleşen yassı hücrelerinde EGFR ekspresyonunun fazla olduğu belirlendi. Yassı hücrelerde EGFR ekspresyonunun gözlenmesi bu hücrelerin mitoz aktiviteye sahip olduğunu akla getirmektedir. Bazal bölgede yer alan tubullerin duvarını oluşturan epitel hücrelerden, yassı hücrelerinin dışındaki diğer hücrelerde, EGFR ekspresyonunun çok zayıf olduğu, lumene bakan birkaç hücrede ise ekspresyonun olmadığı gözlendi. Daha önce yapılan histokimyasal çalışmada²⁸ bu bölgedeki hücrelerin yağ hücresi olma yönünde farklılaşmış ve lipit ile dolu hücreler olduğu gözlendi. Farklılaşmaya başlayan ve büyüme potansiyelini kaybetmiş hücrelerde EGFR ekspresyonunun olmadığı ve reseptör sayısının belirgin derecede azaldığı²⁴, in vitro yapılan çalışmada²⁰ insan sebositlerinin proliferasyonu üzerine EGF'nin etkili olmadığı, buna rağmen hamster sebositleri üzerine EGF'nin proliferatif etkisi olduğu ve bu farklılığın hücre türlerinden ileri geldiği öne sürülmüştür. Bunun yanında, EGF'nin mitoz aktivitenin artmasında etkili olduğu kadar antilipojenik bir faktör olduğu, kültür medyumunda EGF azaldıkça hücrelerde lipogenezin arttığı belirtilmiştir²⁰. Sunulan çalışmada, literatürlere benzer olarak (20,24) EGFR ekspresyonunun çok az ya da hiç gözlenmemesi bu hücrelerin yağ hücresi olma yönünde farklılaştığını ve hücrelerde yağ oluşumuna bağlı olarak EGFR ekspresyonunun azaldığı sonucuna varılabilir.

Apikal bölgede yer alan tubullerin duvarını oluşturan tüm hücrelerde EGFR ekspresyonunun orta şiddette olduğu gözlendi. Literatürlerde bu bölgenin glikojen bölgesi olduğu, bu hücrelerde glikojen ve asit fosfatazın¹, ayrıca glikojen ile birlikte nötral münlerin²⁸ bulunduğu bildirilmiştir. İn vitro yapılan bir çalışmada¹⁸ yağ hücrelerine glukoz transportunda insulin reseptörünün olduğu kadar EGFR'nin de rolü olduğu ve bu re-

septörün EGF ile değil, insulin ile uyarıldığı belirtilmiştir. Dolayısıyla çalışmamızda bu bölgedeki tüm hücrelerde EGFR ekspresyonunun gözlenmesi EGFR'nin bu hücrelere glukoz transportunda rol oynadığını akla getirmektedir.

Çalışmada EGFR'nin hücrenin sitoplazmasında granül tarzında homojen bir şekilde yayıldığı gözlendi. Yapılan taramalarda bununla ilgili bir literatüre rastlanmamıştır.

Kaynaklar

1. STETTINHEIM P. The Integument of Birds. Avian Biology. Volume II., Academic Press, New York, 1972.
2. BELL DJ, FREEMAN BM. Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl, Volume I, Academic Press London and New York, 1971.
3. DOĞUER S, ERENÇİN Z. Evcil Kuşların Komparativ Anatomisi. Ankara Üniv. Vet. Fak. Yayınları, 176, 94-95, 1964.
4. NICKEL R, SCHUMMER A, SEIFERLE E. Anatomy of the Domestic Birds. Verlag Paul Parey Berlin, Hamburg, 156-157, 1977.
5. BHATTACHARYYA SP, SAHU C. Histomorphological and Histochemical Studies on the Preen Gland of Cortisone- Treated Male Pigeons. Anat. Anz. Bd. 1976; 140: 162-169.
6. ABALAIN JH., AMET Y, DANIEL JY, FLOCH HH. Androgen Regulation of Secretions in the Sebaceous-like Uropygial Gland of the Male Japanese Quail. J. Endocr. 1984; 103: 147-153.
7. ABALAIN J H, AMET Y, LECAQUE D, SECCHI J, DANIEL JY, FLOCH HH. Ultrastructural Changes in the Uropygial Gland of the Male Japanese Quail, Coturnix Coturnix, after Testosterone Treatment. Cell Tissue Res. 1986; 246: 373-378.
8. ASNANI MV, RAMACHANDRAN AV. Roles of Adrenal and Gonadal Steroids and Season in Uropygial Gland Function in Male Pigeons, Columba Livia. General and Comparative Endocrinology. 1993; 92: 213-224.
9. KING AS, MCLELLAND J. Birds, Their Structure and Function. Bailliere Tindall, London, 28, 290, 1984.
10. EVANS HE. Diseases of Cage and Aviary Birds. Anatomy of the Budgeriar. Philadelphia: Lea and Febiger, 127, 613, 1982.
11. KOLATTUKUDY P E. Avian Uropygial (Preen) Gland. Methods Enzymology. 1981; 72: 714-20.
12. SHANBHAG BA, SHARP PJ. Immunocytochemical Localization of Androgen Receptor in the Comb, Uropygial Gland, Testis and

- Epididymis in the Domestic Chicken. *Gen Comp. Endocrinol.* 1996; 101: 76-82.
13. AMET Y, ABALAIN JH, DANIEL JY, STEFANO SD, FLOCH HH. Testosterone Regulation of Androgen Receptor Levels in the Uropygial Gland of Quails (*Coturnix Coturnix*): A Further Proof for the Androgen Dependency of the Uropygial Gland. *General and Comparative Endocrinology.* 1986; 62: 210-216.
 14. COHEN S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem.* 1962; 237:1555-1562
 15. GREGORY H, WILLSHIRE IR. The isolation of the urogastrones - inhibitors of gastric acid secretion - from human urine. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1975; 11:1765-1774
 16. AKIMOTO N, SATO T, SAKIGUCHI T, KITAMURA K, KOHNO Y, ITO A. Cell proliferation and lipid formation in hamster sebaceous gland cells. *Dermatology.* 2002; 204:118-23.
 17. ADACHI H, KURACHI H, HOMMA H, ADACHI K, IMAI T, MORISHIGE K, MATSUZAWA Y, MIYAKE A. Epidermal growth factor promotes adipogenesis of 3T3-L1 cell in vitro. *Endocrinology.* 1994;135:1824-30.
 18. HARDY RW, GUPTA KB, MCDONALD JM, WILLIFORD J, WELLS A. Epidermal growth factor (EGF) receptor carboxy-terminal domains are required for EGF-induced glucose transport in transgenic 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology.* 1995; 136:431-9.
 19. VAN EPPS-FUNG M, HARDY RW, WILLIFORD J, GUPTA K, WELLS A. Epidermal growth factor induces glucose storage in transgenic 3T3-L1 adipocytes overexpressing epidermal growth factor receptors. *Diabetes.* 1996; 45:1619-25.
 20. SATO T, IMAI N, AKIMOTO N, SAKIGUCHI T, KITAMURA K, ITO A. Epidermal growth factor and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ suppress lipogenesis in hamster sebaceous gland cells in vitro. *J. Invest. Dermatol.* 2001; 117: 965-70.
 21. HANSEN LH, MADSEN B, TEISNER T, NIELSEN JH, BILLESTRUP N. Characterization of the Inhibitory Effect of Growth Hormone on Primary Preadipocyte Differentiation. *Mol. Endocrinol.* 1998; 12: 1140 - 1149.
 22. CROSSLAND DU, ISAACS K, MOORE GP. Localization of epidermal growth factor immunoreactivity in sheep skin during wool follicle development. *Journal of Investigative Dermatology.* 1992; 98: 109-115.
 23. HAASE I, EVANS R, POFAHL R, WATT F M. Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signalling pathways *Journal of Cell Science* 2003; 116: 3227-38.
 24. GREEN MR, BASKETTER DA, COUCHMAN JR, REES DA. Distribution and number of epidermal growth factor receptors in skin is related to epithelial cell growth. *Dev. Biol.* Dec. 1983; 100: 506-12
 25. FUKUI Y. Epidermal growth factor inhibits morphogenesis of the embryonic quail uropygial gland cultured in vitro. *Dev Growth Differ.* 1997; 39:157-66
 26. JACKSON P, BLYTHE D. Immunolabelling techniques for light microscopy. Editor Beesley JE, Immunocytochemistry, Oxford University Press, New York, 1993.
 27. WAGNER RC, BOORD RL. Cytological Differentiation in the Uropygial Gland. *J. Morphol.* 1975; 146: 395-413.
 28. ZIK B, ERDOST H. Horozlarda Acı Kırmızı Biberli Rasyonla Beslemenin Üropigi Bezi Üzerine Etkisinin Histolojik Yönden İncelenmesi. *Turk J Vet Anim Sci.* 2002; 26: 1223- 32.