

Sialoadenektomi ve Eksojen Epidermal Growth Faktör Uygulamasının Sıçan Uterus Dokusu Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması¹

M. Aydın KETANİ*

Berna Güney SARUHAN *

¹ VIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresinde (27-30 Haziran 2006, Malatya) Poster olarak sunulmuştur.

* Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı/Diyarbakır - TÜRKİYE

Yayın Kodu: 2006/30-A

Özet

Sıçanlarda submandibular bez zengin bir Epidermal Growth Factor'ün (EGF) kaynağıdır. Çalışmanın amacı; sialoadenektomi operasyonu yapılarak, endojen EGF eksikliği oluşturulan sıçanlara dışardan verilen EGF'nin uterus dokusu üzerindeki etkilerinin histolojik olarak araştırılmasıdır. Bu amaçla; erişkin 30 adet 180-200 günlük ve 220-250 gr ağırlığında Wistar Albino türü sıçanlar rastgele 3 gruba ayrıldılar. Grup-I: Kontrol(n=10), Grup-II: Sialoadenektomi(n=10),Grup-III: Sialoadenektomi operasyonundan 22 gün sonra 75 mikrogram/5 gün süre ile eksojen EGF (n=10). Hayvanlar çalışmanın başlangıcından 27 gün sonra pentobarbital ile sakrifiye edilerek, uterus dokuları alındı. Alınan doku örnekleri bouin ve %10'luk nötral formalinde fikse edildi. Rutin histolojik işlemlerden sonra, elde edilen kesitler Hematoksilen-Eosin, Van Giesson ve Mallory Azan ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi. Sialoadenektomi işlemine bağlı olarak; uterus epitelinde, endometrial bağdokusunda ve uterinal bezlerde histolojik değişiklikler izlendi. Sialoadenektomi sonrası dışardan verilen EGF'nin, histolojik değişiklikleri kısmi olarak düzelttiğini gözlemledik. Sonuç olarak; tükürük bezin'den salgılanan EGF'nin uterus dokusu üzerinde etkili olabileceği kanısına vardık.

Anahtar sözcükler: Sialoadenektomi, EGF, uterus, sıçan

The Effects of Exogenous Epidermal Growth Factor Administration in Sialoadenectomy Rats on The Uterus Tissue: A Light Microscopic Study

Summary

The submandibular gland is a rich source of epidermal growth factor Epidermal Growth Factor (EGF) in rat. The aim of this study was to determined the histological effects on the uterus of the sialoadenectomized (surgical removal of the submandibular glands) rats which were occurred endogenous EGF deficiency followed by administered exogenous EGF. Thirty adult female Wistar-Albino rats weighing between 220 and 250 g were randomly divided into three groups. Group-I; Control (n=10), Grup-II; Sialoadenectomized rats (n=10), Group-III; 22 days after sialoadenectomy, exogenous EGF (75 microgram, Sigma E9644) (n=10) was added to the tapwater for 5 days. Twentyseven days after the study was started, animals were sacrificed by sodium pentobarbital 50 mg/kg, IP and uterinal tissue samples was fixed in 10% neutral formalin and Bouin's solutions. After histological procedures were carried out, sections were stained with Haematoxylin-Eosin, Van Giesson, and Mallory Azan and monitored on the light microscope. Histological changes related to the sialoadenectomy were observed in the epithelium, connective tissue and endometrial glands of the uterus. After sialoadenectomy, addition of the exogenous EGF to the water was partially recovered histological changes on the uterinal tissue. Finally, the section of EGF from the submandibular gland plays an important role on the uterinal tissue.

Keywords: Sialoadenectomy, EGF, uterus, rat

İletişim (Correspondence)

Phone: +90 412 2488020/8613

e-mail: aketani@dicle.edu.tr

GİRİŞ

Son zamanlarda Epitel büyüme faktörü olarak adlandırılan EGF ve reseptörlerinin birçok memeli uterusunda var olduğu bildirilmiştir¹⁻⁵. Bu konuda yapılan birçok çalışmaya ilaveten, özellikle EGF'nin uterus aktivitesi üzerine olan etkileriyle embriyo gelişimi ve implantasyondaki önemli rolleri bildirilmiştir⁶⁻¹². Gardner ve arkadaşları^{13,14} EGF uyarımının invitro şartlarda rat uterusunda kontraksiyona yol açtığını bildirmişlerdir. Bu ifadelerle growth faktörün fizyolojik ilgisinin olabirliği gösterilmekle beraber, klinik kullanımda growth faktörün uterus aktivitesini bir uterotonik materyal olarak düzenlerken EGF'nin invivo şartlarda uterus aktivitesi üzerine olan etkileride henüz daha açıklanmamıştır.

EGF, ovidukt ve uterus memeli embriyolarının gelişiminin güçlendirilmesinde önemli bir rol oynar. Onların temel fonksiyonları gebeliğin ilk zamanlarında yavrunun yerleşmesini ve çevre ile uyumunun sağlanmasını kolaylaştırmak, yumurta ve spermatozoanın taşınması ve embriyo bölünmelerinin ilk safhalarının desteklenmesinin sağlanmasıdır. Uterusta steroid hormonlar tarafından, spatiotemporal sentez ve çeşitli büyüme hormonları, sitokinez, lipid mediatörleri ve transkripsiyon tetiklenir; bu da uterusun implantasyona hazırlığı için önemli bir role sahip olduğunu gösterir¹⁵.

EGF, ilk kez 1962 yılında Dr. Stanley Cohen tarafından erkek farelerin submandibular tükürük bezinden izole edilmiştir¹⁶. Cohen, erkek farelerin submandibular tükürük bezinde Sinir Büyüme Faktörünü (NGF) izole etmeye çalışırken bu bezlerden elde ettiği ekstrenin yeni doğan farelere enjekte ettiğinde erken diş sürmesi ve erken göz kapağı açılışına neden olduğunu gözleyerek etken maddeyi izole etmiş ve bu maddede epidermisin gelişimini hızlandırıcı etkisinden dolayı Epidermal Growth Faktör (EGF) adını vermiştir¹⁶⁻²⁰.

İnsanda bir çok dokuda varlığı gösterilen EGF, 453 aminoasitten oluşan mitojenik bir polipeptiddir. EGF bir çok mezodermal ve ektodermal kökenli hücre için mitojenik özelliktedir. Etkili olduğu hücrelerde iyon alınımını, glikolizisi, DNA ve RNA ile protein yapımını arttırıcı özellik gösterir^{21,22}. EGF endojen olarak submandibular tükürük bezinden sentezlenerek tübüler kanal hücrelerinde depo edilir. Bu bezin çıkarılması ile plazma EGF düzeylerinde herhangi bir değişiklik olmaz. Bu durum EGF'nin organizmada ikinci bir sentez yerinin bulunduğunu düşündürmektedir²³⁻²⁵. EGF trombositlerde de bulunmaktadır²⁶.

Sıçanlardada endojen EGF nin birincil kaynağı Submandibular tükürük bezidir²⁷. Bu kaynaktan yola çıkarak, sialoadenektomi operasyonu yapılarak(submandibular tükürük bezi çıkartılarak), endojen EGF eksikliği oluşturulan sıçanlara dışardan verilen EGF'nin uterus dokusu üzerindeki etkilerinin histolojik olarak araştırılmasını amaçladık.

MATERYAL ve METOT

Erişkin (180-200 günlük) 220-250gr ağırlığında toplam 30 adet dişi Wistar Albino türü sıçanlar Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edildi. Deney hayvanları araştırma süresince optimal ısı 22°C'de 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda barındırıldılar. Deney hayvanlarının günlük yem ve su ihtiyaçları ad libitum olarak karşılandı. Deney hayvanları rastgele seçilerek 3 gruba ayrıldı.

Grup-I (Kontrol): Bu gruptaki sıçanlar herhangi bir uygulamaya tabii tutulmadı (n=10).

Grup-II (Sialoadenektomi uygulanan grup): Deney hayvanları Ketamine HCl (10 mg/100 gr) ve xylazine (0.8 mg/100 gr)'in intramuskular uygulanması ile genel anestezi sağlandı. Mandibulanın altından ensizyon yapılarak, (sialoadenektomi operasyonu) submandibular tükürük bezleri total olarak çıkartıldı (n:10).

Grup-III (Sialoadenektomi+Eksojen EGF): Sialoadenektomi operasyonundan 22 gün sonra 75 µg/5 gün süre ile eksojen EGF içme sularına katılarak (Epidermal Growth Factor- Human Recombinant- Sigma E9644) verildi (n:10).

Kontrol ve deney grupları çalışmanın başlangıcından 27 gün sonra 50 mg/kg IP pentobarbital ile sakrifiye edilerek, uterus dokuları alındı. Uterus dokuları, bouin ve %10'luk nötral formalinde fiksasyonu yapıldı. Rutin histolojik takipler ile elde edilen kesitler, Hematoksilin-Eosin, Van Giesson ve Mallory Azan ile boyandı. Histolojik değerlendirmeler Nikon 400 Eclipse araştırma mikroskobunda yapılarak, fotoğrafları çekildi.

BULGULAR

Kontrol grubuna (Grup-I) ait uterusun histolojik incelenmesinde, lamina epiteliyalis ve endometrium bağ dokusunun normal yapıda olduğu (Şekil 1 a,b,c), uterusun yüzlek ve derin endometrium tabakasında kollajen lif yapısının yoğun olduğu ve liflerin düzenli

seyirde oluşu dikkati çekti (Şekil 1a,b). Bu gruba ait uterus bezlerinin yapılarının normal görünümde olduğu, bez epitelinin tek katlı yüksek prizmatik özellikte olduğu izlendi (Şekil 1c).

Sialoadenektomi (Grup-II) yapılan grubun, kontrol grubuyla karşılaştırılmasında uterusun lamina epitelialisini oluşturan hücrelerin boylarının basıklaştığı, endometriumun yüzlek(pars fonksiyonalis) kısmının ipliksel unsurlardan yana yoksunlaştığı ve hücresel unsurlardan ibaret bir yapı sergilediği gözlemlendi (Şekil 2a,b,c).

Sialoadenektomi ve ekzojen EGF (Grup-III) verilen grubun uterus epitelinde çok belirgin bir düzelmeye gözlemlenmedi (Şekil 3a,b,c). Bu grubun uterusunun yüzlek endometrium (pars fonksiyonalis) tabakasının görünümü, Grup-II'deki görünümüne yakın olduğu görüldü. Ancak bu gruba ait uterus bez yapılarında bir düzelmeye olduğu bezlerin atrofik görünümlerinin düzelmeye doğru gittiği izlendi (Şekil 3b,c).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan çalışmalarda EGF'nin uterus dokusu üzerinde önemli bir düzenleyici etkisi olduğu görülmüştür. Tsutsumi ve arkadaşları²⁸ gebelik döneminde sialoadenektomiye bağlı olarak intrauterin büyümenin gerilediğini ve uterus anomalilerinin şekillendiğini bildirmişlerdir. EGF en yüksek konsantrasyonda mandibular tükürük bezlerinde sonra sırasıyla vezikula seminalis, karaciğer, testis, böbrek de bulunur²⁹.

Wollenhaupt ve arkadaşları¹⁵ domuzda östrus siklusu ve implantasyon sırasında endometrial dokuda EGF-R, VEGF ve FGF-2 yi immunohistokimyasal olarak ortaya koymuşlardır. Tsutsumi ve arkadaşları²⁸ yaptıkları deneysel çalışmalarda submandibular bezde ve plazmada EGF düzeyinin gebelik ve yaşın artışıyla birlikte önemli derece artmış olduğunu tesbit etmişlerdir. Tamada ve arkadaşları³⁰ keçilerde ekzojen EGF uygulamasının uterus EGFR'nün immunohistokimyasal boyanması ve uterus aktivitesi arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur.

Maternal EGF, gebelik ve laktasyon döneminde artmaktadır³¹. Gebeliğin 11. gününde farelerde EGF düzeyi en üst düzeye varır, bu da fetal gonadın hormon sekresyonu yaptığı döneme denk düşer. Yapılan çalışmalarda³²⁻³⁶, plasentanın EGF reseptörleri yönünden çok zengin olduğu ve EGF reseptörlerinin invitro stimülasyonu ile plasental gonadotropinlerin salınımı

arttığı gözlenmiştir.

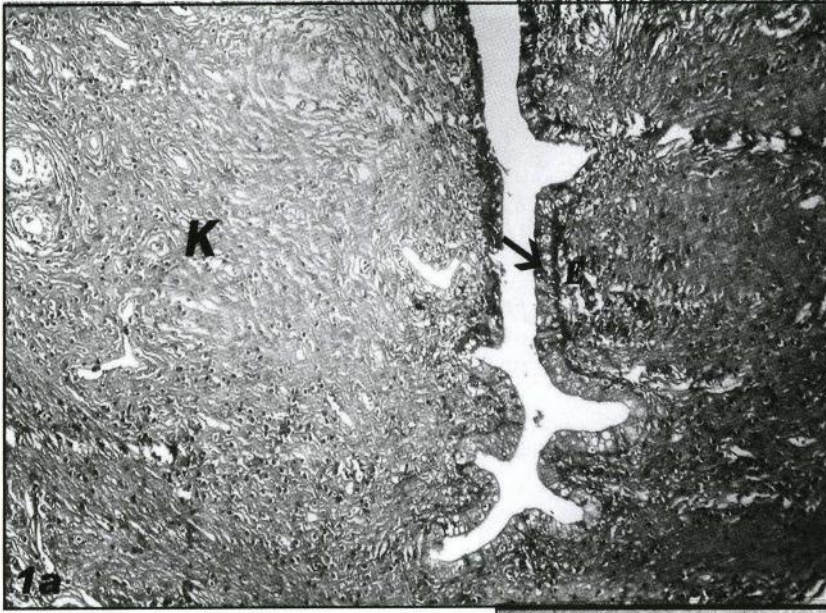
Önceki çalışmalarımızda³⁷, sialoadenektomi operasyonu yapılan dişi sıçanları, operasyon sonrasında çiftleştirip gebe bıraktırdıktan sonra doğan erkek yavrularda maternal EGF eksikliğinin epididimisin gelişiminde geri dönüşü olmayan morfolojik değişikliklere ve anomalilere yol açtığını gördük. Yine önceki çalışmamızda³⁸ maternal oluşturulan EGF eksikliği oluşturulan sıçanlara maternal flutamid uygulanmış ve doğan erkek yavrularda vücut ve genital organlarda gelişme geriliği, serum testosteron düzeyinde artış ve testis dokusunda dejenerasyon görülmüştür.

Bu çalışmamızda da, sıçanlarda submandibular tükürük bezlerinin çıkartılarak endojen EGF'nin kaynağının ortadan kaldırılması sağlanmıştır. EGF'nin yokluğuna bağlı olarak uterusun histolojik yapısında belirgin değişikliklerin oluştuğunu gözledik. Elde edilen bulgular göstermektedir ki, EGF uterus dokusu üzerinde önemli bir histofizyolojik etkiye sahip olduğu sonucuna vardık.

KAYNAKLAR

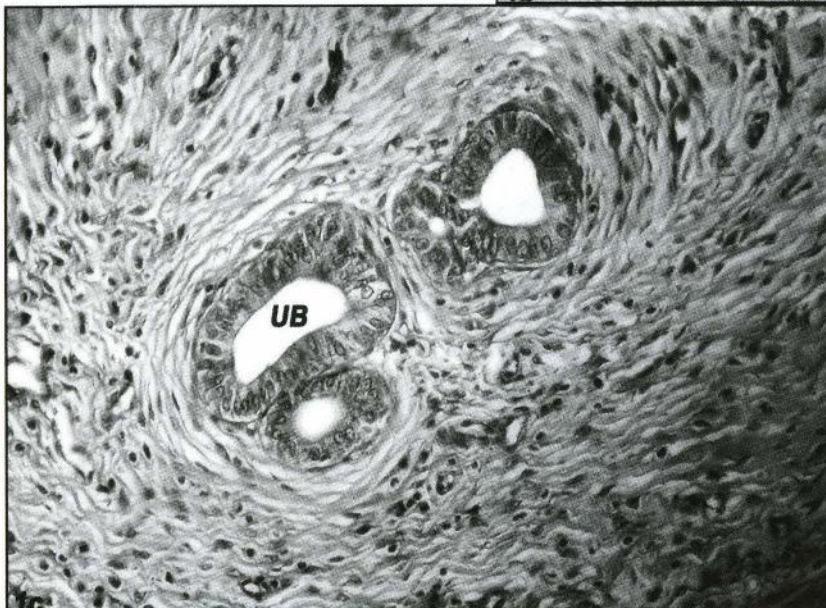
- 1 **Das SK, Das N, Wang J, Lim H, Schryver B:** Expression of betacellulin and epiregulin genes in the Mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition is coincident with the window of implantation. *Dev Biol*, 190, 178-190, 1997.
- 2 **Das SK, Tsukamura H, Paria BC, Andrews GK, Dey SK:** Differential expression of epidermal growth factor receptor gene and regulation of EGF-R bioactivity by progesterone and estrogen in the adult Mouse uterus. *Endocrinology*, 134, 971-981, 1994.
- 3 **Das SK, Wang X-N, Paria BC, Damm D, Abraham JA, Klagsbrun M, Andrews GK:** Heparin binding EGF-like growth factor gene is induced in the Mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development*, 120, 1071-1083, 1994.
- 4 **Flores JM, Sanchez MA, Garcia P, Sanchez B, Nieto A:** Immunohistochemical localization of epidermal growth factor, transforming growth factor- α and growth factor- β s in the caprine peri-implantation period. *Theriogenology*, 50, 931-944, 1998.
- 5 **Gharib- Hamrouche N, Chene N, Martal J:** Comparative expression of TGF α and EGF genes in the ovine conceptus and uterine endometrium in the periimplantation period. *Reprod Nutr Dev*, 35, 291-303, 1995.
- 6 **Haimovici F, Anderson DJ:** Effects of growth factors and growth factor extracellular matrix interactions on Mouse trophoblast outgrowth in vitro. *Biol Reprod*, 49, 124-130, 1993.
- 7 **Johnson DC, Chatterjee S:** Embryo implantation in the rat uterus induced by epidermal growth factor. *J Reprod Fertil*, 99, 557-559, 1993.

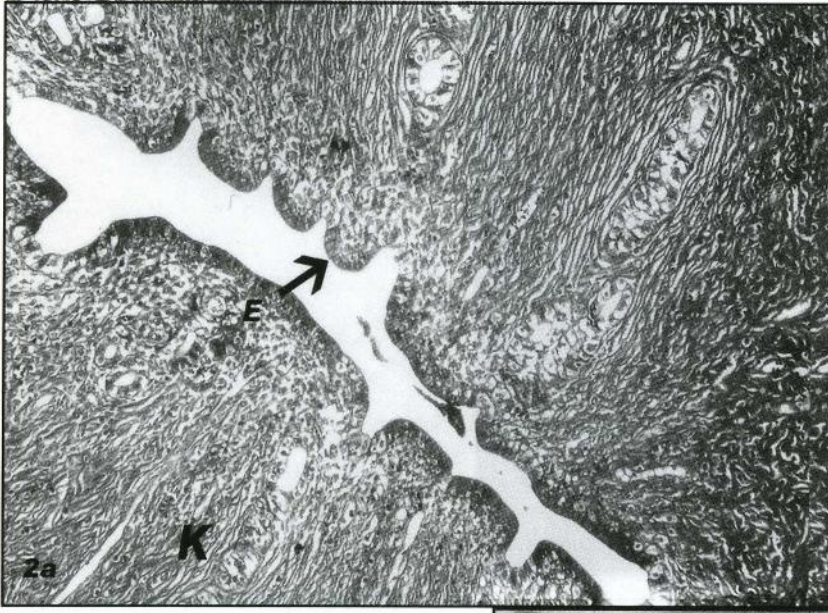
- 8 **Paria BC, Das SK, Gupta A, Dey SK:** Reversal of indomethacin-induced inhibition of implantation in the Mouse by epidermal growth factor. *Prostaglandis*, 42, 191-199, 1991.
- 9 **Paria BC, Das SK, Andrews GK, Dey SK:** Expression of the epidermal growth factor receptor gene is regulated in Mouse blastocysts during delayed implantation. *Proc Natl Acad USA*, 90, 55-59, 1993.
- 10 **Paria BC, Dey SK:** Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 4756-4760, 1990.
- 11 **Raab G, Kover K, Paria BC, Dey SK, Ezzell RM, Klagsbrun M:** Mouse preimplantation blastocysts adhere to cells expressing the transmembrane form of heparin-binding EGF-like growth factor. *Development*, 122, 637-645, 1996.
- 12 **Tamada H, Higashiyama C, Takano H, Kawate N, Inaba T, Sawada T:** The effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on preimplantation-embryo development and implantation in the rat. *Life Sci*, 64: 1967-1973, 1999.
- 13 **Gardner RM, Lingham RB, Stancel GM:** Contractions of the isolated uterus stimulated by epidermal growth factor, *FASEB J*, 1, 224-228, 1987.
- 14 **Gardner RM, Verner G, Kirkland JL, Stancel GM:** Regulation of uterine EGF receptors by estrogen in the mature rat and during the estrous cycle. *J Steroid Biochem*, 32, 339-343, 1989.
- 15 **Wöllenhaupt K, Welter H, Einspanier R, Manabe N, Brüssow KP:** Expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R), vaskular endothelial Growth factor (VEGF-R) and fibroblast growth factor receptor (FGF-R) system in porcine oviduct and endometrium during the time of implantation. *J Reprod Dev*, 50, 269-278, 2004.
- 16 **Cohen S:** Isolation of a Mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *The Journal of Biological Chemistry*, 237, 37-40, 1962.
- 17 **Cohen S, Taylor JM:** Chemical and Biological characterization recent prog. *Horm Res*, 30, 533-550, 1974.
- 18 **Rothe M, Falanga V:** Growth factors. *Arch Dermatol*, 125, 1390-1398, 1989.
- 19 **Türker M, Erbaş D, Yılmaz D:** SMG ekstresinin submandibular bez ve kan prostaglandin seviyelerine etkileri. *G.Ü Tıp Fakültesi Dergisi*, 5, 109-115, 1989.
- 20 **Yeniğin M:** Her Yönü ile Diabetes Mellitus. Haseki Hastanesi yayınları 2. Baskı İstanbul, 1995.
- 21 **Nave KA, Probstmeier R, Schacner M:** EGF does not cross the blood brain barrier. *The Journal of Investigate Dermatology*, 94, 624-662, 1985.
- 22 **Pratt RM:** Role of EGF in embryonic development. *Current Topics in Developmental Biology*, 22 (8): 175-193, 1987.
- 23 **Byyny RL, Orth DN, Cohen S, Doynne ES:** EGF effects of androgens and adrenergic agents. *Endo*, 95, 776-782, 1974.
- 24 **Carpenter G, Cohen S:** Epidermal growth factor. *Biochem*, 68, 194-216, 1979.
- 25 **Perheentura J, Lakshman J, Hoath SB, Fisher DA:** Hormonal modulation of mouse plasma concentration of EGF. *Acta Endocrinologica*, 107, 571-576, 1984.
- 26 **Oka Y, Orth DN:** Human plasma EGF-b urogastrone is associated with blood platelets. *J Clin Invest*, 72, 249-259, 1983.
- 27 **Cohen S, Savage CR:** Recent studies on the chemistry and biology of EGF. *Recent Prog Horm Res*, 30, 551-554, 1974.
- 28 **Tsutsumi O, Taketani Y, Oka Y:** The uterine growth – promoting action of epidermal growth factor and its function in the fertility of mice. *J Endocrinology*, 138, 437-443, 1993.
- 29 **Liu A, Flores C, Kinkead T, Carboni AA, Menon M, Seethalakshimi:** Effects of sialoadenectomy and EGF on testicular function of sexually mature male mice. *The Journal of Urology*, 152, 554-561, 1994.
- 30 **Tamada H, Yoh C, Inaba T, Takano H, Kawate N, Sawada T:** Uterus: Immunohistochemical localization of EGF and EGF-R and effect of EGF on uterus activity in vivo. *Theriogenology*, 54, 159-169, 2000.
- 31 **Kurachi H, Oka T:** Changes in epidermal growth factor concentrations of submandibular gland. Plasma and urine of normal and sialoadenectomized female mice during various reproductive stages. *J Endocrinology*, 106, 197-202, 1985.
- 32 **Ali P, Smart JL, Souza SW:** EGF receptors in rat placenta, amnion and yolk sac characteristics of specific binding are dependent on gestational age. *Placenta*, 10, 589-595, 1989.
- 33 **Oberbauer AM, Linkhart TA, Mohan S, Longo LD:** Fibroblast growth factor enhances human chorionic gonadotropin synthesis independent of mitotic stimulation in jar choriocarcinoma cells. *Endocrinology*, 123, 2696-2700, 1988.
- 34 **Morris DW, Bhardwaj D, Dabbagh LK, Marusyk H, Siy O:** EGF induces differentiation and secretion of human chorionic gonadotropin and placental lactogen in normal human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, 65, 1282-1290, 1987.
- 35 **Maruo T, Matsuo H, Murata K, Mochizuki M:** Gestational age dependent dual action of EGF on human placenta early in gestation. *J Clin Endocrinol Metab*, 75, 1362-1367, 1992.
- 36 **Morris DW, Bhardwaj D, Paras MT:** Transforming Growth Factor. *Endocrinology*, 129, 22-26, 1991.
- 37 **Ketani MA, Ersay RA, Nergiz Y, Deniz M, Ketani Ş:** Sialoadenektomi ve flutamidin epididimis dokusu üzerinde oluşturduğu histolojik değişiklikler ve epididimal anomaliler. *Türk J Biol*, 24, 41-50, 2000.
- 38 **Ketani MA, Nergiz Y, Elitok MÖ:** Gebe sıçanlara uygulanan sialoadenektomi ve flutamidinin erkek yavrularda serum testosteron, FSH, LH düzeyleri ile testis dokusu üzerine etkileri. *J Med Sci*, 22, 1-7, 2002.



Şekil 1. Kontrol grubuna ait uterus görünümleri. 1a: Mallory Azan X25, 1b: Hematoksilen Van Giesson X80, 1c: Hematoksilen-Eosin X260. Ok: Lamina epitelialis, E: Endometrial bağ doku, UB: Uterus bezleri, K: Kollagen.

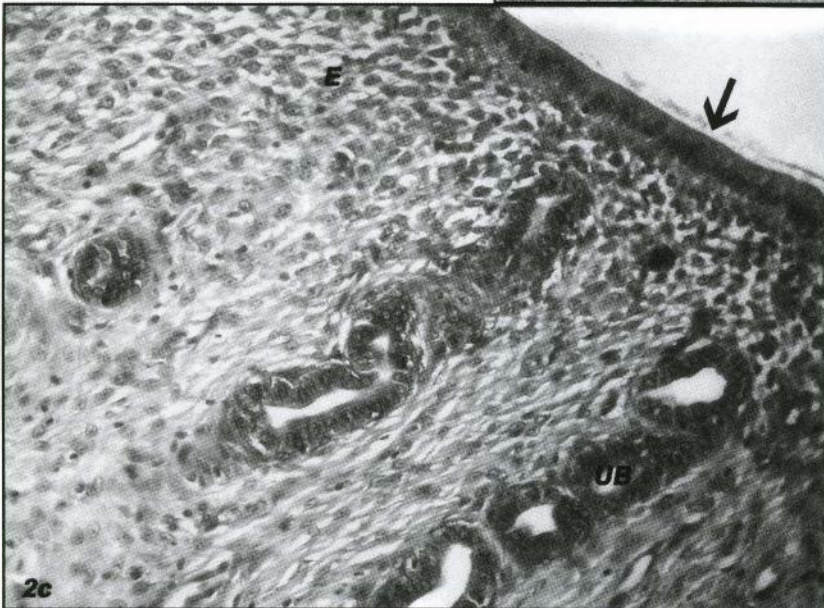
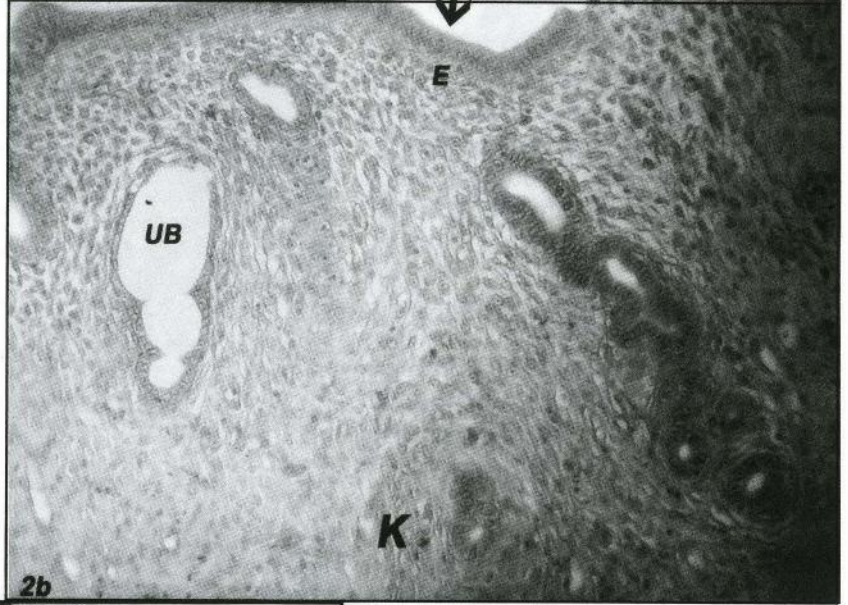
Figure 1. Light micrograph from the rat uterus of the control group. 1a: Mallory Azan X25, 1b: Hematoksilen Van Giesson X80, 1c: Hematoksilen-Eosin X260. arrow: Epithelium, E: Endometrium connective tissue, UB: Uterine gland, K: Collagen.

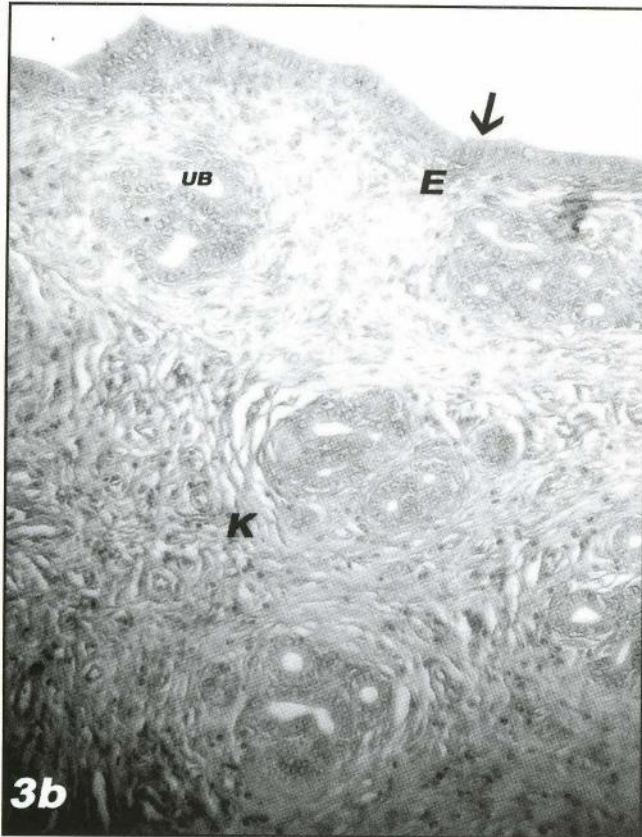
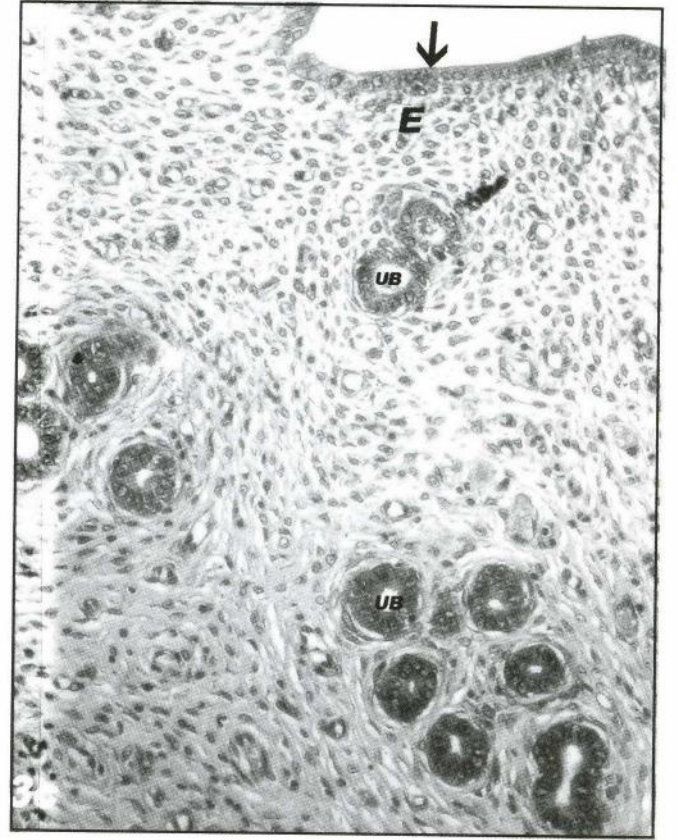
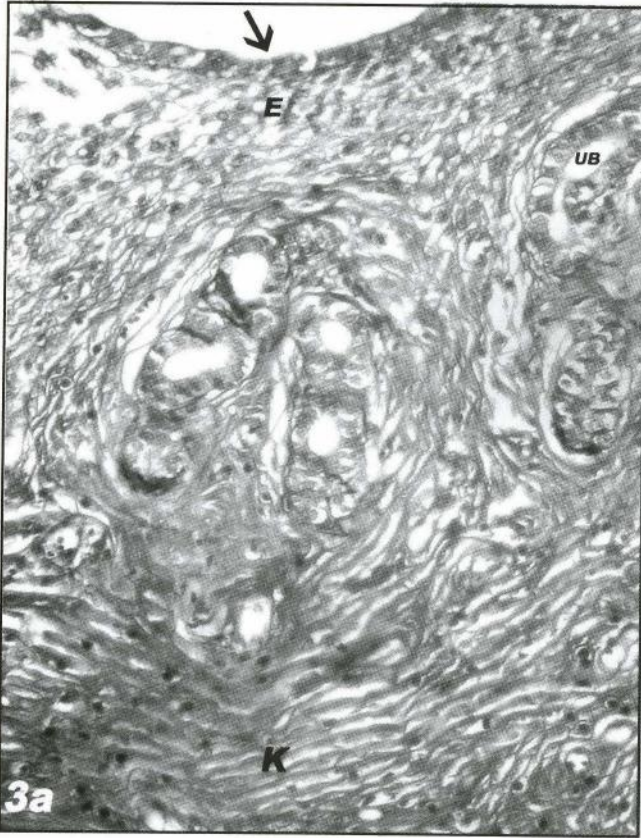




Şekil 2. Sialoadenektomi uygulanmış gruba ait uterus görünümü. 2a: Mallory Azan X25, 2b: Hematoksilen Van Giesson X80, 2c: Hematoksilen-Eosin X80. Ok: Lamina epitelyalis, E: Endometrial bağ doku, UB: Uterus bezleri, K: Kollagen.

Figure 2. Light micrograph from the rat uterus of the Sialoadenectomy group. 2a: Mallory Azan X25, 2b: Hematoksilen Van Giesson X80, 2c: Hematoksilen-Eosin X80. arrow: Epithelium, E: Endometrium connective tissue, UB: Uterine gland, K: Collagen.





Şekil 3. Sialoadenektomi+EGF uygulanması yapılmış gruba ait uterus görünümüleri. 3a: Mallory AzanX80, 3b: Hematoksilen Van Giesson X80, 3c: Hematoksilen-Eosin X80. Ok: Lamina epiteliyalis, E: Endometrial bağ doku, UB: Uterus bezleri, K: Kollagen.

Figure 3. Light micrograph from the rat uterus of the Sialoadenectomy+ EGF administration group. 3a: Mallory Azan X80, 3b: Hematoksilen Van Giesson X80, 3c: Hematoksilen-Eosin X80. arrow: Epithelium, E: Endometrium connective tissue, UB: Uterine gland, K: Collagen.