

Epidermal Büyüme Faktörünün Serum ve Doku Çinko-Bakır Düzeylerine Etkisi*

Effects of EGF on Serum and Tissue Zinc and Copper Levels

Bilge GÖNÜL**, Tülin SÖYLEMEZOĞLU***, Gülin GÜVENDİK****,
Deniz ERBAŞ**

ÖZET

Çalışmamızda, epidermal büyüme faktörünün serum ve doku, çinko-bakır düzeylerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla 7 gün süreyle IP, 10 u.g/kg/gün EGF, verilen ratların serum, karaciğer ve submandibular bez çinko ve bakır düzeyleri saptandı.

EGF uygulanan sıçanlarda serum çinko düzeyi artarken, serum bakır düzeyi kontrollere oranla düşme gösterdi ($p<0.05$). Karaciğer çinko ve bakır düzeyleri kontrollere göre düşük bulundu ($P<0.05$). Submandibular bez çinko düzeylerinde kontrollere göre anlamlı bir fark bulunmadı, bakır düzeyleri ise ölçülebilir düzeyin altında idi.

Bu sonuçlara dayanılarak EGF'ün çinko-bakır metabolizması üzerine etkili olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Epidermal büyüme faktörü, serum çinko, serum bakır, doku çinko, doku bakır.

SUMMARY

In this study, the effects of EGF on serum and tissue zinc and copper levels of male albino rats were investigated. With this purpose 10 u.g/kg/day EGF was given IP, to rats for 7 days, and zinc and copper levels of serum, liver and submandibular glands were measured.

Redaksiyonun verilış tarihi: 4.1.1995.

* Bu çalışma, G.Ü. Araştırma fonu tarafından desteklenmiştir.

** G.Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı.

*** A.Ü. Adli Tıp Enstitüsü.

**** A.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasotik Toksikoloji Anabilim Dalı.

EGF administration increased the serum zinc levels but there was a decrease in serum copper levels compared with controls ($p<0.05$). Zinc and Copper levels of liver was low compared to the controls ($p<0.05$). There wasn't a significant difference in zinc levels of submandibular gland when compared with control groups. Meanwhile copper was under measurable levels.

By depending on these results, we concluded that EGF has effects on zinc and copper metabolism.

Key Words: Epidermal Growth Factor, serum zinc, serum copper, tissue zinc, tissue copper.

GİRİŞ

Epidermal büyüme faktörü (EGF) Cohen tarafından bulunan ve izole edilen bir büyüme faktörüdür (1), en çok tükürük bezinde bulunur (2). Erkek farelerde, dişilerden daha yüksek düzeylerde bulunduğu ve testosteron bağımlı olduğu gösterilmiştir (3, 4). EGF benzeri bir faktör insandan da izole edilerek urogastron adı verilmiştir (5). EGF'nin DNA sentezini stümüle ettiği (6). yara iyileşmesini hızlandırdığı (7) gösterilmiştir.

EGF'nin yanısıra, çinko da tükürük bezinde yüksek düzeyde bulunan bir iz elementtir (8). Çinko RNA ve DNA sentezinde rol aldığı gibi nükleik asidlerin, hücre membranlarının ve hücre organellerinin stabilizasyonunda da önem taşır (9).

Diğer taraftan bakır da absorpsiyon ve metabolizma yönünden çinko ile etkileşen bir iz element olduğundan (10, 11) organizmada çinko düzeyini değiştiren durumlarda önem taşımaktadır (9). Diyetle alınan çinko ve bakırın, albumüne bağlandıktan sonra birikim yeri karaciğerdir (12).

Çinko ve bakırın bağlandıkları proteinlerden en önemlisi olan metal-lotiyoneinin görevi, iz element düzeylerinin regülasyonudur. Ancak karaciğerde sentezinin, çinko ve bakır gibi iz elementler dışında, toksik metaller, kateşolaminler, glukokortikoidler ve forbol esterleri tarafından da indüklendiği bilinmektedir (13).

Önceki çalışmalarımızda submandibular bezden hazırlanan ekstrelerin enjekte edildiği deneklerde, serum çinko düzeyinin yükseldiği gözlenmiştir (14). Ancak bu etkinin, ekstre içinde yüksek düzeyde bulunan EGF nedeniyle olup olmadığının kanıtlanması gereksinimi ortaya çıkmaktadır.

EGF ve çinkonun tükürük bezinde yüksek düzeyde buldukları da bilinmektedir (8, 9). Bu nedenle çalışmamızda, serum çinko düzeyi yanında, öncelikle bu dokulardaki çinko ve bakır düzeyini de inceleyerek

EGF'nin bu iz elementlerin metabolizmasındaki rolüne ışık tutmayı amaçladık.

MATERYAL VE YÖNTEM

Deneylerde 217 ± 20 gramlık albino erkek sıçanlar kullanılmıştır. Denekler kontrol ve EGF uygulanan grup olmak üzere ikiye ayrılmıştır. EGF uygulaması, günün aynı saatinde, kann içine günde $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ dozda enjeksiyonla, birbirini izleyen 7 gün süresince yapılmıştır (15). Kontrol grubuna ise, EGF uygulama hacmine uygun miktarda serum fizyolojik aynı süre ve saatlerde uygulanmıştır. 8. gün sabahı servikal dislokasyonla feda edelin deneklerin kanları polipropilen tüplere alınarak santrifüj edilip serum ayrılmıştır. Serum ve metal gereç kullanılmaksızın izole edilen dokular, çinko ve bakır tayinleri yapılncaya değin -20°C de saklanmıştır. Çinko ve bakır tayinleri; serumda doğrudan seyreltme yöntemi (16) dokularda ise yaş külleştirme yöntemi (17) uygulanarak Perkin Elmer Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresinde (Model 3030), çinko için 213.9 nm , bakır için 324.8 nm dalga boylarında yapılmıştır.

Sonuçlar Mann Whitney U testi ve çinko-bakır arasındaki ilişki, grup içinde Spearman Rank Korelasyon testi ile karşılaştırılmıştır. Yanılma olasılığı 0.05 olarak seçilmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Kontrol ve EGF uygulanan grupların beden ağırlıkları, tükrük bezi ağırlıkları ve relatif tükrük bezi ağırlıkları arasında fark yokken, karaciğer ağırlığı EGF uygulanan deneklerde yüksek ($P < 0.05$), relatif karaciğer ağırlığındaki fark ise istatistik açısından önemsiz bulunmuştur. (Tablo I)

Tablo I: EGF uygulamasının beden ve doku ağırlıklarına etkisi

Grup	Beden ağırlığı (gram)	Tükrük bezi ağırlığı (mg)	Relatif tükrük bezi $\times 10^{-3}$	Karaciğer ağırlığı (mg)	Relatif karaciğer $\times 10^{-3}$
Kontrol (n:5)	197 ± 30	504.4 ± 106.7	2.56 ± 0.9	2032.8 ± 954	9.8 ± 3.5
EGF (n:10)	$237 \pm 36^*$	637.9 ± 116	2.68 ± 0.7	$2939.3 \pm 530^*$	12.4 ± 1.1

Değerler aritmetik ortalama \pm Standart sapma olarak belirtilmiştir.

* $P < 0.05$

Serum çinko düzeyleri EGF uygulanan deneklerde kontrollara göre belirgin yükselme gösterirken ($P < 0.05$), karaciğer çinko düzeyi belirgin düşme göstermiş ($P < 0.05$), tükrük bezi çinko düzeyindeki artış ise istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur. (Tablo II).

Tablo II: EGF uygulamasının serum ve çinko düzeylerine etkisi

Grup	Serum Zn (ug/dl)	Tükrük bezi Zn (ug/g yaş doku)	Karaciğer (ug/g yaş doku)
Kontrol (n:5)	134.8±6.8	89.05±1.9	29.2±4
EGF (n:10)	164.0±5.9*	94.85±8.27	20.4±2.7*

Değerler aritmetik ortalama +Standart sapma olarak belirtilmiştir.

* P0.05

Tablo III: EGF uygulamasının serum ve karaciğer bakır düzeylerine etkisi

Grup	Serum Cu düzeyi (Hg/dl)	Karaciğer Cu düzeyi (ug/g yaş doku)
Kontrol (n:5)	205.64±23.9	5.94±0.28
EGF (n:10)	128.64±34.5*	4.65±0.6*

Değerler aritmetik ortalama ±Standart sapma olarak belirtilmiştir.

* P0.05

Bakır düzeyleri tükrük bezinde hem kontrol, hem de EGF grubunda duyarlık sınırlarımızın (1 ug/g yaş doku) altında bakır düzeyleri EGF uygulanan grupta kontrollara göre belirgin şekilde düşmüştür (P<0.05) (Tablo III).

EGF submandibular bezde diğer organlara göre çok daha yüksek düzeyde bulunmaktadır (2). EGF'nin DNA sentezini stimüle etmesi (6) ve yara iyileşmesini hızlandırması (7) çinko ile bağlantı kurulması açısından önemli noktalar. Çünkü, çinko DNA sentezinde rol oynadığı gibi yara iyileşmesini de hızlandırır (9). Bakır ve/veya çinkonun biyosentez veya bağ dokularının entegrasyonunda önemli bir etkileşme içinde olduğu bilinmektedir (18).

Daha önceki çalışmalarımızda (14) submandibular bez ekstreleri kullanılarak serum çinko düzeyinin arttığı gözlenmiştir. Ancak ekstrenin saf olmayıp başka faktörleri de taşıması, bu etkinin EGF tarafından oluşturulduğunun yeterince güçlü kanıtı olarak görülmediğinden, çalışmamızda ikinci aşama olarak saf EGF uygulanmıştır. Sıçanlara EGF uygulanması sonucu serum çinko düzeyinin kontrollara göre anlamlı şekilde (P<0.05)

yükselmesi, EGF ile çinko arasındaki ilişkiyi doğrulamaktadır. Bu ilişki Demirsoy ve arkadaşları tarafından yenidoğanda da gösterilmiştir (19). Bir diğer çalışmada da basınç yaralanı oluşturulanlar ve yara oluşturulmamış grupta, EGF uygulanan deneklerin serum çinko düzeyleri de yüksek bulunmuştur (20).

Karaciğer çinko düzeyleri EGF uygulanan grupta kontrollara göre düşük ($p<0.05$) bulunduğuna göre, serum çinko düzeyi yükselirken karaciğerdeki çinko depolarının kullanıldığı izlenimini vermektedir. Gandor ve arkadaşları (8) çinko eksikliği oluşturulan sıçanlarda tükrük bezi çinko düzeylerinin, normal beslenenlerle aynı olduğunu göstermişlerdir. Tükrük bezindeki çinko düzeyinin EGF uygulanması sonucu değişmemiş ise bu bulgu ile uyum göstermektedir.

Cousins'e (12) göre, çinko ve bakır bağırsaklardan absorbe olduktan sonra gerek depolandıkları karaciğere taşınmalarında, gerekse dolaşımına dağılıma sırasında proteinlere bağlanmaktadır. Diğer taraftan, bunun dışında da birçok etkenle, absorpsiyon, taşınma ve depolama aşamasında yarışmaya girmektedirler. EGF uygulanan deneklerde kontrollara göre serum çinko düzeyi anlamlı şekilde yükselirken ($P<0.05$), serum bakır düzeyinin düşmesi ($P<0.05$) çinko ile bakır arasında, bilinen yarışmayı (10) doğrular gibi gözükmektedir. Karaciğer bakır düzeyinin EGF uygulanan deneklerde kontrollara göre düşmesi ($p<0.05$) ise azalan bakır absorpsiyonuna bağlanabilir. Cousins'e (12) göre, protein sentezinde inhibisyon olduğunda hepatik bakır düzeyleri artmaktadır. EGF uygulanan deneklerimizde, beden ağırlığı ve karaciğer ağırlığında görülen artış ($P<0.05$) EGF etkisi ile protein sentezindeki artışı düşündürmekte, bu da hepatik bakır düzeyindeki azalmayı açıklamaktadır.

Kontrol deneklere ait bulgularla EGF uygulanan deneklere ait bulgular karşılaştırıldığında varılan bu sonuçlara karşılık, gruplar içinde hem kontroller hem EGF uygulananlarda serum ve karaciğerde bakır ve çinko düzeyleri Spearman Rank korelasyonu ile irdelendiğinde katsayı sıfır ve sifıra çok yakın bulunmuştur. Gerek kontrollere ait, gerekse EGF uygulanan denek gruplarında Spearman Rank korelasyon katsayısı çinko-Bakır ilişkisinin çok zayıf ve negatif bir ilişki olduğunu (kontrollarda $r_s=-0.2$, denek gruplarında $r_s=-0.2$) ortaya koymaktadır. Bu da Cousins'i (12) doğrulayan bir bulgudur. Karaciğerde çinko-bakır ilişkisi ise aynı testle kontrollarda gösterilememiş ($r_s=0$), EGF'li deneklerde ise çok zayıf pozitif ilişki ($r_s=+0.12$) saptanmıştır.

Bu sonuçlar; hepatositlerde bakır birikimi üzerinde çinkonun etkisi olmadığını gösteren yayınları (12,21) doğrulamaktadır. Tüm bulgular birlikte değerlendirilirse, serum ve karaciğerde EGF'nin etkisinin bu iki iz element için birbirinden bağımsız olarak çıktığı sonucuna varılabilir.

KAYNAKLAR

1. Cohen, S.: Epidermal Growth Factor (Nobel Lecture) *Angew. Chem, Int.*, 26, 712-722 (1987).
2. Polak, J.M.: *Regulatory Peptides. Birkhauser, Verlag, Berlin* s:180-191 (1989).
3. Cohen, S., Taylor, J.M.: Epidermal Growth Factor, Chemical and Biological Characterization. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 30, 533-550 (1974).
4. Byyny, R.L., Orth, D.N., Cohen, S., Doyne, E.S.: Epidermal Growth Factor Effects of Androgens and Androgenic Agents, *Endocrinology*, 95, 776-782 (1974).
5. Gregory, H.: Isolation and Structure of Urogastrone and Its Relationship to Epidermal Growth Factor. *Nature*, 257, 325-327 (1975).
6. Carpenter, G., Cohen, S.: Epidermal Growth Factor, *Ann. Rev. Biochem.*, 48, 193-216(1979).
7. Laato, M., Niinikoshi, J., Gerdin, B., Lebel, L.: Stimulation of Wound Healing by Epidermal Growth Factor, *Ann. Surg.*, 203 (4), 379-381 (1986).
8. Gandor, D.W., Fanslow, DJ., Meyer, J.: Effect of Zinc Deficiency on Developmental Changes in Alkaline Phosphatase and Carbonic Anhydrase Activities in the Submandibular Gland of Rat, *Archs. Oral Biol.*, 28 (7), 609-615 (1983).
9. Karcioğlu, Z.A., Sarper, R.M.: *Zinc and Copper in Medicine*, Charles C. Thomas Publ. Illinois (1980).
10. Magee, A.C. Matrone, G.: Studies on Growth, Copper Metabolism and Iron Metabolism of Rats Fed High Levels of Zinc, *J. Nutr.* 72, 233-242 (1960).
11. Oestrelcher, P., Cousins, R.J.: Copper and Zinc Absorption in the Rat: Mechanism of Mutual Antagonism. *J. Nutr.* 115, 159-166(1985).
12. Cousins, R.J.: Absorption, Transport and Hepatic Metabolism of Copper and Zinc Special Reference to Metallothionein and Ceruloplasmin, *Physiol. Rev.* 65 (2) 238-309(1985).
13. Brady, F.O.: Induction of Metallothionein in Rats, *Methods in Enzimology*, 205, 559-567(1991).
14. Erbaş, D., Gönül, B., Güvendik, G.: Submaksiller Bez Ekstresi İçindeki Epidermal Büyüme Faktörünün Kan Kolesterol, Lipid, HDL Kolesterol, Serum Çinko ve Doku Kolesterol Düzeylerine Etkileri, *Doğa*, 14 (1) 43-56 (1990).
15. Buckley, A., Davidson, J.M., Kamarath, CD., Wolt, T.B., Woodward, S.C.: Sustained Release of EGF Accelerates Wound Repair, *Proc. Nath. Acad. Sci.*, 82, 7340-7344(1985).
16. Kurz, D., Roach, J., Eyring, E.: Direct Determination of Serum Zinc and Copper by Atomic Absorption Spectrophotometry, *Biochem, Med.* 6, 274-281 (1972).

17. **Kahnke, M.J.:** Atomic Absorption Spectrophotometry Applied to the Determination of Zinc in Formalized Human Tissue, *At. Absorp. Newsl.*, 5, 7-11 (1966).
18. **Emerlck, R J., Kayongo-Male, H.:** Interactive Effects of Dietary Silicon, Copper and Zinc in the Rat, *J. Nutr. Biochem.* 1(1), 35-40 (1990).
19. Demirsoy, S., Erbaş, D., Hasanoğlu, E.: The Effect of EGF on Serum Zinc Levels, *The Turkish Journal of Pediatrics*, 33,159-161 (1991).
20. **Gönül, B. Söylemezoğlu, T., Yamçoğlu, L., Güvendik, G.;** Effects of Epidermal Growth Factor on Serum Zinc and Plasma Prostaglandin E2 Levels of Mice With Pressure sores. *Prostaglandins*, 45, 153-157 (1993).
21. Saltman, P., Alex, T., McCormack, B.: The Accumulation of Copper by Rat Liver Slices, *Arch. Biochem. Biophys.* 83, 538-547 (1959).