

DERİ GELİŞİMİNDE SİALOADENOKTEMİ VE EPİDERMAL GROWTH FAKTÖR'ÜN ROLÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ
İrfan KARADEDE

TEZ YÖNETİCİSİ
Prof. Dr. Yusuf NERGİZ

DİYARBAKIR

2004

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamın her aşamasında beni yönlendiren, bana rehberlik eden Doktora Tez Yöneticim Prof. Dr. Yusuf NERGİZ'e, Elektron Mikroskopi çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr Candan ÖZOĞUL'a, deney ve tez yazım aşamalarında yardımcı olan Doç. Dr. Murat AKKUŞ, Yrd.Doç.Dr. Aydın KETANİ, Uzm.Dr. Ayfer AKTAŞ ile Uzm.Dr. Ayşe YILDIRIM'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim elemanlarına ve çalışanlarına teşekkür ederim.

İrfan KARADEDE

İÇİNDEKİLER	Sayfa No
TABLO VE GRAFİK LİSTESİ	4
RESİM LİSTESİ	5-6
KISALTMALAR	7
ÖZET	8
SUMMARY	9
1-GİRİŞ VE AMAÇ	10-11
2-GEREÇ VE YÖNTEM	12-14
2.1. Deney Hayvanları	
2.2. Cerrahi İşlem	
2.3. Histolojik Metod	
2.4. İstatistiksel Analiz	
3-BULGULAR	15-29
3.1. Derinin Işık Mikroskopik Bulguları	
3.1.1. Kontrol Grubu	
3.1.2. Sialoadenektomi Grubu	
3.1.3. Sialoadenektomi+Epidermal Growth Faktör Grubu	
3.2. Derinin Elektron Mikroskopik Bulguları	
3.2.1.Kontrol Grubu:	
3.2.2. Sialoadenektomi Grubu	
3.2.3. Sialoadenektomi+Epidermal Growth Faktör Grubu	
3.3. İstatistiksel Analiz	
3.3.1. Total Vücut Ağırlığı	
3.3.2. Vücut Uzunluk Ölçümleri	
4-TARTIŞMA VE SONUÇ	30-32
5-KAYNAKLAR	33-35

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Sıçan Yavru Sayısının Gruplara Dağılımı.

Tablo 2. Kontrol ve Deney Grubu Sıçan Yavrularının Cinsiyete Göre Dağılımı.

Tablo 3. Sıçan Yavrularının Total Vücut Ağırlık Ölçümleri.

Tablo 4. Sıçan Yavrularının Vücut Uzunluk Ölçümleri.

Tablo 5. Deney Grubu Histopatolojik Bulguları.

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1. Sıçan Yavrularının Total Vücut Ağırlık Ölçümleri

Grafik 2. Sıçan Yavrularının Vücut Uzunluk Ölçümleri.



RESİM ALT YAZILARI

Resim 1. Kontrol Grubu: Sıçan derisinin panoromik görünümü (Toluidin Blue, Orjinal Büyütme X 41).

Resim 2. Kontrol Grubu: Büyük büyütmede epidermisin (ep) detaylı görünümü (Toluidin Blue, Orjinal Büyütme X 164).

Resim 3. Kontrol Grubu: Kıl folikülleri (kf) ve bunlara ilişkin yağ bezleri (yb) tabii görünümü (Toluidin Blue, Orjinal Büyütme X 82).

Resim 4. SX Grubu: Epidermiste atrofi (a), kıl folikülleri (kf), ve yağ bezlerinde (yb) sayıca azalma ve atrofi izlenmekte (Toluidin Blue, Orjinal Büyütme X 41).

Resim 5. SX Grubu: Epidermiste hiperkeratoz (h) ve/veya parakeratoz yanında epidermal çıkıntılarda düzleşme (←→) izlenmekte. (Toluidin Blue, Orjinal Büyütme X 164).

Resim 6. SX Grubu: Kıl folikülü (kf) ve yağ bezlerinde (yb) atrofi (Toluidin Blue, Orjinal Büyütme X 82).

Resim 7. SX+EGF Grubu: Epidermis (ep) ve dermisin (d) kontrol grubuna benzer görünümü (Toluidin mavisi, Orjinal Büyütme X 41).

Resim 8. SX+EGF Grubu: Epidermal çıkıntılarıyla (ok başı) karakterize epidermisin (ep) normal görünümü izlenmekte (Toluidin Blue, Orjinal Büyütme X 164).

Resim 9. SX+EGF Grubu: Kıl folikülleri (kf) ve yağ bezlerinin (yb) kontrol grubuna eşdeğer görünümü (Toluidin Blue, Orjinal Büyütme X 82).

Resim 10. Kontrol Grubu: Epidermis hücreleri arasındaki bağlantı birimleri (Uranil Asetat-Kurşun Sitrata, Orjinal Büyütme X 3000).

Resim 11. Kontrol Grubu: Bazal membran (➡) kalınlığı, hemidesmozom (h) ve kollagen (k) içeriği normal yapıda izlenmektedir. (Uranil Asetat- Kurşun Sitrat X 4400).

Resim 12. SX Grubu: Epidermis bazal membranında yer yer incelme (→)ve hemidesmozom kaybı. (Uranil Asetat Kurşun Sitrat. X 20.000).

Resim 13. SX Grubu: Epidermal hücreler arasında bağlantı birimlerinde kırılma nedeniyle hücreler arasında geniş açıklıklar (*) izlenmekte (Uranil Asetat Kurşun Sitrat X 4400).

Resim 14. SX Grubu: Normal epidermal hücreler arasında nekroze hücre (nh) dikkati çekmektedir (Uranil Asetat -Kurşun Sitrat X 3000).

Resim 15. SX+EGF Grubu: Epidermis bazal membranı (→) her yerde aynı kalınlıkta ve hemidesmozomların düzenli aralıklarla dizilimi (Uranil Asetat- Kurşun Sitrat X 3000).

Resim 16. SX uranil asetat +EGF Grubu: Epidermis hücreleri arasındaki bağlantı birimleri normal yapıda izlenmektedir (Uranil Asetat -Kurşun Sitrat X 12000).

KISALTMALAR

a	:Atrofik Epidermis
ANOVA	:Tek yönlü varyan analizi
cm	:Santimetre
d	:Dermis
DÜSAM	:Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi
EGF	:Epidermal Growth Faktör.
ep	:Epidermis
h	:Hemidesmozom
hk	:Hiperkeratoz
K	:Kontrol Grubu
k	:Kollagen
kf	:Kıl Folikülü
kDa	:Kilodalton
n	:Birey sayısı
NGF	:Nevre Growth Faktör
nh	:Nekrotik Hücre
P	:Olasılık
SD	:Standart sapma
SX	:Sialoadenektomi
SX+EGF	:Sialoadenektomi+Epidermal Growth Faktör
TEM	:Taramalı elektron mikroskobu
TUKEY	:Çoklu karşılaştırma testi.
yb	:Yağ Bezi
$\bar{x}$	:Ortalama
μg	:Mikrogram
μm	:Mikrometre
$\rightarrow$	:Bazal Membran
$\blacktriangleright$	:Dermal Papilla
*	:Hücrelerarası açıklık

ÖZET

DERİ GELİŞİMİNDE SIALOADENOKTEMİ VE EPİDERMAL GROWTH FAKTÖR'ÜN ROLÜ

Bu çalışmada Epidermal Growth Faktör'ün (EGF) deri gelişimi üzerine etkisi araştırılmıştır.

Çalışmada 36 adet erişkin dişi Spraque-Dawley rat kullanıldı. Ratlar kontrol, sialoadenektomi (SX) ve sialoadenektomi+epidermal growth faktör (SX+EGF) grubu olmak üzere 3 eşit gruba bölündü.

Kontrol dışında diğer iki denek grubunda sialoadenektomi gerçekleştirildi. Yirmibir günlük iyileşme döneminden sonra çiftleşmeye alındı. SX+EGF grubu ratlara ayrıca gebeliğin 16,17,18 ve 19. günlerinde oral yolla her bir hayvana 12.5µg/gün hesabıyla EGF verildi.

Gebelik sonrası elde edilen sıçan yavrularının 28. güne kadar büyümeleri sağlandı.

Tüm gruplardaki 28 günlük sıçan yavrularının total vücut ağırlıkları alınarak sakrifiye edildi. İnterskapular bölgeden alınan deri örnekleri ışık ve elektron mikroskopik inceleme için takibe alındı.

İstatistiksel olarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve çoklu karşılaştırma testi (TUKEY) ile değerlendirildi.

SX grubu deri kesitlerinde epidermiste atrofi, hiperkeratoz, kıl folikülleri ve yağ bezlerinde azalma ile birlikte bazal membranda yer yer incelme, hemidesmozom kaybı ve nekroze hücreler görüldü.

SX+EGF grubu deri kesitlerinde ise kontrol grubuna yakın bir tablo izlendi.

Deri gelişiminde epidermal growth faktör önemli role sahipti.

Anahtar Kelimeler: Epidermal growth faktör, Sıçan Derisi, sialoadenektomi.

SUMMARY

THE EFFECT OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR AND SIALOADENECTOMY ON DEVELOPMENT OF SKIN IN RAT LITTERS

In the present study, the effect of epidermal growth factor (EGF) on skin development was investigated.

In the study 36 adult female Sprague-Dawley rats were used. The rats were divided into 3 equal groups; control group, sialoadenectomy group(SX) and sialoadenectomy + Epidermal growth factor group (SX +EGF).

Submaxillary glands were removed at two experimental groups except control group. The rats were mated after the recovery period of 21 days. However on the days 16,17,18 and 19th of the pregnancy, EGF was given with the dosage of 12.5 µg daily to each animal with orogastric tube.

The rat litters following pregnancy were kept to grow up until the 28th day. On the 28th day, the rat litters of all groups were sacrificed before their body weights had been taken. The samples of skin that been taken from the interscapular area were proceeded for examination under light and electron microscopy.

Istatistically, these datas were evaluated with one way variance analysis (ANOVA) and multiple comparision test (TUKEY).

In the samples of SX group skin; atrophic epidermis, hyperkeratosis, decreased at hair follicules and sebaceous glands were observed. In addition, it was seen that the basal membran partially became thin, the missing of hemidesmosome and necrotic cells.

At the samples of the skin of SX + EGF group the view was near the control group.

EGF has an important role in the development of rat skin.

Keywords: Epidermal Growth Factor, Rat Skin, Sialoadenectomy.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

İlk kez erkek farelerin submandibular bezinden izole edilen EGF, 6000 kilodalton (kDa) ağırlığında tek zincirli bir polipeptid hormondur (1). Submandibular tükürük içeriğinin enjekte edildiğin yeni doğmuş farelerde göz kapağının erkenden açılması ve kesici dişlerin erkenden çıkması ile fark edilmiştir (1).

Deri ve gastrik mukoza yaralarının iyileşmesinde EGF'nin önemli rol üstlendiği pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (2,3,4). Hutson ve arkadaşları (2), EGF'nin etkisiyle derideki yaraların daha çabuk iyileştiğine işaret etmişlerdir. Gerçi tükürüğün içinde EGF'nin yanı sıra yara iyileşmesinde etkin olan pek çok biyolojik substans olduğu bilinmektedir ki EGF'nin deri üzerine topikal uygulanması sonucu derideki yaraların iyileşmesini hızlandırdığı bilinen bir gerçektir (3).

Sialoadenektomi gerçekleştirilen ratlarda gastrik ülser yaralarında iyileşmenin geciktiği, buna karşın intragastrik EGF uygulamasıyla olumlu yanıtlar alındığı rapor edilmiştir (4,5).

Normal derinin bazal tabakasındaki epidermal hücreler sürekli çoğalır ve keratinize hücrelerin kaynağını oluştururlar. İn vivo ortamda EGF epidermal hücrelerin proliferasyonu için gereklidir. Kültür ortamında EGF, epidermal hücre proliferasyonunu stimüle eder (6). Yeni doğan farelere belli miktarda EGF verildiğinde epidermis kalınlığında artış görülmesine karşın erişkin farelerin epidermisinde bu tablo gözlenmez (7).

Farelerin dolaşım sisteminde bulunan EGF büyük çapta submandibular bez tarafından salgılanmaktadır (8).

Kandaki EGF'nin en büyük kaynağını oluşturan submandibular bez, cerrahi olarak ekstirpe edildiğinde (sialoadenektomi) EGF miktarı ölçülemeyecek düzeye iner. EGF farelerde önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir (9,10).

Tsutsumi ve Kubota, (11) sialoadenektominin epidermise olası etkisini, bu etkiyi önlemede EGF ve antiserum EGF'nin rolünü araştırmışlardır. Bu araştırma sonucunda, epidermal hücrelerin normal yapılarının korunmasında EGF'nin fizyolojik yönden öneme haiz olduğunu rapor etmişlerdir.

Mitojenik bir polipeptid hormon olarak bilinen EGF, in vivo ortamda ektodermal (epitelial) ve endodermal hücreler ile in vitro ortamda fibroblastları stimüle eder (12).

Erkek sıçanların submandibular bezlerinin dişilerinkine oranla daha fazla EGF ürettiği ve üçüncü haftanın sonunda çok düşük seviyede olduğu gözlenmiştir. Bu tablo, submandibular bezin dolaşımdaki EGF'nin kaynağı olduğunu göstermektedir. Her ne kadar Lui (13), yaptığı bir çalışmada tükürükteki EGF'nin normal tat tomurcuğu morfolojisinin sürdürülmesinden sorumlu olduğuna işaret etse de, bunun nasıl gerçekleştirildiğine dair ipuçları elde edilmemiştir. EGF'nin çeşitli hücre türleri üzerinde etkinliği olduğu bilinmekle beraber, esas fonksiyonu adından da anlaşıldığı üzere epitel gelişimi ve maturasyonu üzerinedir.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Deney Hayvanları

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Etik Kurul onayı alındıktan sonra Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma merkezinde (DÜSAM) gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada, 300-340 gram ağırlığında 36 adet erişkin dişi Spraque-Dawley türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar Kontrol (K), Sialoadenektomi (SX) ve Sialoadenektomi+Epidermal Growth Faktör (EGF) grubu olmak üzere eşit gruba (n=12) bölündü. Denek hayvanları optimal ısı 22°C olan ortamda 12 saat aydınlık, 12 saat karanlıkta barındırıldı. Deney süresince %45 nispi neme sahip ortamda bırakılan sıçanlara su ve pelet verildi.

2.2 Cerrahi İşlem:

2.2.1. Kontrol Grubu: Bu gruptaki dişi sıçanlar hiçbir işlem yapılmadan çiftleştirilmeye alındı. Vajinal smear'in mikroskopik muayenesiyle gebeliğin 1. günü tespit edildi. Doğumu takiben 28. günde sıçan yavrularının vücut ağırlıkları ölçüldü. İnterskapular bölgedeki sırt derisinden biyopsi örnekleri alınarak elektron mikroskopik inceleme için %2.5'luk tamponlanmış glutraldehitde fikse edildi.

2.2.2. Sialoadenektomi Grubu: Sıçanlara Ketamin+Xylazin kombinasyonu ile genel anestezi uygulanmasından sonra boyun bölgesine transversal ensizyon yapılarak submandibular bezleri total olarak çıkarıldı. Operasyonu takiben 3 hafta sonra plazma EGF düzeyinin düşmesi beklendi. Daha sonra deney hayvanları çiftleşmeye alınarak vajinal smear'in mikroskopik muayenesiyle gebeliğin 1. günü tespit edildi. Doğumdan sonraki 28. günde sıçan yavrularının total vücut ağırlıkları belirlendi. Genel anestezi altında interskapular bölgeden deri örnekleri alınarak %2.5'luk tamponlanmış glutraldehitte fikse edildi.

2.2.3. Sialoadenektomi + Epidermal Growth Faktör Grubu

SX grubunda olduğu gibi dişi sıçanlara sialoadenektomi operasyonu yapılarak submandibular bezleri ekstirpe edildi. Sialoadenektomiyi takiben 3 hafta sonra çiftleştirilen denek hayvanların gebeliklerinin 1.günü tespit edildi.

Gebeliğin 16,17,18 ve 19.günlerinde 12.5 µg/gün olmak üzere her sıçana toplam 50µg EGF (Human Recombinant EGF, Sigma) orogastrik sonda ile verildi (14). Gebe sıçanların fötüs sayısı ve canlılığını kontrol etmek için günlük olarak Toshiba SSA-270A, 7.5 MHz ultrason ile incelendiler. Doğumdan sonra 28. günde sıçan yavrularının total vücut ağırlıkları ve interskapular bölgeden sırt derisi örnekleri alındı.

2.3 Histolojik Metod:

Doğumdan sonra 28. günde her 3 gruba ait sıçan yavrularından genel anestezi altında interskapular bölge sırt derisinden biyopsi örnekleri alındı. Alınan biyopsi örnekleri aşağıda belirtilen Elektron Mikroskop Tekniğiyle takibe alındı (15).

- 1-Denek hayvanlarından alınan deri örneklerinin, %2.5'luk tamponlanmış gluteraldehit-paraformaldehit solusyonunda ilk tespiti yapıldı.
- 2- Doku örnekleri her 15 dakikada bir değiştirmek şartı ile 3 saat süreyle 0.1 M kakodilat tamponu (pH=7.4) ile yıkandı.
- 3- Yıkamadan sonra doku örnekleri %2'lik ozmik asitte post fiksasyona tabi tutuldu.
- 4- Osmium tetroksit tespitinden sonra dokular kakodilat tamponu ile 2x10 dakika olmak üzere toplam 20 dakika süreyle yıkandı.
- 5- 30⁰ Alkol (1)-----15 dakika
30⁰ Alkol (2)-----15 dakika
50⁰ Alkol (1)-----15 dakika
50⁰ Alkol (2)-----15 dakika
70⁰ Alkol (1)-----15 dakika
70⁰ Alkol (2)-----15 dakika
olmak üzere toplam 90 dakika düşük dereceli alkollerden geçirilip 70⁰ Alkol içinde dokular 1 gece buzdolabında bırakıldı.
- 6- Dokular
70⁰ Alkol-----50 ml
Uranil Asetat-----0.25 gr
Phosphotungstik Asit-- 0.5 karışımı içinde 2 saat süreyle buzdolabında uranil boyamasına tabii tutuldu.
- 7- 90⁰ Alkol, Absol Alkol ve Propylen oksit serilerinden geçirildi.
90⁰ Alkol (1)-----30 dakika
90⁰ Alkol (2)-----30 dakika
Absol Alkol (1)-----30 dakika
Absol Alkol (2)-----30 dakika
Propylen Oksit (1)-----30 dakika
Propylen Oksit (2)-----30 dakika

- 8- Dokular bir gece süreyle buzdolabında Araldit+Propylen oksit (1+1) karışımında bırakıldı.
- Araldit M----- 10 ml
Araldit HY 964-----10 ml
Araldit DY 064 -----10 ml
Dibutil Ftilat-----0.5 ml
- 9- Ertesi gün, blok yapmak için yeniden taze olarak hazırlanan Araldit karışımında dokular 2 saat süreyle oda ısısında rotatorda döndürölüp kalan Araldit ile bloklama yapıldı.
- 10- Bloklar yapıldıktan sonra
- 24 saat süreyle -----etüvde 45⁰C'de
24 saat süreyle -----etüvde 60⁰C'de
tutuldu. Sonra etüv kapatılıp bloklar etüvden çıkarılmadan kendi kendilerine soğuyup sertleştirildi.
- 11- Ultramikrotom ile bloklardan 1'er mikrometre (μm) kalınlığında yarı ince kesitler alındı.
- 12- Yarı ince kesitler Toluidin Blue ile boyandıktan sonra ışık mikroskobunda incelenerek mikrografları alındı.
- 13- Daha sonra ultramikrotomda 300-700 Å⁰ kalınlığında ince kesitler alınıp, Uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandıktan sonra Taramalı Elektron Mikroskop (TEM) ile incelenip mikrografları alındı.

2.4. İstatistiksel Analiz

Her üç deney grubu sıçan yavruları doğumdan hemen sonra total vücut ağırlıkları (Tablo 1) ve vücut uzunlukları ölçüldü (Tablo 2).

Gruplar arası ağırlık ve uzunlukları one-way (ANOVA) ile test edildi. Daha sonra gruplar arasındaki farkları karşılaştırmak için çoklu karşılaştırma yapılarak Turkey HSD testi uygulandı.

3. BULGULAR

Fötüslerin çok küçük olması nedeniyle gebeliğin birinci haftasında ultrasonoğrafiyle saptanamadılar. Birinci haftadan sonra fötüslerin rezorbe olması veya ölü doğum vakalarına rastlanmadı. Kontrol ve deney grubu sıçan yavrularının cinsiyet ortalama sayısı birbirine yakın bulundu (Tablo 1-2).

Tablo-I Sıçan Yavru Sayısının Gruplara Dağılımı

Dişi No	Kontrol Grubu	SX Grubu	SX+EGF Grubu
1	8	10	9
2	10	7	8
3	11	8	9
4	7	6	9
5	9	11	7
6	8	9	8
7	8	8	10
8	10	8	10
9	10	9	10
10	11	9	11
11	8	10	8
12	9	8	8
Toplam	108	106	107
Ortalama	9	9	9

Tablo-2 Kontrol ve Deney Grubu Sıçan Yavrularının Cinsiyete Göre Dağılımı

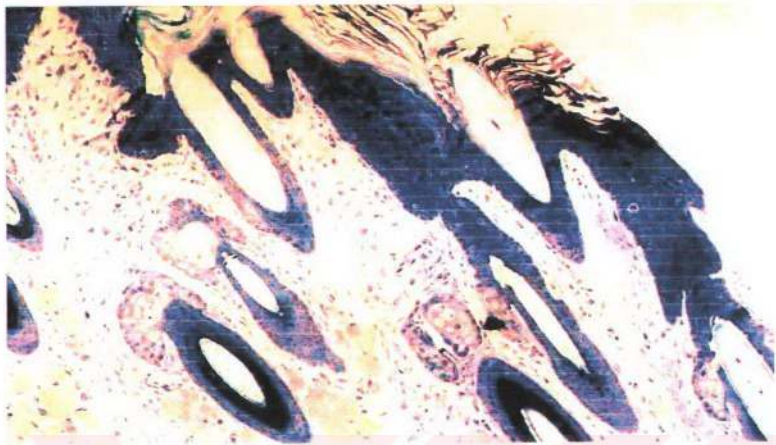
Anne No	Kontrol Grubu		SX Grubu		SX+EGF Grubu	
	Erkek	Dişi	Erkek	Dişi	Erkek	Dişi
1	4	4	4	6	6	3
2	4	6	4	3	4	4
3	6	5	4	4	5	4
4	5	2	2	4	3	6
5	1	6	8	3	4	3
6	3	5	3	6	3	5
7	4	4	4	4	5	5
8	6	4	6	4	6	4
9	4	6	5	5	5	5
10	6	5	3	6	4	7
11	4	4	4	6	3	5
12	3	5	4	4	6	2
Toplam	50	56	51	55	54	53
Ortalama	4	5	4	5	5	4

SX ile SX+EGF grubu sıçan yavrularının vücut uzunluğu ve total vücut ağırlığı ortalaması kontrol grubundan az bulundu (Tablo3-4).

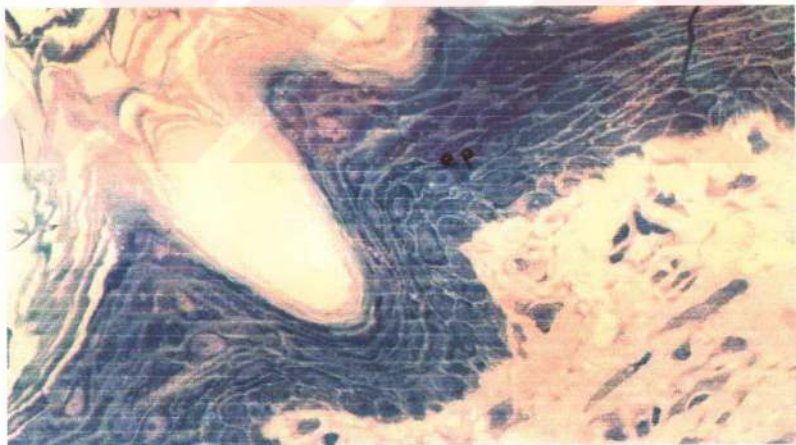
3.1. Derinin Işık Mikroskopik Bulguları

3.1.1. Kontrol Grubu

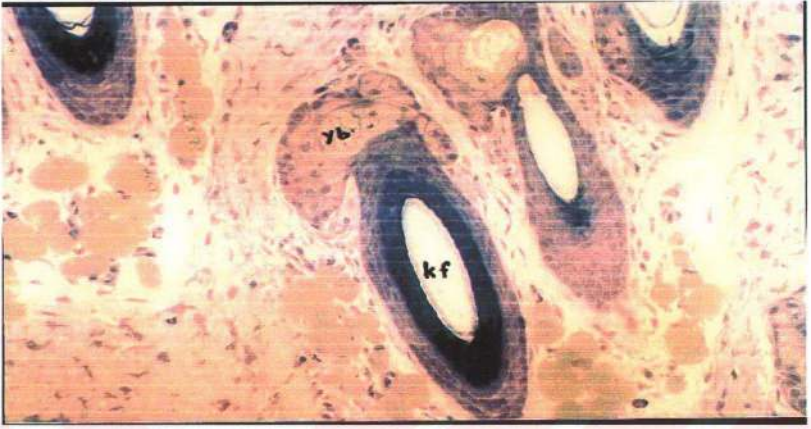
Epidermisin yüzeyindeki keratinize yassı hücreler ile bunların altında yer alan 4-5 sıra epidermal hücreler izlendi. Bazal hücre tabakası kübik görünümlü (Resim:1-2), ve epidermal oluşumlar normal olarak izlendi (Resim 3).



Resim1. Kontrol Grubu: Sıçan derisinin panoromik görünümü (Toluidin Blue, Orjinal Büyütme X 41).



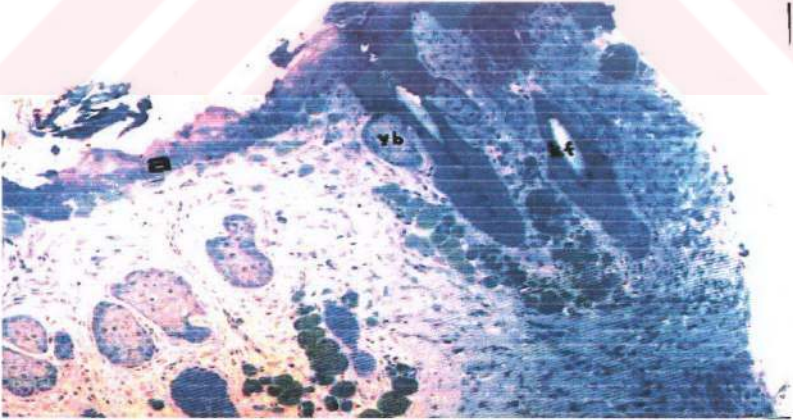
Resim2. Kontrol Grubu: Büyük büyütmede epidermisin (ep) detaylı görünümü (Toluidin Blue, Orjinal Büyütme X 164).



Resim 3. Kontrol Grubu: Kıl folikülleri (kf) ve bunlara ilişkin yağ bezleri (yb) doğal görünümü (Toluidin Blue, Orjinal Büyütme X 82).

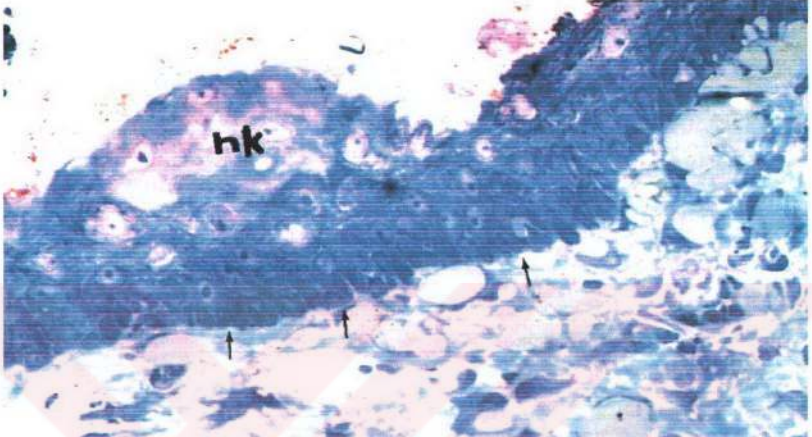
3.1.2. Sialoadenektomi Grubu:

Bu gruba ait deri örnekleri kontrol grubuyla kıyaslandığında sıçan derisiyle kıyaslandığında epidermiste atrofi, hiperkeratozis ve/veya parakerotozis izlenmekteydi (Resim:4-5).

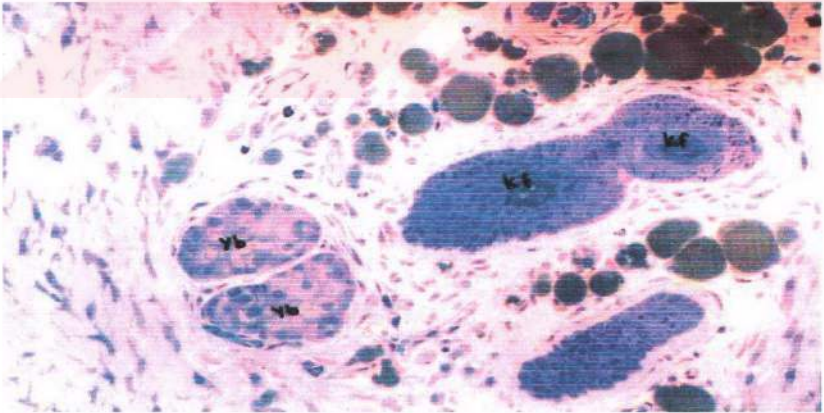


Resim 4. SX Grubu: Epidermiste atrofi (a), kıl folikülleriyle (kf) yağ bezlerinde (yb) sayıca nispi azalma ve atrofi dikkati çekmektedir (Toluidin Blue, Orjinal Büyütme X 41).

Genel olarak deri kesitlerinde kıl folikülleri ve yağ bezlerinde azalmayla birlikte atrofi görüldü. Epidermal çıkıntılarda düzleşme dikkat çekiciydi (Resim:5-6).



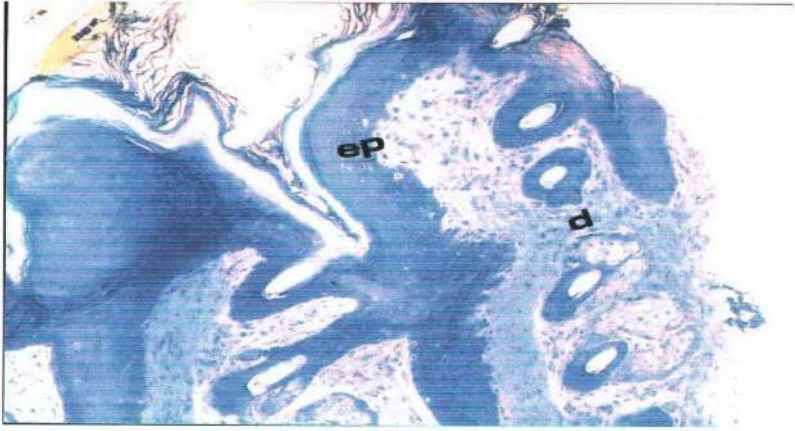
Resim 5. SX Grubu: Epidermisde hiperkeratoz (hk) ve/veya parakeratoz yanında epidermal çıkıntılarda düzleşme (ince ok). (Toluidin Blue, Orjinal Büyütme X 164).



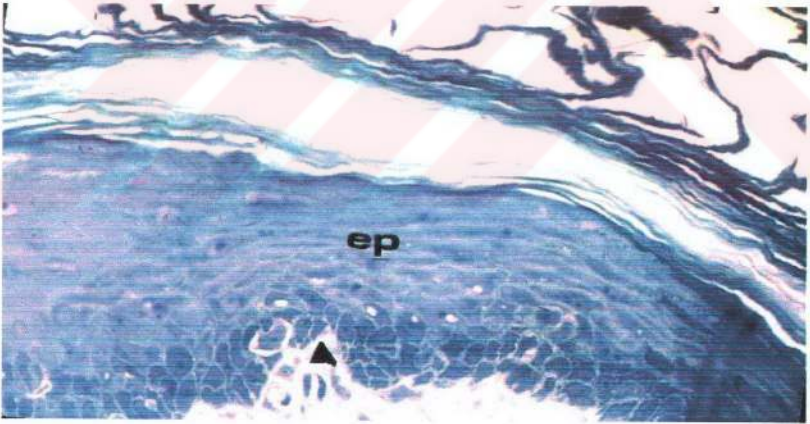
Resim6. SX Grubu: Kıl folikülü (kf) ve yağ bezlerinde (yb) atrofi (Toluidin Blue, Orjinal Büyütme X 82).

3.1.3. Sialoadenektomi+Epidermal Growth Faktör Grubu:

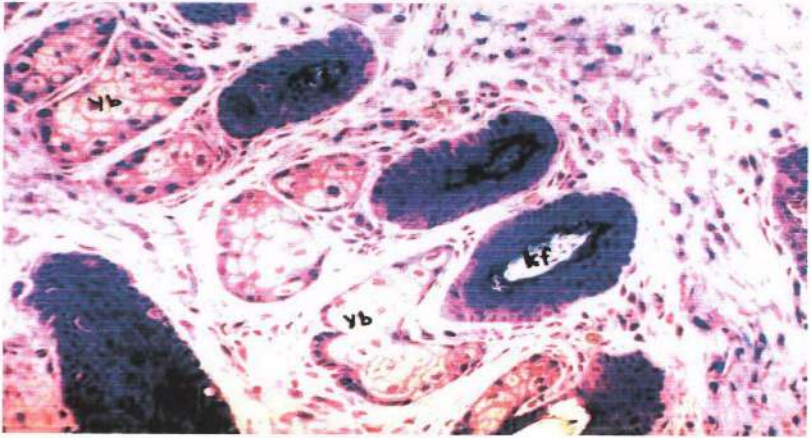
Bu grupta gerek epidermin (Resim:7-8) ve gerekse dermisteki kıl folikülleri ile yağ bezleri görünümü kontrol grubuna yakın bir görünüm arz ediyordu (Resim: 9).



Resim 7. SX+EGF Grubu: Epidermis (ep) ve dermisin (d) kontrol grubuna benzer görünümü (Toluidin mavisi, Orjinal Büyütme X 41).



Resim 8. SX+EGF Grubu: Epidermal çıkıntılılarıyla (ok başı) karakterize epiderminin (ep) normal görünümü (Toluidin Blue, Orjinal Büyütme X164).



Resim 9. SX+EGF Grubu: Kıl folikülleri (kf) ve yağ bezlerinin (yb) kontrol grubuna eşdeğer görünümü (Toluidin Blue, Orjinal Büyütme X 82).

Tablo-5 Deney Grubu Histopatolojik Bulguları

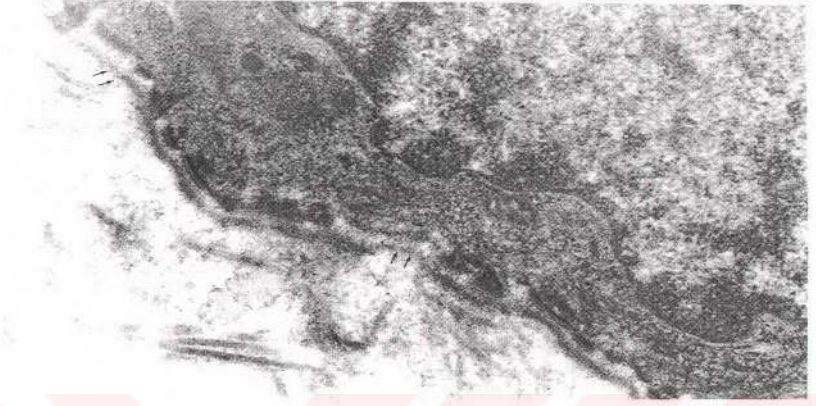
Histopatolojik Bulgular	SX Grubu (n=106)	SX+EGF Grubu (n=107)
Hiperkeratoz ve/veya parakeratoz	43	5
Atrofik Epidermis	50	7
Atrofik Kıl Folikülü ve Yağ Bezleri	50	8
Yağ Bezlerinde Azalma	54	9

3.2. Derinin Elektron Mikroskopik Bulguları

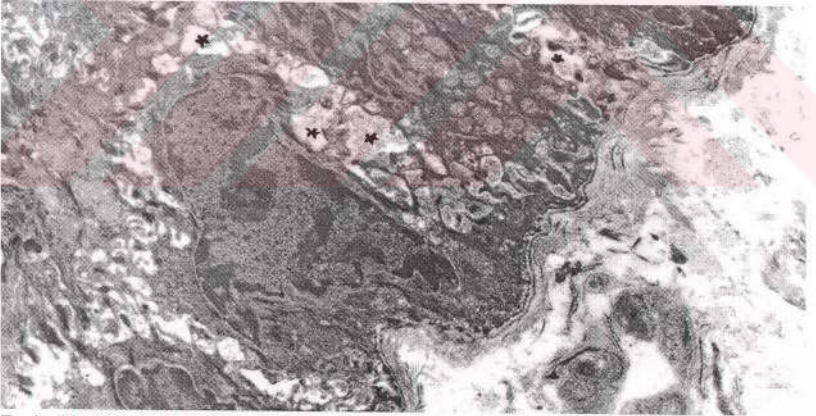
3.2.1. Kontrol Grubu

Bazal membran kalınlığı, hemidesmozomlar ve epidermis hücreleri arasındaki bağlantı birimleri beklenen kontrol grubu yapısında izlendi (Resim:10).

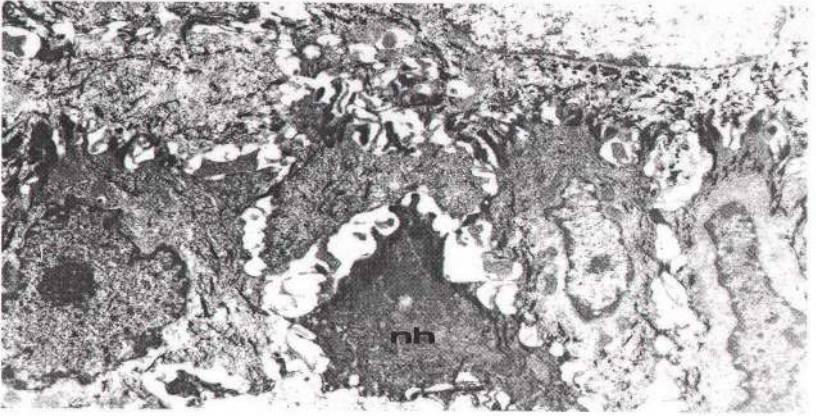
Dermis ve epidermisin diğer elemanları ile kollagen içeriği normal yapıda izlendi (Resim:11).



Resim12. SX Grubu: Epidermis bazal membranında yer yer incelme (ince ok) ve hemidesmozom kaybı. (Uranil Asetat -Kurşun Sitrat X 20.000).



Resim13. SX Grubu: Epidermal hücreler arasında bağlantı birimlerinde kırılma nedeniyle hücreler arasında geniş açıklıklar (*) izlenmekte (Uranil Asetat - Kurşun Sitrat X 4400)

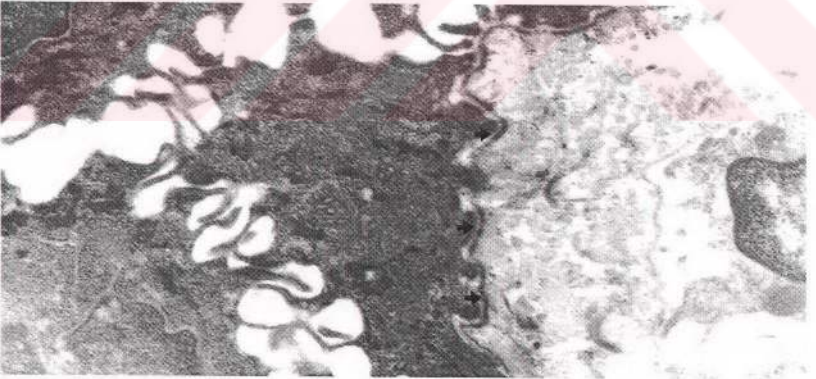


Resim14. SX Grubu: Normal epidermal hücreler arasında nekroze hücre (nh) dikkati çekmektedir (Uranil Asetat - Kurşun Sitrat- X 3000).

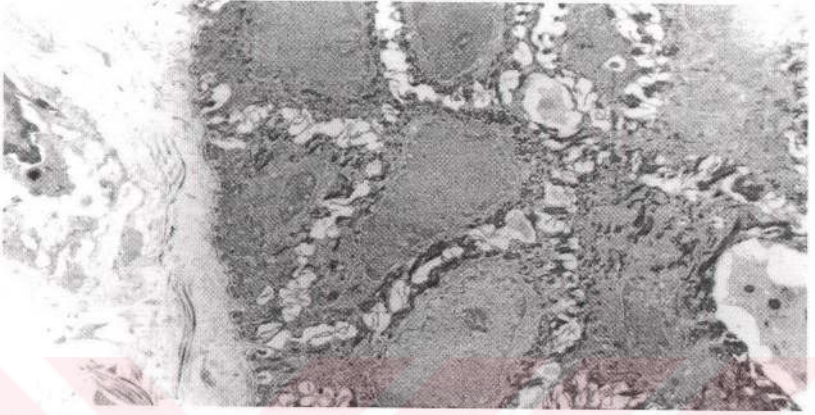
3.2.3. Sialoadenektomi+Epidermal Growth Faktör Grubu

Epidermis bazal membranı her yerde aynı kalınlıkta ve hemidesmozomlar düzenli aralıklarla dizilim gösteriyordu (Resim:15).

Epidermis hücreleri arasındaki bağlantı birimleri normal yapıda, nekroze hücre gözlenmedi (Resim:16).



Resim15. SX+EGF Grubu: Epidermis bazal membranı (ok) her yerde aynı kalınlıkta ve hemidesmozomların düzenli aralıklarla dizilimi (Uranil Asetat - Kurşun Sitrat X12000).



Resim16. SX +EGF Grubu: Epidermis hücreleri arasındaki bağlantı birimleri normal yapıda izlenmektedir (Uranil Asetat -Kurşun Sitrat X 3000).

3.3. İstatistiksel Analiz

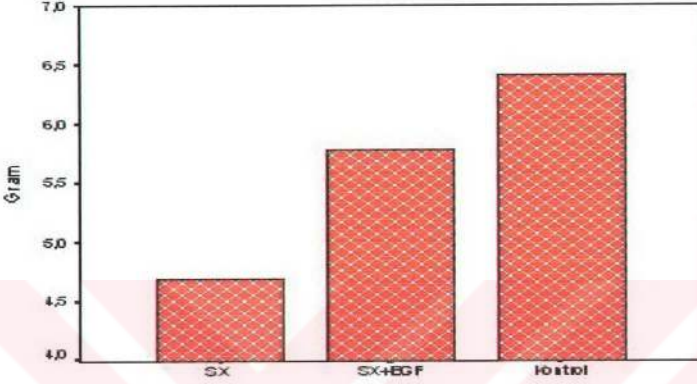
3.3.1. Total Vücut Ağırlığı

Yirmi sekiz günlük sıçan yavrularının vücut ağırlıkları ortalaması alındı. Gruplar arası ağırlıkları One-way (ANOVA) ile test edildi (Tablo-3 Grafik 1). İstatistiksel olarak üç grup arasında önemli bir fark bulundu ($P<0.001$). çoklu karşılaştırma yapıldı ve TUKEY HSD testi uygulandı. Sonuçta;

- Kontrol grup ile SX grubu,
- Kontrol grup ile SX+EGF grubu,
- SX grup ile SX+EGF grubu arasında anlamlı bir fark bulundu ($P<0.05$).

Tablo-3: Sıçan Yavrularının Total Vücut Ağırlık Ölçümleri.

Dişi Rat	Kontrol Grubu	SX grubu	SX+EGF Grubu
1	6.68 gr	5.10 gr	5.90 gr
2	6.50 gr	4.74 gr	5.92 gr
3	6.54 gr	4.75 gr	5.80 gr
4	6.24 gr	4.50 gr	5.50 gr
5	6.25 gr	4.58 gr	5.60 gr
6	6.42 gr	4.60 gr	5.80 gr
7	6.70 gr	4.55 gr	5.95 gr
8	6.24 gr	4.50 gr	5.80 gr
9	6.40 gr	4.75 gr	5.78 gr
10	6.30 gr	4.70 gr	5.75 gr
11	6.32 gr	4.72 gr	5.75 gr
12	6.35 gram	4.80 gram	5.82 gram
X±SD	6.410±0.159	4.690 ±0.165	5.780±0.127



Grafik1: Sıçan Yavrularının Total Vücut Ağırlık Ölçümleri

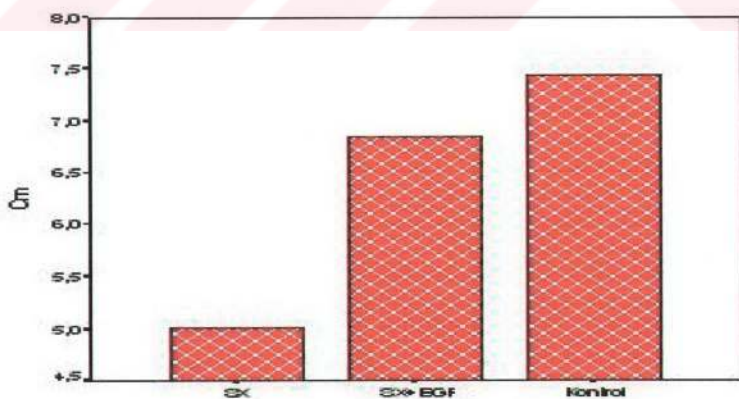
3.3.2. Vücut Uzunluk Ölçümleri

Yirmi sekiz günlük sıçan yavrularının ortalama vücut uzunlukları ölçüldü. Gruplar arası vücut uzunlukları one-way (ANOVA) ile test edildi (Tablo-4, grafik-2). İstatistiksel yönden üç grup arasında anlamlı farklılık bulundu ($P<0.001$). Çoklu karşılaştırma yapılarak TUKEY HSD testi uygulandı. Sonuç olarak;

- Kontrol grup ile SX grubu,
- Kontrol grup ile SX+EGF grubu,
- SX grup ile SX+EGF grubu arasında anlamlı bir farklılık bulundu ($P<0.05$).

Tablo-4: Sıçan Yavrularının Vücut Uzunluk Ölçümleri.

Dişi No	Kontrol Grubu	SX Grubu	SX+EGF Grubu
1	8.00 cm	5.25 cm	7.05 cm
2	7.20 cm	5.00 cm	6.90 cm
3	7.75 cm	5.18 cm	7.10 cm
4	7.80 cm	5.20 cm	7.09 cm
5	7.00 cm	4.95 cm	6.85 cm
6	8.10 cm	5.27 cm	6.98 cm
7	6.50 cm	4.90 cm	6.00 cm
8	7.50 cm	5.00 cm	6.55 cm
9	7.00 cm	4.90 cm	6.84 cm
10	7.45 cm	5.10 cm	6.80 cm
11	7.40 cm	5.15 cm	7.00 cm
12	7.48 cm	5.16 cm	7.04 cm
X±SD	7.431± 0.458	5.005±0.260	6.850± J 0.309



Grafik 2. Sıçan Yavrularının Vücut Uzunluk Ölçümleri.

4. TARTIŞMA

Daha önce sıçan ve farelerde yapılan çalışmalarda (10) sialoadenektomi'nin plazma EGF düzeyini düşürdüğü ve submandibular bezin EGF'nin yegane kaynağı olduğu rapor edilmiştir.

Farelerin serum ve plazmasında EGF konsantrasyonu birbirine yakın bulunmuştur (16). Arancibia ve arkadaşları (17) submandibular bezin EGF ve nevre growth factor (NGF) adıyla bilinen iki önemli hormonal büyüme faktörü salgıladığını vurgulamışlardır. Bunlardan EGF'nin çeşitli biyolojik aktivitelerde rol aldığı ve aynı zamanda insisiv dişlerin çıkışı, yara iyileşmesi, epitelial oluşumların gelişimi, hipofizden adrenokortikotrop ve growth hormonlarının uyarımı, mide ve troid hormonlarının inhibisyonu gibi pekçok işlevi de üstlendiği rapor etmişler.

Spermatogenezis sürecindeki germ, Sertoli ve interstisiyel hücrelerde EGF reseptörlerine işaret eden araştırmacılar (18) bu hormonun erkek üreme sisteminin gelişiminde önemli bir role sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir.

EGF, Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteronun salgılanmasını düzenleyerek spermatogenezisi direkt veya indirekt şekilde etkilemektedir (19,20,21).

Sekiz haftalık farelerde yapılan bir çalışmada; sialoadenektominin üreme organlarında ve total vücut ağırlığında bir azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (22). Bizim çalışmamızda sialoadenektomi grubu sıçan yavrularının total vücut ağırlığında belirgin bir azalmanın olduğu tablo-3'te işaret edilmiştir. Bu durum EGF'nin normal gelişim için önemli bir mediatör olduğunu göstermektedir.

Tsutsumi ve Oka'nın (11) sialoadenektomi ve antiserum EGF ile yaptıkları deneysel çalışmada; sialoadenektomi sonucu epidermin belirgin bir şekilde incelendiği, buna karşın dermis ve hipodermiste kayda değer değişikliklerin oluşmadığını gözlemişler. Bizim çalışmamızın sialoadenektomi grubunda, atrofik epidermis yanında, kıl folikülleri ile yağ bezlerinde hem sayıca azalma hem de atrofi görüldüğünü (Resim: 4, 6), oysa SX+EGF grubu sıçan derilerinde bu tablonun oluşmadığını vurgulamak isteriz.

Shinzabur ve arkadaşlarının (23) yaptıkları çalışmada, submandibular bezleri ekstirpe edilen farelerin tükürüğünde EGF konsantrasyonunun azaldığı ve bunun sonucu olarak dil yaralarının iyileşmesinde bir gecikme gözlemişler. Daha sonra oral yolla EGF replasmanında

dildeki yara iyileşmesinin hızlandığı rapor edilmiştir. Sialoadenektomili farelerdeki yara iyileşmesinin normal sağlıklı farelerdeki yara iyileşmesine göre iki günlük bir gecikme gösterdiği bildirilmiştir.

Öte yandan Hutson ve çalışma ekibi (24), Sialoadenektomili ve normal sıçanların deri yara iyileşmesinde çarpıcı bir bulgu kaydetmişlerdir. Gözlemlerine göre derideki yara iyileşmesinin, mukoza ile örtülü organlardan daha geç olduğunu saptamışlar. Bunun başlıca nedeni derinin keratinize epitelle örtülü olmasından kaynaklanmaktadır. Gastroduodenal ülserlerde hızlı iyileşmenin nedeni, mukoza epitelinin EGF'nin etkisiyle sıkça kendini yenilemesinin bir sonucu olabilir.

Tsutsumi ve Kubota (11) adlı araştırmacılar ise sialoadenektomiden hemen sonra EGF uygulanan fare epidermisinde bir inceltme saptadıklarını ve bunun doza bağlı olarak düzeldiğini rapor etmişlerdir. Günlük 1-5 µg EGF uygulamalarında epidermiste atrofinin önleildiği, buna karşın 0.2 µg uygulamalarında fazla etkin olmadığını izlemişler. Aynı araştırmacılar diğer bir çalışmada ise; sialoadenektomi sonrası, 3 hafta beklenmiş bu dönem sonunda epidermin çok incelmediğini, daha sonra 3 haftalık ekzojen EGF replasmanı sonunda epidermin normal görünümüne kavuştuğunu ve histolojik yönden normal fare derisinden ayırt edilemediğini vurgulamışlardır.

Çalışmamızın sialoadenektomi uygulanan deney grubu epidermisindeki atrofinin, Tsutsumi ve Kubota'nın (11) bulgularına paralellik arzemesine karşın kıl folikülleri ve yağ bezlerinde sayıca azalma ve atrofik durum tezat oluşturmuyordu.

Son zamanlarda epidermin bazal tabakasındaki epitelial hücrelerin EGF reseptörlerine sahip olduğu buna karşın üst tabakaların EGF reseptörlerinden yoksun olduğu ileri sürülmüştür. Bundan hareketle bazal tabakayı oluşturan epitelial hücrelerin proliferatif aktivasyon gösterdiği oysa öbür tabakalardaki epitelial hücrelerin farklılaşma yönünde geliştiği rapor edilmiştir (25).

Epidermal Growth Faktör, epidermal bazal hücrelerde mitotik aktiviteyi artırdığı (26) gibi yara iyileşmesinde de rol oynamaktadır (27). Bu bulgular EGF'nin, epidermis bazal hücrelerinde proliferasyonu desteklediğine işaret etmektedir.

Çalışmamızın sialoadenektomi grubu elektron mikroyraflarında; bazal membranda yer yer inceltme, hemidesmozom kaybı, epidermal hücreler arasında bağlantı birimlerinde geniş açıklıkların görülmesi ve nekroze hücrelerin varlığı dikkat çekiciydi (Resim12-14). Buna karşın SX+EGF grubu epidermislerinde bu tür yapısal bozukluklar izlenmedi (Resim15-16).

Bazı araştışıcılar (11) sialoadenektomili farelerde epidermis kalınlığının bir iki sıra hücreden oluştuğuna işaret etmişlerdir. EGF eksikliği sonucu ortaya çıkan bu tablo EGF replasmanıyla düzelmekte ve normal epidermise dönüşmektedir. EGF eksikliği epidermal hücrelerde keratinizasyonu etkilemediğinden stratum korneum normal görünümünü muhafaza etmektedir. Aynı zamanda dermisteki epidermal oluşumlar ile hipodermisin normal morfolojik görünümlerini muhafaza ettikleri rapor edilmiştir. Bu sonuçlar submandibular bezden orjin alan EGF'nin epidermis bazal hücre tabakasının idamesinde önemli bir fizyolojik role sahip olduğunu göstermektedir.

Sonuç : Submandibular bezden salgılanan Epidermal growth faktör, derinin gelişimi ve korunmasında önemli bir role sahiptir.

5. KAYNAKLAR

- 1- Cohen, S.: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J.Biol.Chem.*1962;237:1555-1562.
- 2- Olsen, P.S., & Nexø, E.: Quantitation of epidermal growth factor in the rat: identification and partial characterization of duodenal EGF. *Scand J. Gastroenterol.* 1983;18: 771-776.
- 3- Niall, M. et al.: Localization of epidermal growth factor on wound healing in mice. *J.Surg.Res.*1982;33: 164-169.
- 4- Olsen, P. et al: Role of submandibular saliva and epidermal growth factor in gastric cytoprotection. *Gastroenterology.* 1984; 87: 103-108.
- 5- Konturek, S. et al.: Role of epidermal growth factor in healing of chronic gastroduodenal ulcers in rats. *Gastroenterology.* 1988; 94: 1300-1307.
- 6- Bem, J.L. & Richardson, C. B.: Stimulation of mouse epidermis by epidermal growth factor. *Journal of investigative Dermatology.* 1971; 58: 265-270.
- 7- Cohen, S. & Eliot, G.A.: The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. *Journal of investigative Dermatology.* 1963;40:1-5.
- 8- Barka, T.: Biologically active polypeptides in submandibular glands. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.*1980; 28: 836-859.
- 9- Kurachi, H. & Oka, T.: Evidence for the involvement of the submandibular gland epidermal growth factor in mouse mammary tumorigenesis. *proceedings of National Academy of sciences of the U.S.A.* 1985; 82:5940-5943.
- 10- Tsutsumi, O., Kurachi, H. & Oka, T.: A physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function. *Science.* 1986; 233:975-977.
- 11- Tsutsumi, O., Kubota, Y., Oka, T.: Effect of sialoadenectomy, treatment with epidermal growth factor (EGF) antiserum and replacement. *J. Endocrinol.* 1987;113:193-197.
- 12- Cohen, S.: The epidermal growth factor (EGF). *Cancer.* 1983; 51: 1787-1792.
- 13- Liu, A. et al.: Effect of sialoadenectomy and epidermal growth factor on testicular function of sexually mature male mice. *The Journal of Urology.* 1994; 152: 554-561.

- 14- Noguchi, S., Ohba, Y., Oka, T.: Effect of salivary epidermal growth factor on wound healing of tongue in mice. *Am. J. Physiol.* 1991;260: 620-625.
- 15- Reynolds, G.: *Handbook of Histological Techniques*, 2nd edition, Department of Histopatoloji, London, 1990:5-36.
- 16- Perheentupa, J., Lakshmanan, J., Hoath, S.B., et al.: Epidermal growth factor measurements in mouse plasma: method, ontogeny, and sex difference. *American Journal of Physiology*. 1985; 248: 391-396.
- 17- Arancibia, S. & Assenmachea, I.: Submaxillary glands in on endocrine context. *J.Biol.Buccal*. 1985;13:185-193.
- 18- Gupta, C. & Singh, M.: Stimulation of epidermal growth factor gene expression during the fetal mouse reproductive tract differentiation: role of androgen and receptor. *Endocrinol*. 1996;137:705-711.
- 19- Welsh, T. & Hsueh, A.J.: Mechanism of the inhibitory action of epidermal growth factor on testicular androgen biosynthesis in vitro. *Endocrinol*, 1982;110:1498.
- 20- Sordolilet, C., et al.: Epidermal growth factor directly stimulates steroidogenesis in primary cultures of porcine Leydig cells:actions and sites of action. *Endocrinol*. 1991;128:21-60.
- 21- Werhoeven, G. & Cailleau, J.: Stimulatory effects of epidermal growth factor on steroideogenesis in Leydig cells. *Molecul. Cellue. Endocrinol*. 1986;47: 99-106.
- 22- 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. *Journal of Endocrinology*. 1985;106:197-202.
- 23- Olsen, P. & Nexø, E.: Quantitation of epidermal growth factor in the rat identification and partial characterization of duodenal EGF. *Scand. J. Gastroenterol*. 1983;18:771-776.
- 24- Hutson, J.M., et al.: Effect of salivary gland on mound contraction in mice. *Nature Lond*. 1979; 279:793-795.
- 25- Green, M.R., et al.: Disturbution and number of epidermal growth factor receptors in skin is related to epithelial cell growth. *Developmental Biology*. 1983; 100: 506-512.

- 25- Steidler, N.E. & Reade, P.C.: Histomorphological effects of epidermal growth factor on skin and oral mucosa in neonatal mice. Archives of Oral Biology. 1980; 25:37-43.
- 26- Niall, M. et al.: The effect of epidermal growth factor on wound healing in mice. Journal of Surgical Research. 1982; 33: 164-169.