



T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

**FARELERDE EMBRİYOLOJİK GELİŞİM  
SÜRECİNDE EGF (EPİDERMAL BÜYÜME  
FAKTÖRÜ) ve ANTİ-EGF’NİN MICROFOLD  
(M) HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. BAHADIR KAYHAN**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Kemal ERGİN**

**AYDIN-2019**

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

**FARELERDE EMBRİYOLOJİK GELİŞİM  
SÜRECİNDE EGF (EPİDERMAL BÜYÜME  
FAKTÖRÜ) ve ANTİ-EGF’NİN MICROFOLD  
(M) HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ  
DR. BAHADIR KAYHAN**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Kemal ERGİN**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-18065 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN-2019**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında maddi manevi katkı sağlayan ve fikirlerini paylaştan, uzmanlık eğitimim sürecinde beni yönlendiren, iyi bir insan ve histoloji ve embriyoloji uzmanı olmamda yardımcı olan değerli hocam sayın Prof. Dr. Kemal ERGİN'e teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimimiz boyunca üzerimizde emeği olan, iyi bir insan olmamızda örnek olan fikir ve eleştirilerine önem verdiğimiz başta değerli hocam Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN olmak üzere sayın Doktor Öğretim Görevlisi H. Kübra BAŞALOĞLU, Doktor Öğretim Görevlisi Tülin UYSAL, Doktor Öğretim Görevlisi K. Murat GÜRSES, Doktor Öğretim Görevlisi Erkan GÜMÜŞ'e teşekkür ederim.

Tez sürecinde Merkez laboratuvarında çalışmalarımızda maddi manevi yardımını esirgemeyen, fikirleriyle yardımcı olan değerli hocamız sayın Doç. Dr. Özge ÇEVİK ve asistanı araştırma görevlisi Fatih BİRTEKOCAK'a ayrıca teşekkür ederim.

Denizli Pamukkale Üniversitesi'nde İVF eğitimi aldığım süreçte yardımcı olan değerli hocalarım Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE, Doktor Öğretim Görevlisi Nazlı ÇİL, Doktor Öğretim Görevlisi Murat Serkant ÜNAL ve değerli asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez sürecinde sürekli yanımda olan başta Dr. Erhan BAYRAK, Ayşenur BOSTANCI olmak üzere diğer Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlilerine, Biyokimya Anabilim Dalı araştırma görevlileri Ömer ERDOĞAN, Biyoistatistik Anabilim Dalı araştırma Görevlisi Hakan ÖZTÜRK'e, değerli hocamız sayın Doktor Öğretim Görevlisi Erdoğan MALATYALI'ya teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca varlıklarıyla hep yanımda olan sevgisini hissettiğim sevgili anneme babama, kardeşlerime, sevgili eşim Uzm. Dr. Merve KAYHAN'a, sevgili kızıma, annem ve baldızıma teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| TEŞEKKÜR.....                                                        | i   |
| İÇİNDEKİLER.....                                                     | ii  |
| KISALTMALAR DİZİNİ.....                                              | iv  |
| RESİMLER DİZİNİ.....                                                 | vi  |
| TABLO DİZİNİ.....                                                    | vii |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....                                                | 1   |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                               | 3   |
| 2.1. Mikrokatlantı (M) Hücreleri Genel Bilgiler.....                 | 3   |
| 2.2. Bağırsak M Hücrelerinin Morfolojik Özellikleri.....             | 4   |
| 2.3. M Hücreleri ile Eksprese Edilen Antijen Alımı Reseptörleri..... | 4   |
| 2.4. EGF (Epidermal Büyüme Faktörü).....                             | 6   |
| 2.4.1. Epidermal Büyüme Faktörünün Etkileri .....                    | 6   |
| 2.4.2. EGF ve Bağırsak Gelişimi.....                                 | 8   |
| 2.4.3. Bağırsak Bariyer Yapısı.....                                  | 9   |
| 2.4.4. EGF tarafından Sıkı Bağlantının Düzenlenmesi.....             | 10  |
| 2.4.5. EGF'nin Bakteriyel Kolonizasyona Etkisi.....                  | 11  |
| 2.5. Setuksimab.....                                                 | 11  |
| 2.6. Belirteçler.....                                                | 12  |
| 2.6.1. Spi-B.....                                                    | 12  |
| 2.6.2. GP2.....                                                      | 13  |
| 2.6.3. Üromodulin.....                                               | 13  |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                              | 14  |
| 3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı.....                       | 14  |
| 3.2. Deney Gruplarının Planlanması.....                              | 15  |
| 3.2. EGF Uygulanması.....                                            | 16  |
| 3.3. Anti-EGF Uygulanması.....                                       | 16  |
| 3.4. Deneyin Sonlandırılması.....                                    | 16  |
| 3.5. Doku Takibi.....                                                | 16  |
| 3.6. Histokimyasal Boyamalar.....                                    | 17  |
| 3.7. İmmünohistokimya Protokolü.....                                 | 18  |
| 3.8. İstatiksel Analiz.....                                          | 19  |

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| 3.9. İmmunohistokimyasal Değerlendirme.....    | 20 |
| 4. BULGULAR.....                               | 21 |
| 4.1. Hematoksilen-Eozin Değerlendirilmesi..... | 21 |
| 4.1.1. E13.5 Günlük Embriyolar.....            | 21 |
| 4.1.2. E15.5 Günlük Embriyolar.....            | 22 |
| 4.1.3. E17.5 Günlük Embriyolar.....            | 23 |
| 4.2. İmmunohistokimyasal Değerlendirmeler..... | 24 |
| 4.2.1. E13.5 Gün Embriyo Değerlendirme.....    | 24 |
| 4.2.1.1. E13.5 Gün Spi-B Boyaması.....         | 24 |
| 4.2.1.2. E13.5 Gün UMOD Boyaması.....          | 25 |
| 4.2.1.3. E13.5 Gün GP2 Boyaması.....           | 26 |
| 4.2.2. E15.5 Gün Embriyo Değerlendirme.....    | 28 |
| 4.2.2.1. E15.5 Gün Spi-B Boyaması.....         | 28 |
| 4.2.2.2. E15.5 Gün UMOD Boyaması.....          | 29 |
| 4.2.2.3. E15.5 Gün GP2 Boyaması.....           | 30 |
| 4.2.3. E17.5 Gün Embriyo Değerlendirme.....    | 32 |
| 4.2.3.1. E17.5 Gün Spi-B Boyaması.....         | 32 |
| 4.2.3.2. E17.5 Gün UMOD Boyaması.....          | 33 |
| 4.2.3.3. E17.5 Gün GP2 Boyaması.....           | 35 |
| 5. TARTIŞMA.....                               | 37 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....                      | 40 |
| ÖZET.....                                      | 42 |
| SUMMARY.....                                   | 43 |

#### KAYNAKLAR

#### ETİK KURUL KARARI

## KISALTMALAR DİZİNİ

|           |                                                          |
|-----------|----------------------------------------------------------|
| ANXA5:    | Annexin A5                                               |
| DC:       | Dendritik hücre.                                         |
| EDU:      | 5 etinil-2'-deoksiüridin                                 |
| EGFR:     | Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü                       |
| ETS:      | E26 transformasyona özgü                                 |
| FACS:     | Floresansla aktive edilen hücre sıralaması               |
| FAE:      | Folikül ilişkili epitel                                  |
| GALT:     | Bağırsak ilişkili lenfoid doku                           |
| GİS:      | Gastrointestinal sistem                                  |
| GP2:      | Glikoprotein 2                                           |
| GPI:      | Glikozilfosfatidilinozitol                               |
| HCK:      | Hematopoetik hücre kinaz                                 |
| IG A:     | İmmünglobulin A                                          |
| IL-1:     | İnterlökin-1                                             |
| JAM:      | Bağlantı Yapışma Molekülleri                             |
| mAb:      | Monoklonal antikor                                       |
| MAPK:     | Mitojen ile aktive protein kinaz                         |
| MCI:      | M hücresi indükleyicisi                                  |
| mCRC:     | Metastatik kolorektal kanserli (mCRC)                    |
| MSS:      | Merkezi Sinir Sistemi                                    |
| Na:       | Sodyum                                                   |
| PBS:      | Phosphate-Buffered Saline                                |
| PGLYRP-1: | Peptidoglikan tanıma proteini-1                          |
| PKC:      | Protein kinaz C                                          |
| PP:       | Peyer Plağı                                              |
| PRNP:     | Prion proteini                                           |
| RTK:      | Reseptör tirozin kinaz                                   |
| SEB:      | Subepitelyal bölge                                       |
| STATS:    | Sinyal transformatörleri ve transkripsiyon aktivatörleri |
| UEA-1:    | Ulex european antigen-1                                  |

UMOD: Uromodulin

ZO: Zonula Okludens



## RESİMLER DİZİNİ

**Resim 1.** Gebelikte kontrol edilen vajinal plağın tespiti

**Resim 2.** A'da E13.5 günlük embriyo kontrol grubu B'de E13.5 günlük embriyo EGF grubu C'de E13.5 günlük embriyo Anti-EGF grubu Hematoksilen-Eozin boyaması

**Resim 3.** A'da E15.5 günlük embriyo kontrol grubu B'de E15.5 günlük embriyo EGF grubu C'de E15.5 günlük embriyo Anti-EGF grubu Hematoksilen-Eozin boyaması

**Resim 4.** A'da E15.5 günlük embriyo kontrol grubu B'de E15.5 günlük embriyo EGF grubu C'de E15.5 günlük embriyo Anti-EGF grubu Hematoksilen-Eozin boyaması

**Resim 5.** A'da E13.5 günlük kontrol grubu Spi-B boyaması B'de E13.5 günlük EGF grubu Spi-B boyaması

**Resim 6.** A'da E13.5 günlük kontrol grubu UMOD boyaması B'de E13.5 günlük EGF grubu UMOD boyaması

**Resim 7.** A'da E13.5 günlük kontrol grubu GP2 boyaması B'de E13.5 günlük EGF grubu GP2 boyaması

**Resim 8.** A'da E15.5 günlük kontrol grubu Spi-B boyaması B'de E15.5 günlük EGF grubu Spi-B boyaması

**Resim 9.** A'da E15.5 günlük kontrol grubu UMOD boyaması B'de E15.5 günlük EGF grubu UMOD boyaması

**Resim 10.** A'da E15.5 günlük kontrol grubu GP2 boyaması B'de E15.5 günlük EGF grubu GP2 boyaması

**Resim 11.** A'da E17.5 günlük kontrol grubu Spi-B boyaması B'de E17.5 günlük EGF grubu Spi-B boyaması

**Resim 12.** A'da E17.5 günlük kontrol grubu UMOD boyaması B'de E17.5 günlük EGF grubu UMOD boyaması

**Resim 13.** A'da E17.5 günlük kontrol grubu GP2 boyaması B'de E17.5 günlük EGF grubu GP2 boyaması

## TABLÖLAR DİZİNİ

**Tablo 1.** EGF'nin bağırsak gelişimindeki hayvanlar için uygulamaları

**Tablo 2.** Doku takip protokolü

**Tablo 3.** Parafini eriyen preparatın hematoksilen-eozin boyama protokolü

**Tablo 4.** Parafini eriyen preparatın immunhistokimyasal boyama protokolü

**Tablo 5.** E13.5 gün Spi-B boyaması skor değerlendirme

**Tablo 6.** E13.5 gün UMOD boyaması skor değerlendirme

**Tablo 7.** E13.5 gün GP2 boyaması skor değerlendirme

**Tablo 8.** E15.5 gün Spi-B boyaması skor değerlendirme

**Tablo 9.** E15.5 gün UMOD boyaması skor değerlendirme

**Tablo 10.** E15.5 gün GP2 boyaması skor değerlendirme

**Tablo 11.** E17.5 gün Spi-B boyaması skor değerlendirme

**Tablo 12.** E17.5 gün UMOD boyaması skor değerlendirme

**Tablo 13.** E17.5 gün GP2 boyaması skor değerlendirme

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikrofold hücreleri (M hücreleri) mukozal lenfoid folikülleri çevreleyen folikül ilişkili epitelde yer alan, mukozal immün yanıtın başlamasında rol oynayan özelleşmiş epitelyal hücrelerdir. M hücreleri luminal antijenleri alarak mukoza altında yer alan mukoza ilişkili lenfoid dokulara (MALT) sunmaktadırlar. M hücreleri diğer epitel hücrelerinden farklı morfolojik özellikler göstermektedir. Apikal yüzde kısa irregüler mikrovillus yapıları, bazolateral yüzde ise cep benzeri katlantılar bulundurulur. Bu morfolojik farklılıklar fonksiyonel özelliklerini destekler niteliktedir. Kısa mikrovillus yapıları luminal antijenler ile kolaylıkla temasın sağlanmasında, cep yapıları ise antijenlerin hızlı ve kolaylıkla sunulmasında rol oynar. Yapılan çalışmalarda moleküler olarak da M hücrelerinin diğer epitel hücrelerinden farklı oldukları ortaya konulmuştur. Bu moleküler farklılıklardan en önemlileri UMOD ve Spi-B gen ekspresyonudur. Literatürde Spi-B gen mutasyonu olan farelerde M hücrelerinin gelişmediği gösterilmiştir. M hücreleri mukozal immün sistemde önemli rol oynamaktadır. Diğer epitel hücrelerinden farklı özellikleri nedeniyle M hücreleri oral aşılama açısından da hedef olarak kullanılmaktadır. Parenteral aşılarla göre mukozal aşılar daha güvenli, daha ucuz, daha kolay uygulanabilirlik ve hem lokal hem sistemik immunitiyi uyarmak suretiyle daha güçlü immün yanıt oluşturmaları nedeniyle daha avantajlıdır. Mukozal aşılar da esas hedef M hücreleridir. M hücrelere spesifik yüzey reseptörlerini hedef alarak oral aşıların etkilerinin artırılmasını amaçlayan çalışmalar mevcuttur. Yine V. Cholera ve S. Typhimurum gibi patojenlere karşı savunmada da M hücreleri önemli rol oynamaktadır.

Epidermal büyüme faktörü, protein yapıda bir büyüme faktörüdür. Hücrelerin çoğalması, gelişmesi gibi vücuttaki pek çok fizyolojik ve patolojik süreçte rol almaktadır. EGF, anti-enflamatuar, anti-apoptotik, nörotrofik ve nöroprotektif etkilere sahiptir. Epidermal büyüme faktörü reseptörleri pulmoner, GİS, üreme, kas iskelet sistemi gibi yapıların hücrelerinde bulunmaktadır. İmmün sistem hücreleri ve bağ dokusu hücreleri de epidermal büyüme faktörü kaynağıdır. Epidermal büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü reseptörüne bağlanarak etkilerini başlıca sindirim sistemi, üreme sistemi ve sinir sistemi üzerinde göstermektedir. Fibroblastların, vasküler endotel hücrelerin, keratinositlerin üzerindeki mitoz uyarıcı etkisi sebebiyle yaraların tedavisinde başarı sağlamaktadır.

Mukozal immün sistemin önemli hücresi olan M hücrelerinin gelişimini araştıran çalışmalar içerisinde EGF'nin rolünü değerlendiren tek bir çalışma bulunmaktadır. Hücre kültürü üzerinde yapılan bu çalışmada EGF'nin M hücre sayısında belirgin artış sağladığı gösterilmiştir. Yine yapılan başka bir çalışmada M hücre gelişiminde önemli rol oynayan Spi-B gen ekspresyonu incelenmiş, embriyolojik olarak Spi-B gen ekspresyonuna bakılmış ve farelerde embriyolojik olarak Spi-B pozitif hücelere ilk olarak 15.5 günde rastlanmıştır.

Tüm bu yapılan çalışmalar ve bulgular ışığında biz de çalışmamızda EGF'nin M hücrelerinin embriyolojik gelişimindeki rolünü, anti-EGF olarak EGF reseptörlerini bloke eden bir monoklonal antikorun M hücre gelişimine etkisini araştırmayı amaçlamaktayız. Çalışmamızda bu sebeple Spi-B, UMOD ve Gp-2 gibi M hücre spesifik belirteçleri kullandık. Elde edeceğimiz bulgular ışığında yapılacak yeni çalışmaların immün yetmezliği olan hastalarda ve immün sistemi yeteri kadar gelişemeyen prematüre bebeklerde EGF kullanılarak M hücre gelişiminin desteklenmesini sağlayarak bağışıklık sisteminin indüklenmesi, güçlendirilmesi açısından faydalı olacağı kanaatindeyiz.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Mikrokatlantı (M) Hücreleri Genel Bilgiler

Gastrointestinal kanal topluca bağırsak mikrobiyatası olarak adlandırılan çok sayıda simbiyotik bakteri barındırmaktadır. Bu bakteriler en bol ve en yoğun olarak kolonda bulunur (Sender ve ark. 2016). Mukozal yüzeylerde immunglobilin A üretilir. IgA bakterileri bağlar, bağırsak homeostazını sürdürmek için mikroorganizmalar tarafından üretilen toksinleri nötralize eder, bu sayede bakteri ve toksinlerin bağırsak lümeninden atılmalarını kolaylaştırır (Bunker ve ark. 2018).

Mukozal dokular, konakçı immün yanıtları için hem afferent hem de efferent bölgeler olarak hizmet eder. Bağırsakta Peyer Plakları (PP'ler) ve diğer bağırsakla ilişkili lenfoid dokular (GALT) immün yanıt açısından önemli bölgelerdir (Brandtzaeg ve ark. 2008). Antijene özgü mukozal immün yanıtların başlatılmasında gerekli olan ilk adım, antijen örneklemesidir. Bu süreç dış ortamdan gelen antijenik maddenin epitel boyunca taşınması ve epitel altında bulunan immün hücrelere iletilmesiyle başlar (Schulz ve ark. 2013). GALT'ın lenfoid foliküllerini kapsayan folikülle ilişkili epiteli (FAE), antijen örneklemesine etkili bir şekilde aracılık eden M hücreleri adı verilen özel epitel hücreleri içerir (Kim ve ark. 2011; Ohno ve ark. 2016). GALT'ın lenfoid foliküllere ulaşmak için afferent lenfatikleri yoktur (Gebert ve ark. 1996). Bunun yerine bağırsak lümeninde antijenik maddenin doğrudan örnekleme için ana yol mikrokatlantı (M) hücreleridir. Bu sayede antijenler subepitelyal bölgedeki (SEB) M hücreleriyle bağlantılı dendritik hücrelere hızlıca taşınır. Burada antijenler işlenir, T hücrelerine sunulur, B hücresi aktivasyonunu ve olgunlaşmasını sağlayarak Ig A üretimi sağlayan hücreler olgunlaşır. Sonrasında IgA üretimi sağlayan bu plazma hücreleri lamina propriada çoğalır ve dimerik IgA üretirler. Üretilen bu dimerik Ig A daha sonra lümen içine salgılanır. Tüm bu mekanizma göz önünde bulundurulduğunda M hücreleri bağırsakta IgA yanıtının başlaması için kritik öneme sahip hücrelerdir (Kraehenbuhl ve ark. 2003).

Öncesinde M hücrelerinin Gİ kanalda FAE bölgesi içinde bulunduğu varsayılmaktaydı. Ancak bu varsayım intestinal villöz M hücrelerinin yakın zamanda tanımlanması ile geçerliliğini kaybetmiştir. Bağırsaktaki villöz M hücreleri, geleneksel M hücrelerinin bilinen tüm özelliklerini taşır, ancak PP'den bağımsızdır ve FAE ile ilişkili değildir. Aksine bağırsak villöz M hücreleri, küçük yoğun kümeler halinde veya difüz olarak intestinal villusun üzerinde bulunur. Bağırsak villöz M hücreleri, terminal ileumda ince

bağırsağın diğer alanlarına göre daha yaygın yerleşir. Bugüne kadar olan kanıtlar intestinal villöz M hücrelerinin fonksiyonel olarak PP M hücrelerine benzer olduklarını, dolayısıyla bu hücrelerin rolü ve potansiyel öneminin de birbiriyle benzer olduğunu göstermektedir (Jang ve ark. 2004). Patojenlerin M hücrelerini enfeksiyona giriş kapısı olarak kullanabilmeleri gibi, biyomedikal araştırmacılar da yıllarca mukozal bağışıklık sistemine ilaç veya aşı iletimi için M hücrelerine özgü mekanizmaların kullanılabilirliğini araştırmışlardır (Jepson ve ark. 2004; Belyakov ve ark. 2004). Parenteral yollarla karşılaştırıldığında ilaç ve aşının mukozal uygulaması nispeten basit, güvenli ve ucuzdur (Man ve ark. 2004). Mukozal immünizasyonun ek bir yararı da konakçıda hem sistemik hem de mukozal immün yanıtları hazırlama ve indüklemeye kabiliyetidir (Kunkel ve ark. 2003). Mukozal aşılama özellikle mukozal patojenlere karşı koruma için gereklidir, çünkü parenteral immünizasyon, koruyucu mukozal immünite gelişimi için genellikle etkisiz ve yetersiz kalmaktadır (Mestecky ve ark. 1987).

## ***2.2. Bağırsak M Hücrelerinin Morfolojik Özellikleri***

PP'lerin içindeki hücrelerin özellikleri ve sağlıklı bireylerde yerleşik bağırsak bakterilerinin yapısal olarak örneklenmesi ilk olarak ışık mikroskobu çalışmaları ile 19. yüzyılın sonlarında tespit edildi (Ruffer ve ark. 1890). 20. yüzyılın başlarında deney hayvanlarının PP'leri üzerinde yapılan histolojik analizde, FAE'nin bağırsak lümenindeki bakteri veya oral yoldan uygulanan partikül antijenlerini diğer bağırsak epitel hücrelerinden çok daha yüksek bir verimlilikle alma kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Owen ve ark. 1999).

Transmisyon ve taramalı elektron mikroskobu, FAE'nin mikroanatomisini analiz etmek için değerli bir tekniktir. Bu teknik sayesinde FAE hücrelerinin bir alt kümesinin, kısa güdük yüzey mikrovilluslarına sahip olması, bol miktarda vezikül içermesi ve bazolateral membranda çok sayıda invajinasyon göstermesi gibi pek çok belirgin ve sitolojik özelliklere sahip olduğu gösterildi (Owen ve ark. 1974; Bockman ve ark. 1973). İnsan PP'lerinin kubbe epitelinin elektron mikroskopi görüntülerine bakıldığında mikrokatlantı varlığına dayanarak Jones ve Owen tarafından bu özelliklere sahip hücreler M hücreleri olarak adlandırılmıştır (Owen ve ark. 1974).

## ***2.3. M Hücreleri ile Eksprese Edilen Antijen Alımı Reseptörleri***

M hücreleri belirgin morfolojik özelliklere sahip olması nedeniyle yüksek çözünürlüklü mikroskopi teknikleriyle kesin olarak tespit edilebilmektedir. Ancak M hücrelerini tanımlamak için immünohistokimyasal belirteçlerin mevcudiyetindeki sınırlama

nedeni ile M hücreleri üzerindeki çalışmalar uzun yıllar boyunca geride kalmıştır. Farelerde seçici olarak 1,2-1,2-fukoz bağlantılarına bağlanan UEA-I lektini immünohistokimya çalışmaları ile bağırsak M hücrelerinin saptanması için yararlı bir reaktiftir (Clark ve ark. 1993; Giannasca ve ark. 1994). Bununla birlikte UEA-I M hücreleri için bir belirteç olarak çeşitli kısıtlılıklara sahiptir. UEA-I lektini diğer fare enterosit alt gruplarına da (özellikle Kadeh hücreleri ve Paneth hücreleri) bağlanmaktadır ve fare harici türlerde ise bağırsak M hücrelerine aynı seçici bağlanmayı göstermemektedir (Gebert ve ark. 1996).

M hücrelerinin belirlenmesi açısından daha iyi belirteçlerin geliştirilmesi arayışında atılan en büyük adım (birden fazla türdeki M hücrelerini tanımlamak için kullanılabilecek evrensel markerler dahil) bu nadir hücrelerin fare PP'lerinden FAE'nin mikrodiseksiyonu veya bunların sınıflandırılması yoluyla zenginleştirilmesidir. M hücrelerine ait protein ekspresyonu için yeni aday belirteçlerin tanımlanmasında monoklonal antikorlar deneysel bir araç olarak gen ekspresyon profillemeye tekniklerinin kullanılmasına izin vermiştir (Lo ve ark. 2003; Nakato ve ark. 2009). Tanımlanan en iyi M hücre belirteçlerinden biri glikoprotein 2'dir (Terahara ve ark. 2008; Nakato ve ark. 2009; Hase ve ark. 2009). Farelerde GP2 sadece M hücreleri tarafından eksprese edilir ve diğer enterositlerde eksprese edilmez. GP2 ayrıca insanlar dahil diğer memelilerdeki M hücreleri tarafından da eksprese edilir. Bu nedenle GP2 M hücreleri için evrensel bir belirteç olarak nitelendirilebilir. GP2 birden fazla Gram-negatif enterik bakteri türü tarafından eksprese edilen FimH + tip I pili spesifik olarak bağlayan M hücrelerinin apikal yüzeyinde bulunan bir glikozilfosfatidilinozitol (GPI) bağlı glikoproteindir (Hase ve ark. 2009; Yu ve ark. 2010). GP2 eksikliği olan fareler belirgin bir şekilde antijene özgü immün yanıtları indükleyemez (Hase ve ark. 2009). GP2 ayrıca pankreas ekzokrin hücrelerinde zimogen granüllerin önemli bir bileşenidir (Colomer ve ark. 1994). Bu GP2'nin bir kısmı hücre zarlarından ayrılır ve diğer pankreas salgıları ile pankreas kanalı sistemine salgılanır. Bu sayede GP2, enterik bakterilere bağlandığı yere, bağırsak lümenine ulaşır. GP2'ye özgü otoantikorlar Crohn hastalığı olan bir hasta grubunda tespit edilmiştir (Roggenbuck ve ark. 2009). Bu bulgu, bazı durumlarda GP2'ye bağlanmayı takiben M hücreleri tarafından fagosite edilen bakterilere karşı gelişen konakçı immün yanıtının, enflamatuvar bağırsak hastalığı gelişimi ile ilişkili olan konakçı GP2'ye karşı anormal bir immün yanıtı da çapraz olarak tetikleyebileceğini göstermektedir.

M hücreleri ayrıca hücrel prion proteini (PRNP) ve üromodulin (UMOD) dahil olmak üzere bakteriler için reseptör olarak işlev gören diğer birkaç GPI-bağlantılı protein genlerini de eksprese eder (Sato ve ark. 2012; Yanagihara ve ark. 2017). GP2 ile yakından ilgili olan FimH + Tip 1 pili'ye de bağlanan UMOD'un ilk olarak renal tübüler epitel

hücrelerinin apikal yüzeyinde eksprese edildiği saptanmıştır. Bu molekül daha sonra üropatojenik olarak bağlandığı idrarın içine dökülebilen Tamm-Horsfall proteini olarak tanımlanmıştır (Iorember ve ark. 2014). Son zamanlardaki çalışmalarda UMOD'un M hücrelerinde *Lactobacillus acidophilus* için bir alım reseptörü olarak hizmet ettiği de gösterilmiştir (Yanagihara ve ark. 2017). Enterositlerin bazolateralinde bulunan integrin I-GPI bağlantılı proteinler, M hücrelerinin ise apikal yüzeyinde yerleşir ve *Yersinia enterocolitica* için reseptör görevi görür (Clark ve ark. 1998).

#### **2.4. EGF (Epidermal büyüme faktörü)**

EGF ilk olarak Dr. Cohen tarafından yarım yüzyıldan daha önce keşfedilmiştir (Cohen ve ark. 1962). Amniyon sıvısı, anne sütü, tükürük, idrar, bağırsak sıvısı ve plazma gibi çeşitli vücut sıvılarında saptanan 53 aminoasit kalıntısı ve üç intramoleküler disülfür köprüsünden oluşan sitoprotektif bir peptittir. Submaksiller tükürük bezleri, meme bezleri, plasenta, böbrek ve duodenum Brunner bezleri'nde bulunur (Zeng ve ark. 2014). EGF hücre büyümesi, hayatta kalma, göç, apoptoz, proliferasyon ve farklılaşmayı düzenlemede önemli rol oynar (Alexander ve ark. 2015). Hücre proliferasyonunun ve farklılaşmanın indüklenmesine ek olarak EGF ince bağırsakta epitel hücre homeostazının sağlanmasının yanı sıra bağırsak hücrelerinin olgunlaşması ve yenilenmesi ile ilişkilendirilen gastrointestinal sistem (GI) mukozal koruyucu faktörü olarak da işlev görür (Duh ve ark. 2000). EGF'nin biyolojik etkileri, ErbB ailesinin bir transmembran reseptör tirozin kinazı olan EGF reseptörüne (EGFR) bağlanması sonrasında, reseptör tirozin kinazın (RTK) otofosforilasyonu ve ardından Ras / mitojenle aktive edilmiş protein kinazların (RTK) aktive olmasıyla sağlanır. Ras / MAPK, fosfatidilinositol 3-kinaz / AKT (PI3K / AKT), fosfolipaz C- $\gamma$  / protein kinaz C (PLC- $\gamma$  / PKC) ve STATS sinyal yollarını (Brand ve ark. 2011), bağırsak gelişiminin uyarılmasını (Bedford ve ark. 2015; Lee ve ark. 2008; Xu ve ark. 2015), sıkı bağlantı protein ekspresyonunu düzenler (Kaur ve ark. 2014; Basuroy ve ark. 2006; Samak ve ark. 2011; Garcia ve ark. 2015). Hücre otofajisini azaltır (Maynard ve ark. 2015; Arda ve ark. 2011) ve enteropatojenlerin bağırsak epitelindeki kolonizasyonunu azaltır (Chen ve ark. 2014). Oksidatif stresin indüklediği apoptozu ise inhibe eder (Buret ve ark. 2002).

##### **2.4.1. Epidermal Büyüme Faktörünün Etkileri**

EGFR eksik farelerde cilt, akciğer, gastrointestinal kanal epitel hücrelerinde hasar, çoklu organ yetmezliği ve sinir dejenerasyonu geliştiği ve bu farelerin postnatal ilk bir ay içinde öldüğü bildirilmiştir (Miettinen ve ark. 1995; Sibilia ve Wagner 1995; Sibilia ve ark.

2003). Sibilia ve ark. (1998) EGF reseptör defektli farelerde doğum sonrası sinir dejenerasyonun geliştiğini göstererek, EGF reseptörünün astrositlerin çoğalmasında, farklılaşmasında ve bölünme sonrası nöronların sağ kalımında önemli rolü olduğunu göstermişlerdir. Nieto-Sampedro ve ark. (1988), beyin dokusunun hasarı sonucu astrositlerde EGF reseptörlerinde sayıca artış olduğunu göstermişlerdir. Kornblum ve ark. (1998), doğum sonrası fare frontal beyninin korunması ve astrositlerin normal gelişimi için EGF reseptörünün eksprese edilmesinin önemli olduğunu göstermişlerdir. EGF reseptörünün oligodendrosit gelişiminde de önemli role sahip olduğu bildirilmiştir (Aguirre ve ark. 2007). EGF, epitel, endotel, mezodermal, fibroblast ve düz kas hücrelerinde DNA sentezini uyarak organizmanın gelişiminde rol oynamaktadır (Carpenter ve Cohen 1976). EGF reseptör aktivasyonunun epidermal keratinositlerin hücre farklılaşmasını sağladığı gösterilmiştir (Jost ve ark. 2000; Safari ve ark. 2014). EGF reseptör sinyalizasyonu osteoprogenitor hücrelerde sayıca artış sağlar ve bu hücrelerin canlı kalımını, yeni kemik dokusu oluşumunu tetikler (Chandra ve ark. 2013). EGF'nin ince bağırsak hücrelerinden bazolateral membran reseptörü tirozin kinaz aracılığıyla Na absorpsiyonunu arttırdığı da bilinmektedir (Khurana ve ark. 1996). Böbrek tübül epitel hücrelerinin bazolateral membranından kalsiyum geçişini artıran EGF, Na reabsorpsiyonunu ise azaltmaktadır (Vehaskari ve ark. 1991). EGF, meme bezindeki hücrelerin çoğalmasını da sağlamaktadır (Collier ve ark. 1993). Anne sütündeki EGF, yeni doğan bireylerin bağırsak epitelindeki hücrelerin farklılaşmasını uyarak bağırsak fonksiyonlarının gelişiminde rol üstlenmektedir (Dvorak 2010; Foltzer-Jourdainne ve ark. 1993; Bruder ve ark. 2008). EGF'nin önemli bir etkisi de GİS'de ülser iyileşmesinde ve skar oluşumunda görev almasıdır (Konturek ve ark. 1991; Okita ve ark. 1991; Lee ve ark. 1991; Jones 1998). Jeffrey ve ark. (2001) EGF'nin testis gelişiminde önemli bir molekül olduğunu ve spermatogenezde EGF ve EGFR'nin düzenleyici rol üstlendiğini göstermiştir. İnsan, sıgır, rat, domuz gibi birçok türün testisleri üzerinde EGF reseptörleri olduğu gösterilmiştir (Chabot ve ark. 1986; Singh ve ark. 1995; Wandji ve ark. 1992; Maruo ve ark. 1993). EGF, implantasyon öncesinde, embriyo gelişiminde ve göz kapağı açılmasında görev almaktadır (Cohen 1962; Nielsen ve ark.; Dadi ve ark. 2007; Grazul-Bilska ve ark. 2003; Aflalo ve ark. 2007). İnek, at, tavşan, domuz, kedi, fare gibi çeşitli memelilerde follikül gelişimi, embriyogenez, implantasyon ile EGF arasında bağlantı bulunmaktadır. Gebelerde artan EGF'nin gelişen implante embriyo ve endometriyum dokusu üzerinde büyümeyi destekleme etkisine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Hamrouche ve ark. 1993; Corps ve ark. 1990; Hofmann ve Anderson 1990; Fischer ve ark. 1994; Göritz ve ark. 1996). EGF domuz türlerinin erken gebeliğinin periimplantasyon dönemlerinde, uterus epitelyal hücre göçünü

ERK1/2 MAPK yolağı ile regüle etmektedir (Jeong ve ark. 2016). EGF'nin erken gebelik sırasında PI3K-Akt1 (protoonkogenik protein kinaz 1) ve ERK1/2 MAPK sinyal iletim kaskadı boyunca domuz trofoektoderm hücrelerinin bölünmesi ve göçünü uyardığı gösterilmiştir (Jeong ve ark. 2013). Kim ve ark. (2009), EGF'nin gebe domuzlarda implantasyon sırasında önemli rol oynadığını rapor etmişlerdir. Memeli hayvanlar ile yapılan birçok çalışma dişi üreme siklusu sırasında eksprese edilen EGF ve EGFR'nin oosit olgunlaşması ve gelişimi, implantasyon öncesi hücrelerin artması ve farklılaşması ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (Chegini ve ark. 1986; Lonergan ve ark. 1996). EGF MSS'de kök hücre artışı sağlayan, nöronların farklılaşmasını uyaran bir büyüme faktörüdür (Morrison ve ark. 1987; Ishiyama ve ark. 1991; Ferrari ve ark. 1991). EGF'nin MSS'de progenitör etki gösterdiği ve sinir kök hücreleri için mitojen etkili olduğu bildirilmiştir. EGF *in vitro ortamlarda* sinir hücreleri üzerinde çoğalma etkisi göstermektedir. Travma sonrası hasar görmüş beyine sahip ratlarda EGF ile tedavi sonrası hipokampal nöronal bölgedeki hücre kaybında azalma ve kognitif fonksiyonlarda da iyileşme olduğu gözlemlenmiştir. EGF'nin nöroprotektif etkisinin de olduğu rapor edilmiştir (Sun ve ark. 2010; Gritti ve ark. 1999). EGF MSS'nin farklı bölgelerinde ve serebellumda tespit edilmiştir (Fallon ve ark. 1988; Lazar ve Blum 1991). EGF reseptörünün de beyinde yaygın bir şekilde dağılım gösterdiği bilinmektedir (Wiedermann ve ark. 1988). EGF'nin yetişkin rat ön hipofiz bezinde bağlanma yerleri ve dağılımı da rapor edilmiştir (Chabot ve ark. 1986).

#### **2.4.2. EGF ve Bağırsak Gelişimi**

EGF aside ve ısıya dayanıklı, proteazların sindirimine karşı dirençli bir moleküldür. Orogastrik yoldan uygulanabilir. İnce bağırsak segmentinin fırça kenarındaki villus enterositlerinin hem apikal hem de bazolateral yönünde bolca bulunan EGFR'ne kadar iletilebilir (Avissar ve ark. 2001). EGF'nin enterositler yüzeyine bağlanması EGFR'nin dimerizasyonunu indükler. EGFR tirozin kinaz aktivitesi tetiklenir. Bu da RTK otofosforilasyonunun aktivasyonunu sağlar. Bu sayede intestinal gelişim ve intestinal mukoza onarımına yardımcı olan çeşitli sinyal transdüksiyon yollarının aktivasyonu sağlanır (Clark ve ark. 2008; Wee ve ark. 2015). EGF anne sütünde en bol bulunan büyüme faktörlerinden biridir, insan kolostrumlarında ampiregulin ve TGF- $\alpha$  gibi diğer büyüme faktörlerinden 500 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Nojiri ve ark. 2012). EGF'nin bağırsak gelişiminde villus yüksekliğinin ve kript derinliğinin artırılması, enterosit proliferasyonunun artırılması ve tripsin, kimotripsin, alkalen fosfataz, sükras, maltaz ve laktaz gibi sindirim enzimlerinin

salgılanmasının uyarılması dahil pek çok önemli olayda rol oynadığı gösterilmiştir. Yine besinlerin emilimi, faydalanımı ve hayvanların büyüme performansını geliştirmek için de EGF oldukça önemlidir (Bedford ve ark. 2015; Lee ve ark. 2008; Xu ve ark. 2015; Cellini ve ark. 2004; Lee ve ark. 2006; Wang ve ark. 2015). Hayvanlar için EGF uygulamaları Tablo 1'de listelenmiştir.

**Tablo 1.** EGF'nin bağırsak gelişimindeki hayvanlar için uygulamaları.

| Hayvan       | Doz       | Önemli sonuçlar                                                                                                                       | Kaynak                 |
|--------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Fetal tavşan | 300 µg/kg | EGF infüzyonu intrauterin büyümeyi, fetal ince bağırsak villus yüksekliğini ve kript hücrelerinin sayısını önemli ölçüde arttırmıştır | (Cellini ve ark. 2004) |
| Domuz        | 1.5 mg/kg | Sütten kesildikten sonra 28. günde jejunumda mukoza IgA seviyeleri ve kript derinliği artmıştır                                       | (Lee ve ark. 2006)     |
| Fare         | 50 µg/kg  | Ortalama villüs yüksekliğinde ve kript derinliğinde artış, gelişmiş enterosit proliferasyonu                                          | (Cheung ve ark. 2009)  |
| Rat          | 50 µg/kg  | Ortalama villus yüksekliğinde ve kript derinliğinde artış                                                                             | (Wang ve ark. 2015)    |

#### 2.4.3. Bağırsak Bariyer Yapısı

Bağırsak epiteli bağırsak mukozasını lümen ortamından ayıran, epitel hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlayan sürekli bir tek tabakadan oluşmaktadır. Bağırsak epitel hücreleri besin maddelerinin emilimini sağlayan, toksinlere, alerjenlere ve patojenlere karşı selektif bir bariyer oluşturarak savunma görevi gören, bağlantı kompleksleri ile birbirine sıkıca bağlı hücrelerden oluşur (Günzel ve ark. 2013). Sıkı bağlantılar apikal yüzeye yakın bitişik epitel hücreleri arasındaki boşluğu kapatarak hücreler arası bağlantı komplekslerinin en

tepe bileşenini oluşturur (Yu ve ark. 2014; Wang ve ark. 2015). Hücreler arası birleşme kompleksinin bozulması bağırsak geçirgenliğini arttırarak patojenlerin bağırsak mukozasından kolay bir şekilde geçmesine neden olmaktadır (Yu ve ark. 2014; Chen ve ark. 2014). Bu nedenle hücreler arası bağlantı kompleksinin bütünlüğünü korumak bağırsak gelişimi ve sağlığı açısından kritik öneme sahiptir.

#### **2.4.4. EGF Tarafından Sıkı Bağlantının Düzenlenmesi**

Sıkı bağlantılar (zonula okludensler) ZO-1, ZO-2 ve ZO-3 gibi sitoplazmik iskelet proteini ile etkileşime giren, en az üç tip transmembran protein, claudin, okludin ve bağlantı adezyon molekülünden oluşan çoklu protein kompleksleridir. Bağırsak bariyerlerini oluşturmak için koordineli bir şekilde etkileşime girerler (Overgaard ve ark. 2011; Suzuki ve ark. 2014). Bunlar iyonların, suyun ve çözeltilerin paraselüler geçişini düzenler ve plazma zarının apikal ve bazolateral alanları arasında protein ve lipidlerin serbest dağılımını bloke ederek hücre polaritesini korumak için bir çit görevi görürler (Suzuki ve ark. 2014). Yapılan çalışmalar sıkı bağlantıların sinyal iletim yollarının aktivitesi tarafından düzenlenen sayısız hücre içi sinyal molekülü ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Basuroy ve ark. 2006). EGF sıkı bağlantılara bağlı olarak işlevini gerçekleştiren ve transepitelyal elektrik direncinin ölçülmesiyle değerlendirilebilen epitel paraselüler geçirgenliğin ana düzenleyicisidir (Basuroy ve ark. 2006; Garcia ve ark. 2015). EGF'nin erken süttten kesilmiş yavrularda hidrojen peroksit, etanol, asetaldehit ile ilişkili bağırsak iskemi-reperfüzyon hasarını önleyerek bağırsak bariyer fonksiyonunu koruduğu gösterilmiştir. EGF farklı hücre tiplerinde PKC (Banan ve ark. 2001), MAPK (Basuroy ve ark. 2006) ve STATs (Garcia ve ark. 2015) gibi birçok sinyal yolunu aktive ederek sıkı bağlantıların bileşiminde değişikliklere neden olmaktadır. Çok sayıda araştırma oksidatif stresin bağırsak bariyer fonksiyonunu bozduğunu göstermiştir (Rao ve ark. 2008). Domuzların anne sütünden kesilmesi domuzun hayatındaki en stresli olaylardan biridir ve bağırsak fonksiyonlarını etkiler (Campbell ve ark. 2013). Xu ve arkadaşları (2015) EGF'nin oral uygulamasının ZO-1, claudin-1 ve okludin gibi sıkı birleşme proteinlerinin gen ekspresyonunu geliştirebileceğini, böylece erken süttten kesilmiş domuz yavrularının bağırsak bariyer fonksiyonunun arttırılabileceğini saptamışlardır. Ayrıca EGF'nin ERK/MAPK ve PLC/PKC yollarında hidrojen peroksitin neden olduğu bağırsak bariyerinin bozulmasını önlediğini keşfettiler. Basuroy ve arkadaşları (2006) Caco-2 hücrelerinde EGF ile ön işlem yapıldığında sıkı bağlantı proteinlerinin (ZO-1 ve okludin) yeniden dağılmasının ve TER ile saptanabilen oksidatif stres kaynaklı bağırsak bariyer bozulmasının engellenebildiğini göstermişlerdir. Epitel hücreleri stres maruziyeti altında EGF

ile takviye edildiklerinde EGFR'ne bağlanan EGF RTK'nın otofosforilasyonuna yol açar; EGFR ve SHC/Grb2 arasındaki etkileşim, Ras'ı aktive etmek için SOS'nin plazma membranına alınmasıyla sonuçlanır. Aktif Ras, Raf aktivasyonuna aracılık eder ve daha sonra MEK'i aktifleştirir. Bu da ERK'lerin aktivasyonuna yol açar (Wee ve ark. 2015; Brand ve ark. 2011). Aktive ERK, ZO-1, okludin ve claudin gibi sıkı bağlantıların ekspresyonunu düzenler. EGF ile ön işlem F-aktin ekspresyonunu artırabilir, G-aktin ekspresyonunu azaltabilir ve F-aktin/G-aktin oranını arttırabilir (Banan ve ark. 2004).

Arda Pirincci ve Bolkent (2014) iskemi-reperfüzyonlu sıçanlarda EGF tedavisinin apoptozu ve lipid peroksidasyonunu azaltarak, antioksidan enzim aktivitelerini artırarak iskemi/reperfüzyonun neden olduğu oksidatif hasarı önlediğini bildirmişlerdir. Geng ve ark. (2014) EGF ile muamele edilmiş tüm iskemi-reperfüzyonlu sıçanlarda jejunum ve ileumdaki sıkı bağlantıların (ZO-1 ve okludin) ekspresyonunun belirgin şekilde arttığını göstermişlerdir. Alkolik karaciğer hastalığının gelişimine katkıda bulunan etanol ve oksitlenmiş metaboliti olan asetaldehit, bağırsak hiperpermeabilitesini de indükler (Suzuki ve ark. 2013). Chen ve ark. (2014) EGF'nin kronik etanol maruziyeti altında bağırsak geçirgenliğini azaltarak bağırsak bütünlüğünün korunmasında yardımcı olduğunu göstermiştir.

#### **2.4.5. EGF'nin Bakteriyel Kolonizasyona Etkisi**

Bağırsak mikrobiyata profili bağırsak bütünlüğünde önemli bir rol oynar. EGF Escherichia coli (E. coli) (Buret ve ark. 1998), Campylobacter jejuni (C. jejuni) ve Enterococcus gibi enteropatojenlerin bağırsak epitelinde kolonizasyonunu azaltabilir (Wang ve ark. 2014; Lamb-Rosteski ve ark. 2008). EGF'nin yenidoğan tavşanlara verilmesi bakteriyel translokasyonun önemli ölçüde azalışı ve bağırsakta goblet hücrelerinin sayıca artışı ile ilişkili bulunmuştur (Okuyama ve ark. 1998). EGF'nin enteropatojenik E. coli ile enfekte olmuş sütten kesilmiş tavşanlara oral olarak verilmesinin E. coli'nin in vitro çoğalmasını etkilemediği ancak ince ve kalın bağırsakta E. coli kolonizasyonunu önemli ölçüde baskıladığını göstermiştir (Buret ve ark. 1998). Ek olarak EGF C. jejuni ile enfekte olmuş civcivlerin jejunumunda C. jejuni kolonizasyonunu azaltabilir ve C. jejuni'nin neden olduğu claudin-4 bozulmasını önleyebilir (Lamb-Rosteski ve ark. 2008).

#### **2.5. Setuksimab**

Setuksimab, epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) hücre dışı alanına yönelik bir insan murin immüoglobulin G1 monoklonal antikordur (mAb). Setuksimab EGFR'ye bağlanarak mitojenle aktive olan protein kinaz aktivitesini ve PI3K/AKT/mTOR

yolu gibi sinyal yollarının fosforilasyonunu önler, hücre çoğalması ve büyümesini engeller. Ek olarak setuksimab antikora bağlı hücrel sitotoksiteyi indüklemektedir (Vincenzi B ve ark. 2008). Setuksimab ilaç olarak 2008 yılında metastatik kolorektal kanserli (mCRC) hastalar için tedavi seçeneği olarak kullanılmaya başlanmıştır.

## **2.6. Belirteçler**

### **2.6.1. Spi-B**

M hücre farklılaşmasının ETS (E26 transformasyonuna özgü) transkripsiyon faktörü Spi-B tarafından düzenlenmesi, aynı zamandaki üç araştırma grubu tarafından bağımsız olarak keşfedilmiştir (Kanaya ve ark. 2012; de Lau ve ark. 2012; Sato ve ark. 2013). Spi-B'nin M hücrelerinde ekspresyonu, FAE kubbesinin tepesine kadar devamlı olarak tespit edilmiştir. Bölünen hücrelerde Spi-B'nin en erken eksprese edilen belirteç olduğu saptanmıştır (Kimura ve ark. 2015). RANKL'ın farelere in vivo uygulanması ve bu farelerin bağırsak kriptlerinden yetiştirilen organoid kültür sistemindeki uygulaması, epitelde Spi-B gen ekspresyonunu hızlı bir şekilde indüklediğini göstermiştir (Kanaya ve ark. 2012; Lau ve ark. 2012). Ayrıca Spi-B eksikliği olan farelerde M hücreleri Peyer Plaklarının FAE'sinde bulunmaz (Kanaya ve ark. 2012; de Lau ve ark. 2012; Sato ve ark. 2013). Bu nedenle Spi-B'nin M hücre farklılaşmasının erken evresini düzenlediği düşünülmektedir.

Spi-B'nin devre dışı bırakılmasının B hücre reseptör sinyallerinde hafif kusurlara neden olduğu, ancak majör gelişimsel anormalliklere sebep olmadığı gösterilmiştir (Su ve ark. 1997). Bu molekül PP'ler için en erken tespit edilebilir işaretleyicidir. E14.5, E15.5 ve E16.5 embriyonik günde E14.5, E15.5 ve E16.5'teki embriyonik bağırsakta Spi-B ekspresyonu bütünüyle in situ hibridizasyon ile saptanmıştır. Spi-B hücrelerinin görüntüleri ilk olarak E15.5'te tespit edilmiştir. PP gelişiminin en erken belirtileri bu aşamada tespit edilebilir (Lau ve ark. 2012). Spi-B erişkin vahşi tip hayvanların embriyonik gelişim sırasında PP'lerinde bulunan M hücrelerinde ifade edilir. Bilinen herhangi bir transkripsiyonel düzenleyicinin M hücre fenotipinde yer alıp almadığını belirlemek için floresansla aktive edilmiş hücre sıralama (FACS) yapılan ince bağırsak M hücrelerinden türetilmiş mikroarray verileri değerlendirilmiş, PU1 ile yakından ilişkili bir Ets transkripsiyon faktörü olan Spi-B'nin anlamlı ifadesi gözlemlenmiştir. Spi-B, lenfoid ve miyeloid hücre tiplerinde de eksprese edilir, ancak immün sistemin dışında eksprese edildiği bilinmemektedir (Dahl ve ark. 2002).

### 2.6.2. GP2

GP2 M hücreleri üzerinde bulunan karakteristik bir hücre yüzeyi proteinidir (Hase ve ark. 2009). GP2 başlangıçta pankreas asiner hücrelerinin zimogen granüllerinden salgılanan ve plazma bağı ile ilişkili olan bir integral membran proteini olarak keşfedildi (Scheffer ve ark. 1980; Rindler ve Hoops 1990). GP2'nin yokluğunda, M hücreleri tarafından belirli tipte bakteri ve toksinlerin alımı ciddi şekilde bozulmuştur (Hase ve ark. 2009; Matsumura ve ark. 2015). GP2'nin bir eşleşme grubu için alım reseptörü olarak hizmet ettiğini ileri süren çalışmalar mevcuttur. Aslında GP2, *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* gibi gram negatif enterobasil alt kümesinin dış zarı üzerindeki tip 1 pilus'un önemli bir bileşeni olan FimH ile etkileşime girer ve FimH +'nın verimli alımı için bir GP2-FimH etkileşimi gerekmektedir (Hase ve ark. 2009). M hücreleri tarafından yüksek oranda eksprese edilen, ancak diğer enterosit popülasyonları tarafından eksprese edilmeyen molekülleri tanımlamayı amaçlayan bağımsız gen profili oluşturma deneyleri, GP2'yi spesifik bir M hücresi markeri olarak tanımlamıştır (Hase ve ark. 2005; Terahara ve ark. 2008). Bu glikozilfosfatidilinozitol bağlantılı protein M hücrelerinin apikal yüzeyi üzerinde yüksek oranda eksprese edilir ve *Escherichia coli*, *S. Typhimurium* gibi bazı patojenik ve kommensal bakterilerin dış zarı üzerindeki tip I pili FimH bileşenine seçici olarak bağlanır (Hase ve ark. 2009).

### 2.6.3. Üromodulin

Üromodulinin (UMOD veya Tamm-Horsfall proteini, THP) M hücreleri tarafından da eksprese edildiği bildirilmiştir ve bu molekül bakterilerin üroepitelyal hücelere bağlanmasını önlemektedir (Lau W ve ark. 2012; Hase K ve ark. 2009). M hücrelerindeki UMOD ekspresyonu Gp2'den çok daha düşük olmasına rağmen, bu iki proteinin benzer özellikleri sayesinde bağırsak lümenindeki FimH + bakterilerin örneklenmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir (Sato S ve ark. 2012).

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1.Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı

Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları ünitesinden yaklaşık olarak 12-14 haftalık, ortalama ağırlığı 20-40 gram olan, daha önce hiç deneye girmemiş 27 adet dişi ve 20 adet erkek Balb/c cinsi fare kullanılmıştır. Çalışmamız Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulunda 64583101/2018/046 sayılı onayı almıştır. Erkek fareler deney sonunda Deney Hayvanları Ünitesine iade edilmiştir. Deney süresince fareler bağıl nem oranı %40-60, ısısı 22°C, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüsü olan düzenekli bir ortamda muhafaza edildi. Farelerin deney sürecinde su ve yem ihtiyaçları ad libitum olarak karşılandı. Kafesler haftada 3 kez olacak şekilde temizlendi.

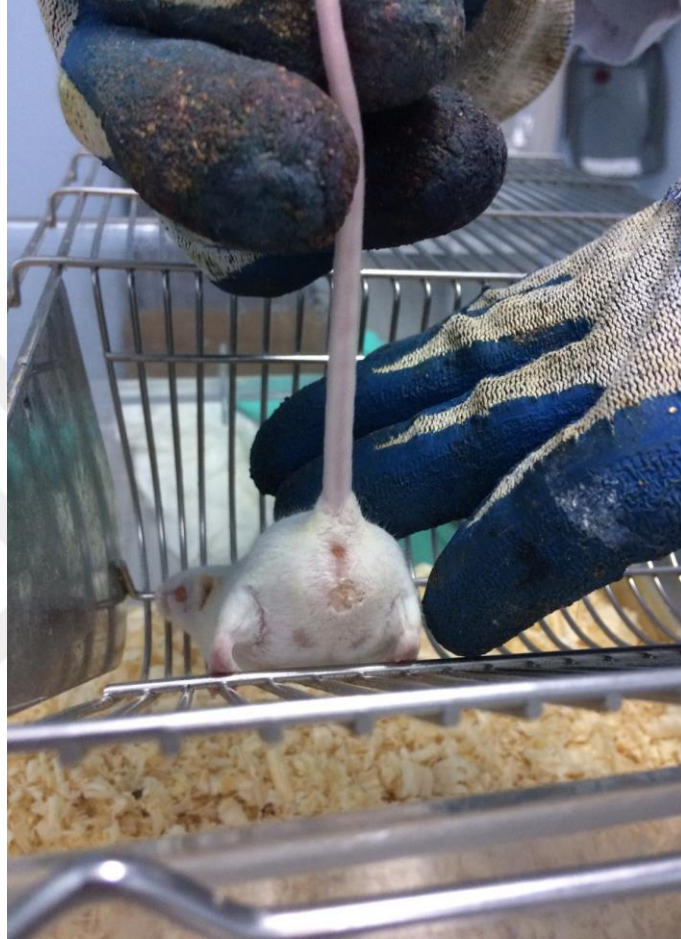
#### 3.2.Deney Gruplarının Planlanması

Uyum sürecinin tamamlanmasının ardından fareler rastgele 3 gruba (n=9) ayrıldı.

- **Grup I** (Gebe kontrol grubu, n=9): Gebe bırakılacak, deney süresince plasebo uygulanacak kontrol grubu;
  - a. 13,5 günlük (n=3)
  - b. 15,5 günlük (n=3)
  - c. 17,5 günlük (n=3)
- **Grup II** (EGF grubu): Gebe bırakılacak, deney süresince subkutan yol ile 50 mikrogram/kg/gün (Cheung ve ark. 2009) EGF uygulanacak grup;
  - a. 13,5 günlük (n=3)
  - b. 15,5 günlük (n=3)
  - c. 17,5 günlük (n=3)
- **Grup III** (anti-EGF, Setuksimab): Gebe bırakılacak, deney süresince intravenöz yol ile 10 miligram/kg/hafta (Matsuo ve ark. 2011) setuksimab uygulanacak grup;
  - a. 13,5 günlük (n=3)
  - b. 15,5 günlük (n=3)
  - c. 17,5 günlük (n=3)

Farelerin gebe kalması için kafeslere 2 dişiye 1 erkek olacak şekilde bırakılması sonrasında ertesi gün vajinal plak kontrolü ile gebelik tayini gerçekleştirilmiştir. Plak gözlemlendiğinde farenin gebeliğin 0,5'inci gününde olduğu kabul edildi.

**Resim.1** Gebelikte kontrol edilen vajinal plağın tespiti



### **3.2. EGF uygulanması**

Grup II’de yer alan farelere gebeliğin 0,5. gününden itibaren distile suda çözdürülmüş 50 mikrogram/kg EGF(Cheung ve ark. 2009) günde tek doz olmak üzere subkutan yol ile verilmeye başlanmıştır.

### **3.3. Anti-EGF uygulanması**

Grup III’de yer alan farelere gebeliğin 6. gününde 10 mg/kg/hafta setuksimab (Matsuo ve ark. 2011) haftada bölünmüş iki doz olmak üzere intravenöz yol ile verilmeye başlanmıştır.

### **3.4. Deneyin sonlandırılması**

Deneyin sonunda fareler gebeliğin 13,5-15,5-17,5 gününde eter anestezisi altında sakrifiye edilmiştir. Embriyolar diseksiyondan sonra %10 nötral formalinle tespit edilmiştir.

### **3.5. Doku takibi**

13,5-15,5-17,5 embriyolar yapılacak histokimyasal boyama ve immünohistokimya çalışmaları için takip edilmiştir. Fiksasyonun ardından dokular akarsu altında bir gece bırakılarak fiksasyon maddesinden uzaklaştırılmaları sağlanmıştır. Yıkama işleminden sonra manuel olarak yaptığımız takip tabloda verilmiştir.

**Tablo 2.** Doku takip protokolü

| Kimyasallar           | Süre   |
|-----------------------|--------|
| %60’lik alkol         | 1 saat |
| %70’lik alkol         | 1 saat |
| %80’lik alkol         | 1 saat |
| %96’lik alkol         | 1 saat |
| >%99,5’lük alkol      | 1 saat |
| Ksilol (etüvde 60°C)  | 1 saat |
| Ksilol (etüvde 60°C)  | 1 saat |
| Parafin (etüvde 60°C) | 1 saat |
| Parafin (etüvde 60°C) | 1 saat |
| Blok gömme            |        |

Her gruptan rastgele 6 blok seçilerek optimal kesim aralığında sagittal ve horizontal olarak 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak lamlara aktarılmıştır. Kesitlerin alınmasının ardından immunohistokimya ve hematoksilin-eozin boyama işlemlerine geçilmiştir.

### **3.6.Histokimyasal boyamalar**

Hematoksilen-eozin boyama için 3 saat önceden 60°C etüvde bırakılan dokuların işlenme sırası tabloda verilmiştir.

**Tablo 3:** Hematoksilin-eozin boyama protokolü

| Kimyasallar           | Süre  |
|-----------------------|-------|
| Ksilol                | 5 dk  |
| Ksilol                | 5 dk  |
| >%99,5'luk alkol      | 20 sn |
| %80'lik alkol         | 20 sn |
| Distile su            | 5 dk  |
| Harris's hematoksilin | 1 dk  |
| Akarsu altında yıkama | 1 dk  |
| Eozin                 | 1 dk  |
| %80'lik alkol         | 20 sn |
| >%99,5'luk alkol      | 20 sn |
| Ksilol                | 5 dk  |
| Ksilol                | 5 dk  |
| Entellan ile kapama   |       |

### 3.7.İmmünohistokimya protokolü

GP2, Spi-B, UMOD antikorlarının immunohistokimyasal boyaması için polilizinli alınan kesitler bir gece önceden 45°C'ye ayarlanan etüve bırakıldı. Ertesi gün ısısı 60°C çıkartılarak 1 saat ek süre olarak bekletildi. Daha sonra Tablo 4'te yazılan protokol ile devam edildi.

**Tablo 4:** Preparatların immunhistokimyasal boyama protokolü

**Tablo 4a.** Over Night öncesi

| Kullanılan materyal          | Süre     |
|------------------------------|----------|
| Ksilol                       | 30 dk    |
| >%99,5 alkol                 | 2 dk     |
| %96                          | 2 dk     |
| %80                          | 2 dk     |
| %70                          | 2 dk     |
| %60                          | 2 dk     |
| Distile su                   | 5 dk     |
| PBS                          | 5 dk     |
| PBS                          | 5 dk     |
| Citrate buffer               | 5dk/350W |
| Hidrojen peroksid + metanol  | 6 dk     |
| PBS                          | 1 dk     |
| Solüsyon A                   | 45 dk    |
| Primer antikorlar damlatıldı |          |
| Over-night                   | 20 saat  |

**Tablo 4b.** Over Night sonrası

| Kullanılan materyal  | Süre  |
|----------------------|-------|
| PBS                  | 5 dk  |
| PBS                  | 5 dk  |
| Solüsyon B           | 45 dk |
| PBS                  | 10 sn |
| Solüsyon C           | 30 dk |
| PBS                  | 5 dk  |
| PBS                  | 5 dk  |
| DAB solüsyonu        | 3 dk  |
| Distile su           | 1 dk  |
| Mayer's hematoksilen | 15 sn |
| Akarsuda bekletme    | 10 dk |
| >%99,5 alkol         | 20 sn |
| %96                  | 20 sn |
| %80                  | 20 sn |
| Ksilol               | 7 dk  |
| Entellan ile kapama  |       |

### **3.8 İstatiksel analiz**

Spi-B boyamasında 13.5 günlük embriyo örneklerinden

- 6 adet grup I,
- 6 adet grup II,
- 6 adet grup III

GP2 boyamasında 15.5 günlük embriyo örneklerinden

- 6 adet grup I,
- 6 adet grup II,
- 6 adet grup III

UMOD 17.5 günlük embriyo örneklerinden

- 6 adet grup I,
- 6 adet grup II,
- 6 adet grup III

olmak üzere toplamda 162 örnek üzerinden çalışmamızın istatistiksel analizi yapılmıştır.

### ***3.9. İmmunohistokimyasal değerlendirme***

Dokular semikantitatif bir skora ile değerlendirilerek

- 0: Boyanma yok
- 1: Az boyanma
- 2: Orta düzeyde boyanma
- 3: Yoğun boyanma
- 4: Çok yoğun boyanma

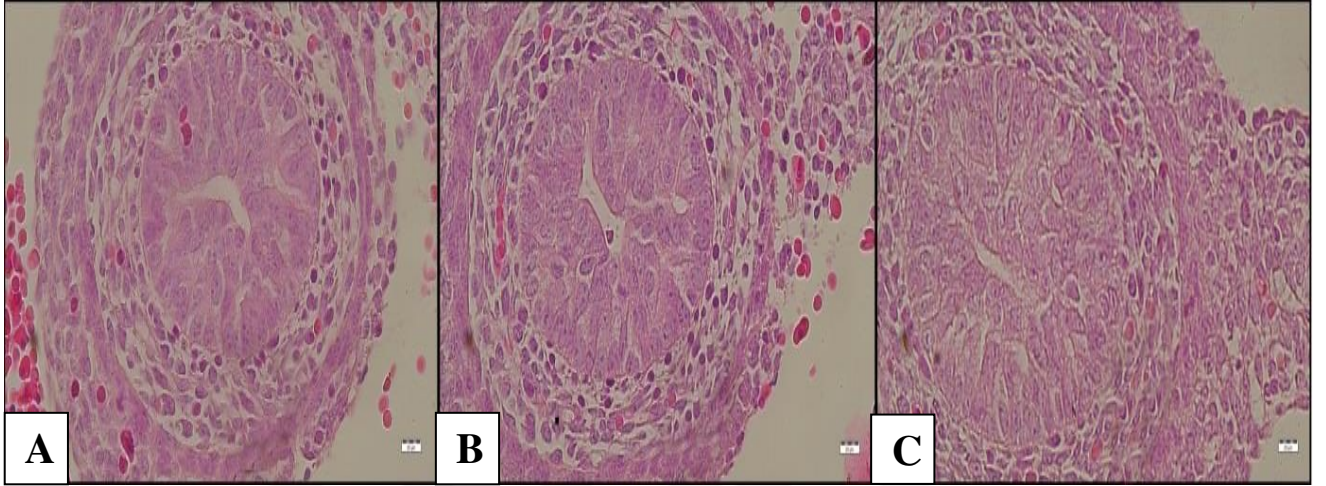
Gruplar arasında immunohistokimyasal boyama ile gösterilmiş olan belirteçler açısından preparattaki boyanma yoğunluğuna göre skora yapılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olup olmadığını belirlemek için SPSS 19 Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

## 4.BULGULAR

### 4.1. Hematoksilen-Eozin Değerlendirilmesi

#### 4.1.1. E13.5 günlük embriyolar

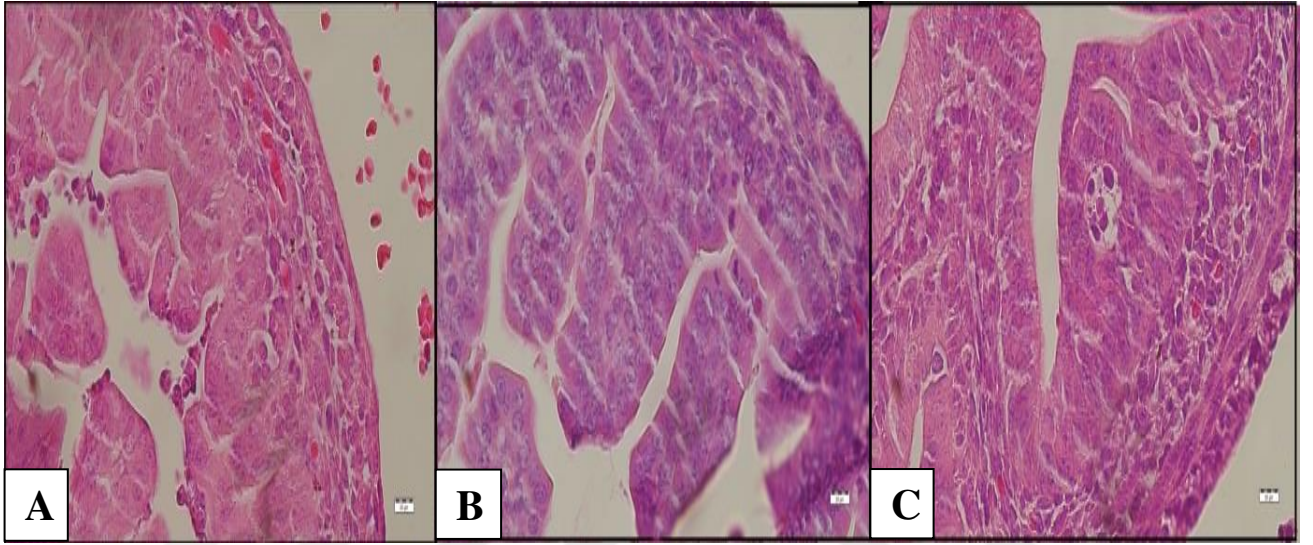
Hematoksilen-Eozin boyama sonucunda gruplar arasında E13.5 günlük embriyoların bağırsakları arasında bir fark olmadığı gözlemlenmiştir.



**Resim 2.** A’da E13.5 günlük embriyo kontrol grubu. B’de E13.5 günlük embriyo EGF grubu. C’de E13.5 günlük embriyo Anti-EGF grubu (Resimler 40x görüntülenmiştir.)

#### 4.1.2. E15.5 günlük embriyolar

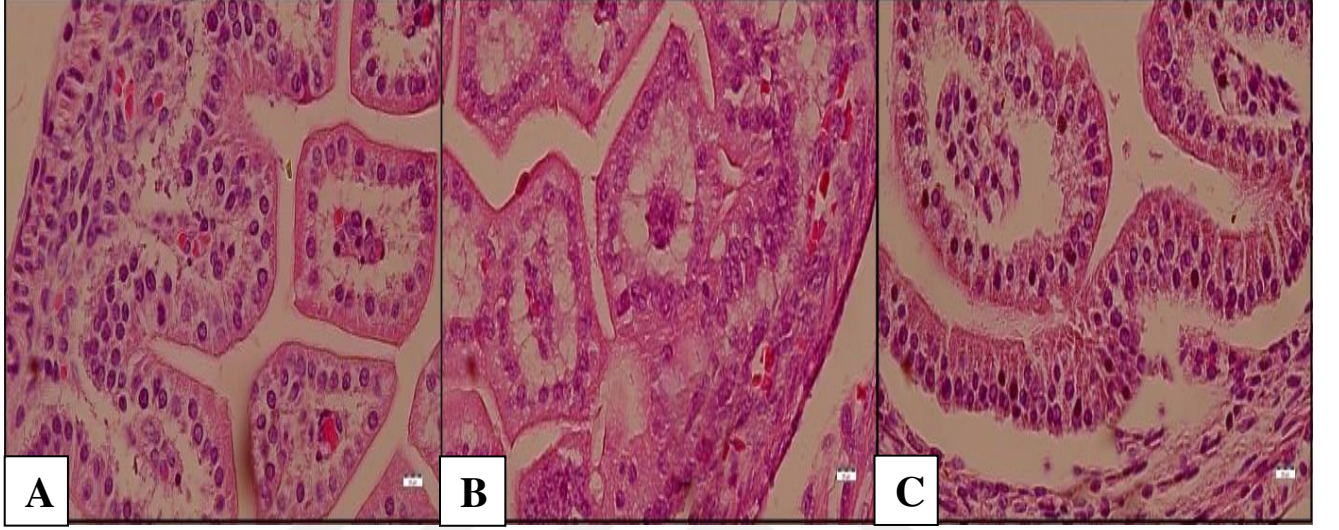
Hematoksilen-Eozin ile boyalı bağırsaklar değerlendirildiğinde E15.5 günlük embriyolarda EGF grubunun epitel yüzey alanının kontrol ve anti-EGF grubuna göre göreceli olarak daha fazla olduğu saptanmıştır (stereolojik analiz yapılmamıştır).



**Resim 3.** A’da E15.5 günlük embriyo kontrol grubu. B’de E15.5 günlük embriyo EGF grubu. C’de E15.5 günlük embriyo Anti-EGF grubu (Resimler 40x görüntülenmiştir.)

#### 4.1.3. E17.5 günlük embriyolar

Hematoksilen-Eozin boyama sonucunda E17.5 günlük embriyolarda gruplar arasında bir fark olmadığı gözlemlenmiştir.



**Resim 4.** A’da E17.5 günlük embriyo kontrol grubu. B’de E17.5 günlük embriyo EGF grubu. C’de E17.5 günlük embriyo anti-EGF grubu (Resimler 40x görüntülenmiştir.)

#### 4.2. İmmunohistokimyasal Değerlendirmeler

İmmunhistokimyasal skorlamalar için gruplar kendi aralarında kontrol, EGF ve anti-EGF, gün (E13.5, E15.5, E17.5) ve belirteçlere (Spi-B, UMOD, GP2) göre ayrılmıştır. Skorlamayı istatistiksel olarak değerlendirmek için SPSS 19 Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testi yapılmıştır ( $p < 0,05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir).

##### 4.2.1. E13.5 gün embriyo değerlendirme

###### 4.2.1.1 E13.5 gün Spi-B boyaması

**Tablo 5.** E13.5 gün Spi-B boyaması skor değerlendirme

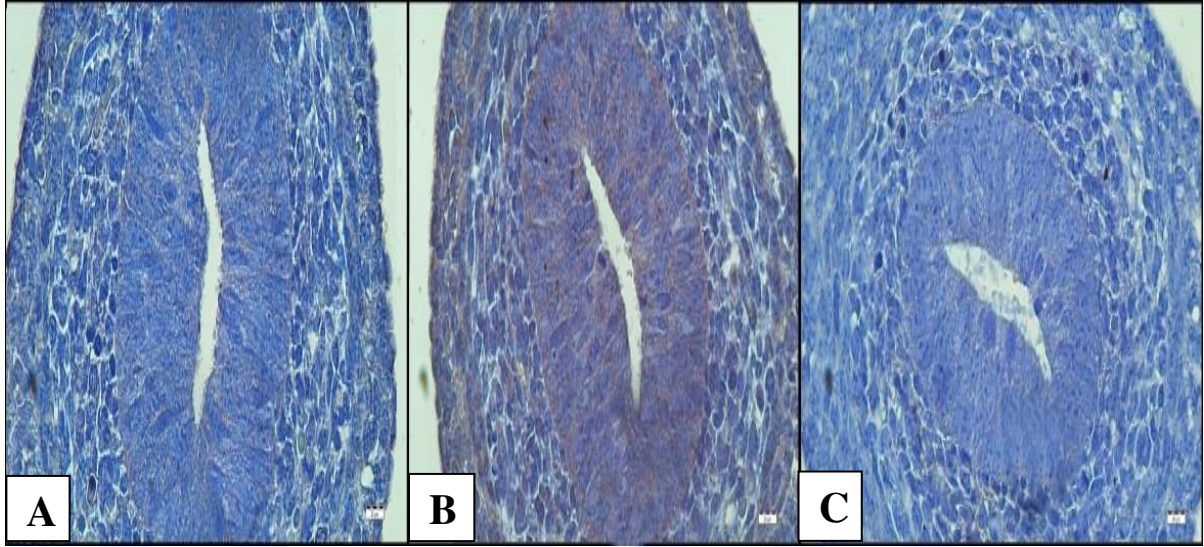
**Tablo 5a.**

| Spi-B 13.5 |                |            |                                 |
|------------|----------------|------------|---------------------------------|
| Grup       | Ortalama değer | Std. sapma | Anlamlılık(p)<br>Kruskal-wallis |
| Kontrol    | 0              | 0          | <b>0,001</b>                    |
| EGF        | 2              | 1,26       |                                 |
| Anti-EGF   | 0              | 0          |                                 |
| Toplam     | 0,66           | 1,18       |                                 |

**Tablo 5b.**

| Mann Whitney U testi: Spi-B 13.5 |                         |
|----------------------------------|-------------------------|
| Gruplar                          | Anlamlılık(p)<br>değeri |
| Kontrol /EGF                     | <b>0,000</b>            |
| EGF/Anti-EGF                     | <b>0,000</b>            |
| Anti-EGF/kontrol                 | 1                       |

Gruplar arasında Kruskal Wallis testi ile anlamlı fark görülmüştür. Mann Whitney U testi ile yapılan ikili değerlendirmede kontrol ve anti-EGF grubunda anlamlı fark gözlenmezken diğer gruplarda anlamlı fark gözlenmiştir.



**Resim 5.** A’da E13.5 günlük kontrol grubu Spi-B boyaması. B’de E13.5 günlük EGF grubu Spi-B boyaması. C’de E13.5 anti-EGF grubu Spi-B boyaması 40x görülmektedir.

#### 4.2.1.2. E13.5 gün UMOD boyaması

**Tablo 6.** E13.5 gün UMOD boyaması skor değerlendirme

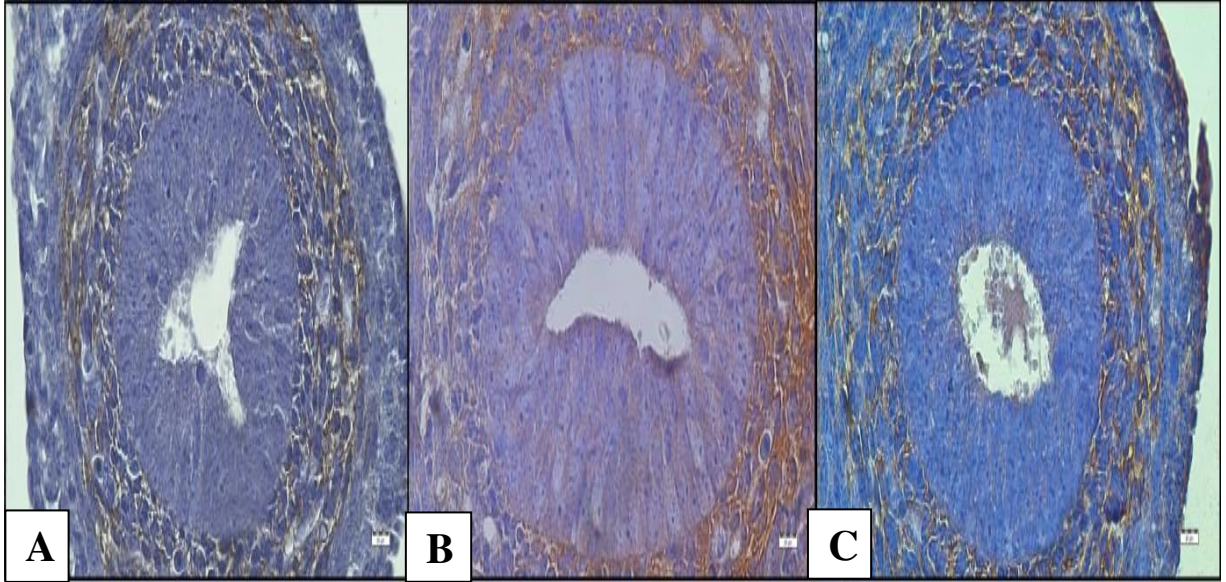
**Tablo 6a.**

| UMOD 13.5 |                |            |                                 |
|-----------|----------------|------------|---------------------------------|
| Grup      | Ortalama değer | Std. sapma | Anlamlılık(p)<br>Kruskal-wallis |
| Kontrol   | 0              | 0          | <b>0,000</b>                    |
| EGF       | 1,83           | 0,75       |                                 |
| Anti-EGF  | 0              | 0          |                                 |
| Toplam    | 0,61           | 0,97       |                                 |

**Tablo 6b.**

| Mann Whitney U testi: UMOD 13.5 |                         |
|---------------------------------|-------------------------|
| Gruplar                         | Anlamlılık(p)<br>değeri |
| Kontrol /EGF                    | <b>0,019</b>            |
| EGF/Anti-EGF                    | <b>0,001</b>            |
| Anti-EGF/kontrol                | 0,247                   |

Gruplar arasında Kruskal Wallis testi ile anlamlı fark görülmüştür. Mann Whitney U testi ile yapılan ikili değerlendirmede kontrol ve anti-EGF karşılaştırmasında anlamlı fark gözlenmezken, diğer gruplarda anlamlı fark gözlenmiştir.



**Resim 6.** A’da E13.5 günlük kontrol grubu UMOD boyaması. B’de E13.5 günlük EGF grubu UMOD boyaması. C’de E13.5 anti-EGF grubu UMOD boyaması 40x görülmektedir.

#### 4.2.1.3. E13.5 gün GP2 boyaması

**Tablo 7.** E13.5 gün GP2 boyaması skor değerlendirme

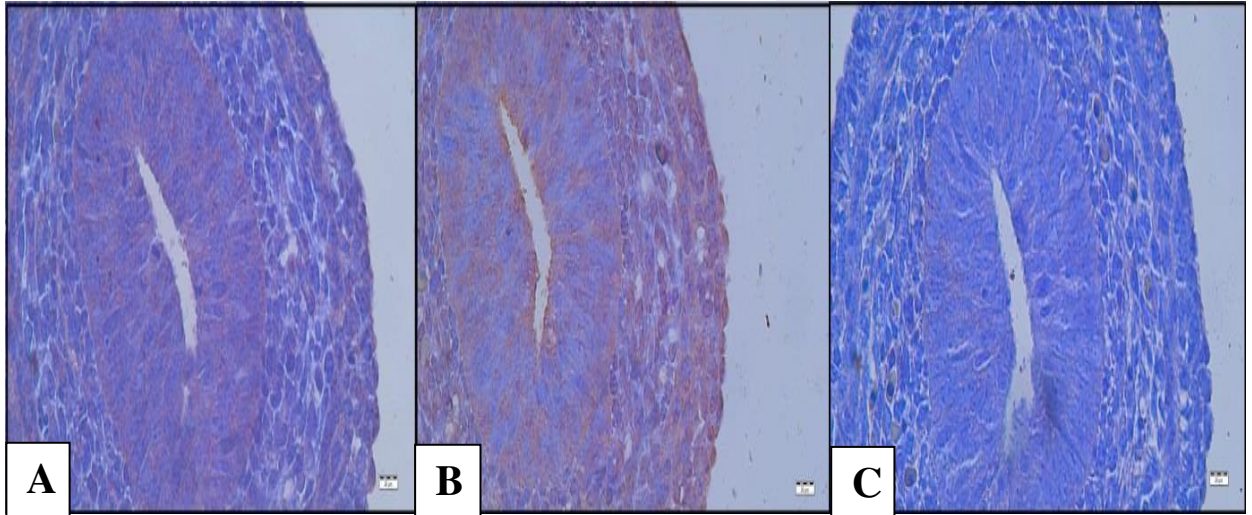
**Tablo 7a.**

| GP2 13.5 |                |            |                                 |
|----------|----------------|------------|---------------------------------|
| Grup     | Ortalama değer | Std. sapma | Anlamlılık(p)<br>Kruskal-wallis |
| Kontrol  | 1              | 0,89       | <b>0,001</b>                    |
| EGF      | 2,1            | 0,75       |                                 |
| Anti-EGF | 0              | 0          |                                 |
| Toplam   | 0,94           | 1,05       |                                 |

**Tablo 7b.**

| Mann Whitney U testi: GP2 13.5 |                      |
|--------------------------------|----------------------|
| Gruplar                        | Anlamlılık(p) değeri |
| Kontrol /EGF                   | 0,029                |
| EGF/Anti-EGF                   | 0,000                |
| Anti-EGF/kontrol               | 0,136                |

Gruplar arasında Kruskal Wallis testi ile anlamlı fark görülmüştür. Mann Whitney U testi ile yapılan ikili değerlendirmede kontrol ve anti-EGF karşılaştırmasında anlamlı fark gözlenmezken, diğer gruplarda anlamlı fark gözlenmiştir.



**Resim 7.** A'da E13.5 günlük kontrol grubu GP2 boyaması. B'de E13.5 günlük EGF grubu GP2 boyaması. C'de E13.5 anti-EGF grubu GP2 boyaması 40x görülmektedir.

#### 4.2.2. E15.5 gün embriyo değerlendirme

##### 4.2.2.1 E15.5 gün Spi-B boyaması

**Tablo 8.** E15.5 gün Spi-B boyaması skor değerlendirme

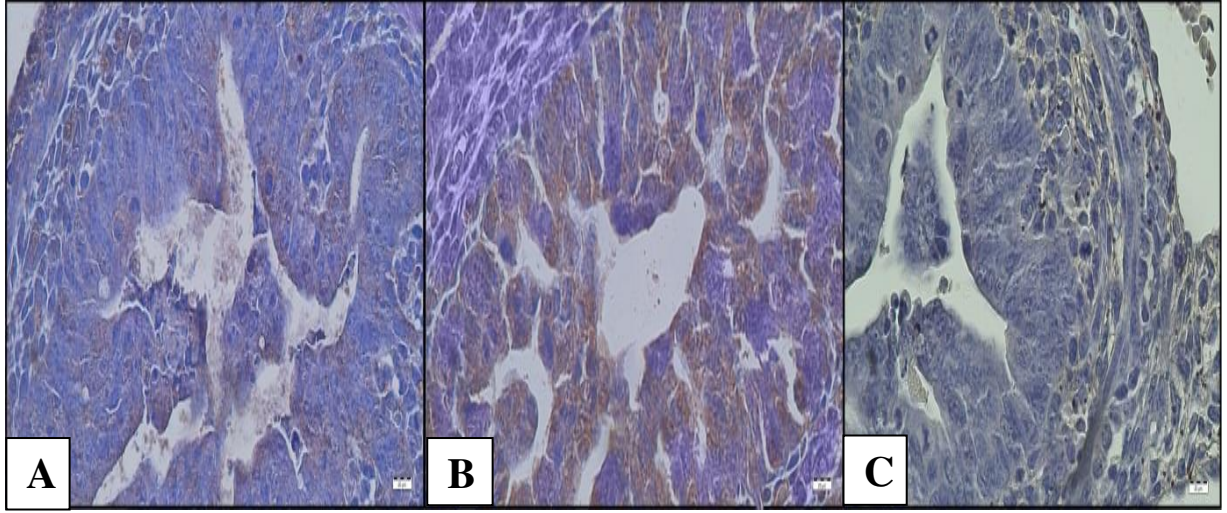
**Tablo 8a.**

| Spi-B 15.5 |                |            |                                 |
|------------|----------------|------------|---------------------------------|
| Grup       | Ortalama değer | Std. sapma | Anlamlılık(p)<br>Kruskal-wallis |
| Kontrol    | 1,33           | 0,51       | <b>0,000</b>                    |
| EGF        | 3,33           | 0,51       |                                 |
| Anti-EGF   | 0              | 0          |                                 |
| Toplam     | 1,55           | 1,46       |                                 |

**Tablo 8b.**

| Mann Whitney U testi: Spi-B 15.5 |                         |
|----------------------------------|-------------------------|
| Gruplar                          | Anlamlılık(p)<br>değeri |
| Kontrol /EGF                     | 0,002                   |
| EGF/Anti-EGF                     | 0,002                   |
| Anti-EGF/kontrol                 | 1                       |

Gruplar arasında Kruskal Wallis testi ile anlamlı fark görülmüştür. Mann Whitney U testi ile yapılan ikili değerlendirmede anti-EGF ve Kontrol grubu karşılaştırmasında anlamlı fark gözlenmezken, diğer gruplarda anlamlı fark gözlenmiştir.



**Resim 8.** A’da E15.5 günlük kontrol grubu Spi-B boyaması. B’de E15.5 günlük EGF grubu Spi-B boyaması. C’de E15.5 anti-EGF grubu Spi-B boyaması 40x görülmektedir.

#### 4.2.2.2. E15.5 gün UMOD boyaması

**Tablo 9.** E15.5 gün UMOD boyaması skor değerlendirme

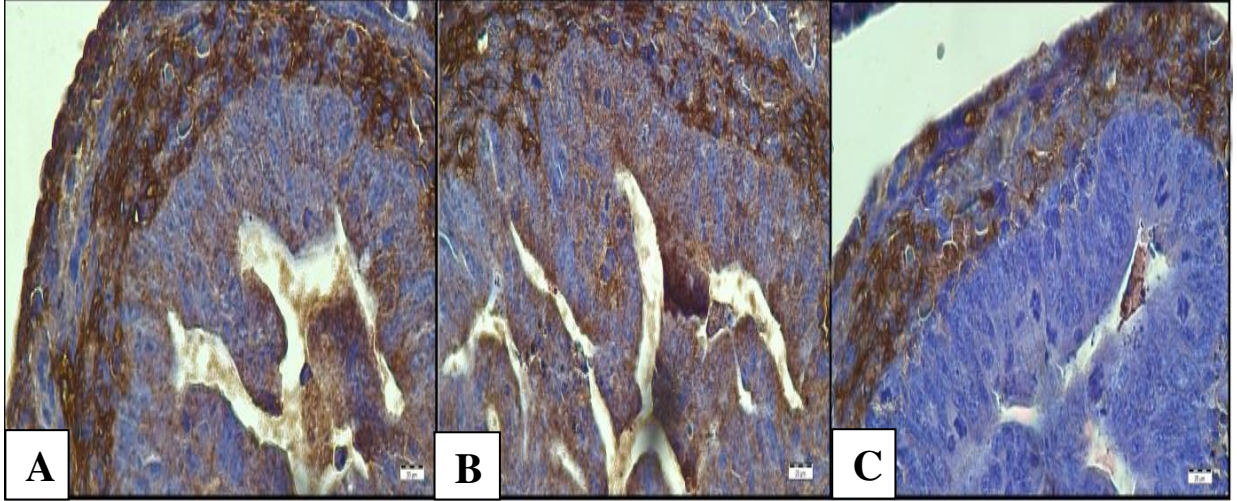
**Tablo 9a.**

| UMOD 15.5 |                |            |                                 |
|-----------|----------------|------------|---------------------------------|
| Grup      | Ortalama değer | Std. sapma | Anlamlılık(p)<br>Kruskal-wallis |
| Kontrol   | 1,83           | 0,75       | <b>0,002</b>                    |
| EGF       | 2,16           | 0,75       |                                 |
| Anti-EGF  | 0              | 0          |                                 |
| Toplam    | 1,33           | 1,13       |                                 |

**Tablo 9b.**

| Mann Whitney U testi: UMOD 15.5 |                         |
|---------------------------------|-------------------------|
| Gruplar                         | Anlamlılık(p)<br>değeri |
| Kontrol /EGF                    | 0,612                   |
| EGF/Anti-EGF                    | 0,001                   |
| Anti-EGF/kontrol                | 0,005                   |

Gruplar arasında Kruskal Wallis testi ile anlamlı fark görülmüştür. Mann Whitney U testi ile yapılan ikili değerlendirmede Kontrol ve EGF karşılaştırmasında anlamlı fark gözlenmezken, diğer gruplarda anlamlı fark gözlenmiştir.



**Resim 9.** A’da E15.5 günlük kontrol grubu UMOD boyaması. B’de E15.5 günlük EGF grubu UMOD boyaması. C’de E15.5 anti-EGF grubu UMOD boyaması 40x görülmektedir.

#### 4.2.2.3. E15.5 gün GP2 boyaması

**Tablo 10.** E15.5 gün GP2 boyaması skor değerlendirme

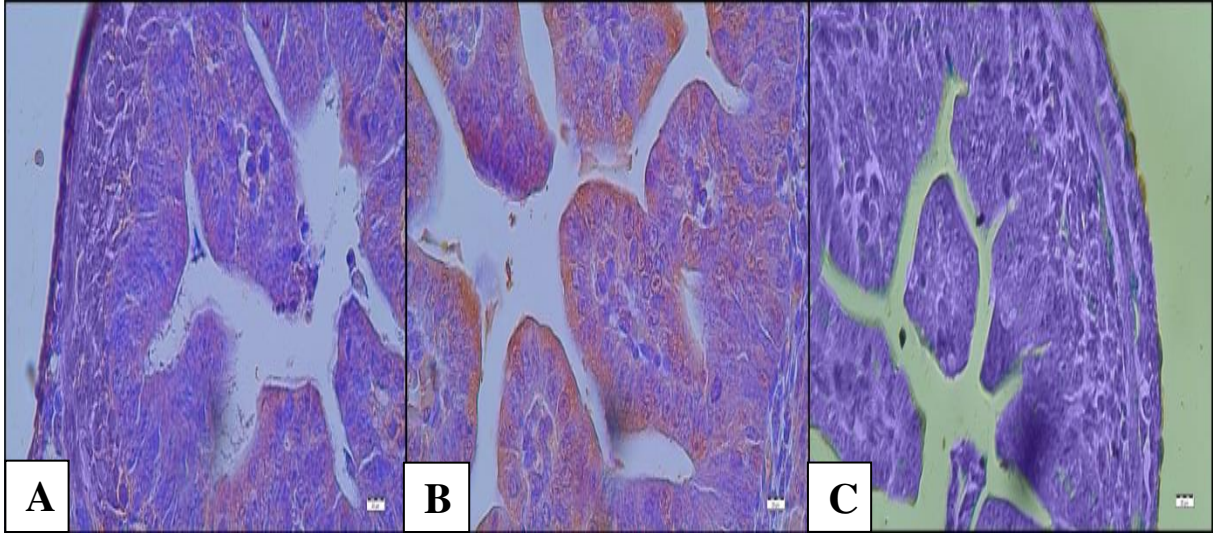
**Tablo 10a.**

| GP2 15.5 |                |            |                                 |
|----------|----------------|------------|---------------------------------|
| Grup     | Ortalama değer | Std. sapma | Anlamlılık(p)<br>Kruskal-wallis |
| Kontrol  | 1,16           | 0,40       | <b>0,000</b>                    |
| EGF      | 3,5            | 0,54       |                                 |
| Anti-EGF | 0              | 0          |                                 |
| Toplam   | 1,55           | 1,54       |                                 |

**Tablo 10b.**

| Mann Whitney U testi: GP2 15.5 |                      |
|--------------------------------|----------------------|
| Gruplar                        | Anlamlılık(p) değeri |
| Kontrol /EGF                   | <b>0,044</b>         |
| EGF/Anti-EGF                   | <b>0,000</b>         |
| Anti-EGF/kontrol               | <b>0,044</b>         |

Gruplar arasında Kruskal Wallis testi ile anlamlı fark görülmüştür. Mann Whitney U testi ile yapılan ikili değerlendirmede anlamlı fark gözlenmiştir.



**Resim 10.** A'da E15.5 günlük kontrol grubu GP2 boyaması. B'de E15.5 günlük EGF grubu GP2 boyaması. C'de E15.5 anti-EGF grubu GP2 boyaması 40x görülmektedir.

#### 4.2.3. E17.5 gün embriyo değerlendirme

##### 4.2.3.1. E17.5 gün Spi-B boyaması

**Tablo 11.** E17.5 gün Spi-B boyaması skor değerlendirme

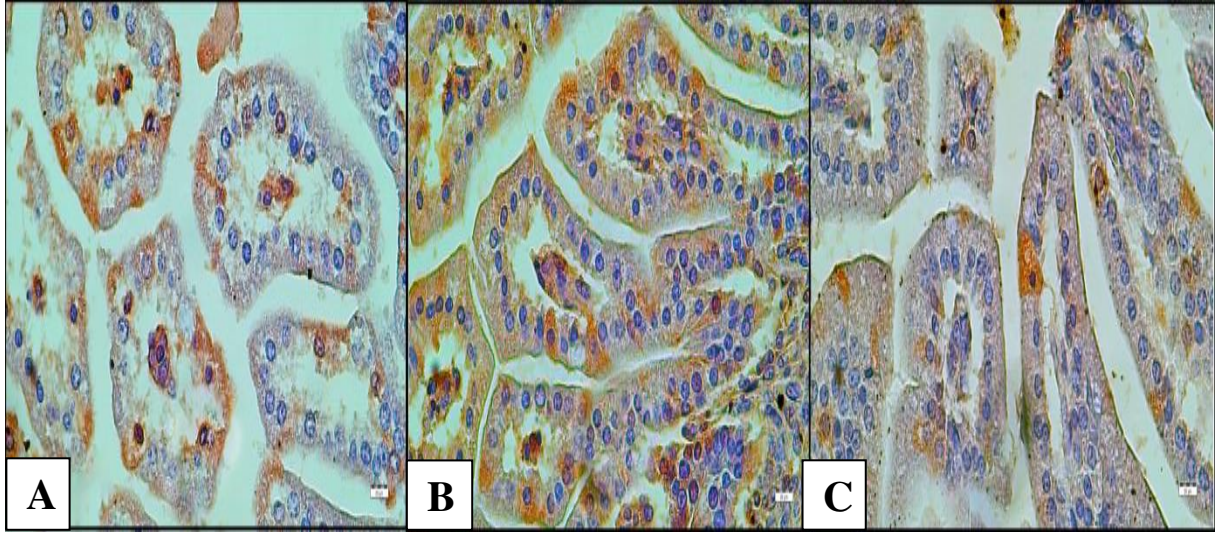
**Tablo 11a.**

| Spi-B 17.5 |                |            |                                 |
|------------|----------------|------------|---------------------------------|
| Grup       | Ortalama değer | Std. sapma | Anlamlılık(p)<br>Kruskal-wallis |
| Kontrol    | 1,83           | 0,75       | <b>0,002</b>                    |
| EGF        | 3,5            | 0,54       |                                 |
| Anti-EGF   | 1,16           | 0,40       |                                 |
| Toplam     | 2,16           | 1,15       |                                 |

**Tablo 11b.**

| Mann Whitney U testi: Spi-B 17.5 |                         |
|----------------------------------|-------------------------|
| Gruplar                          | Anlamlılık(p)<br>değeri |
| Kontrol /EGF                     | <b>0,045</b>            |
| EGF/Anti-EGF                     | <b>0,000</b>            |
| Anti-EGF/kontrol                 | <b>0,045</b>            |

Gruplar arasında Kruskal Wallis testi ile anlamlı fark görülmüştür. Mann Whitney U testi ile yapılan ikili değerlendirmede tüm karşılaştırmalarda anlamlı fark gözlenmiştir.



**Resim 11.** A’da E17.5 günlük kontrol grubu Spi-B boyaması. B’de E17.5 günlük EGF grubu Spi-B boyaması. C’de E17.5 anti-EGF grubu Spi-B boyaması 40x görülmektedir.

#### 4.2.3.2. E17.5 gün UMOD boyaması

**Tablo 12.** E17.5 gün UMOD boyaması skor değerlendirme

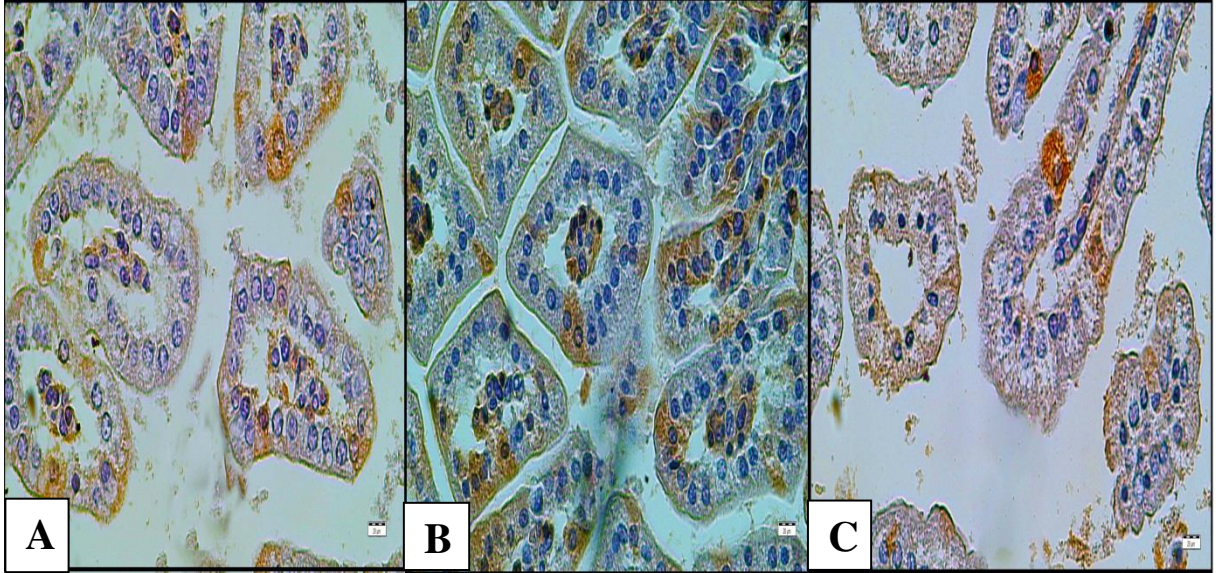
**Tablo 12a.**

| UMOD 17.5 |                |            |                                 |
|-----------|----------------|------------|---------------------------------|
| Grup      | Ortalama değer | Std. sapma | Anlamlılık(p)<br>Kruskal-wallis |
| Kontrol   | 1,5            | 0,54       | <b>0,001</b>                    |
| EGF       | 3              | 0,63       |                                 |
| Anti-EGF  | 0,83           | 0,40       |                                 |
| Toplam    | 1,77           | 1,06       |                                 |

**Tablo 12b.**

| Mann Whitney U testi: UMOD 17.5 |                      |
|---------------------------------|----------------------|
| Gruplar                         | Anlamlılık(p) değeri |
| Kontrol /EGF                    | <b>0,020</b>         |
| EGF/Anti-EGF                    | <b>0,000</b>         |
| Anti-EGF/kontrol                | 0,198                |

Gruplar arasında Kruskal Wallis testi ile anlamlı fark görülmüştür. Mann Whitney U testi ile yapılan ikili değerlendirmede kontrol ve anti-EGF karşılaştırmasında anlamlı fark gözlenmezken, diğer gruplarda anlamlı fark gözlenmiştir.



**Resim 12.** A'da E17.5 günlük kontrol grubu UMOD boyaması. B'de E17.5 günlük EGF grubu UMOD boyaması. C'de E17.5 anti-EGF grubu UMOD boyaması 40x görülmektedir.

#### 4.2.3.3. E17.5 gün GP2 boyaması

**Tablo 13.** E17.5 gün GP2 boyaması skor değerlendirme

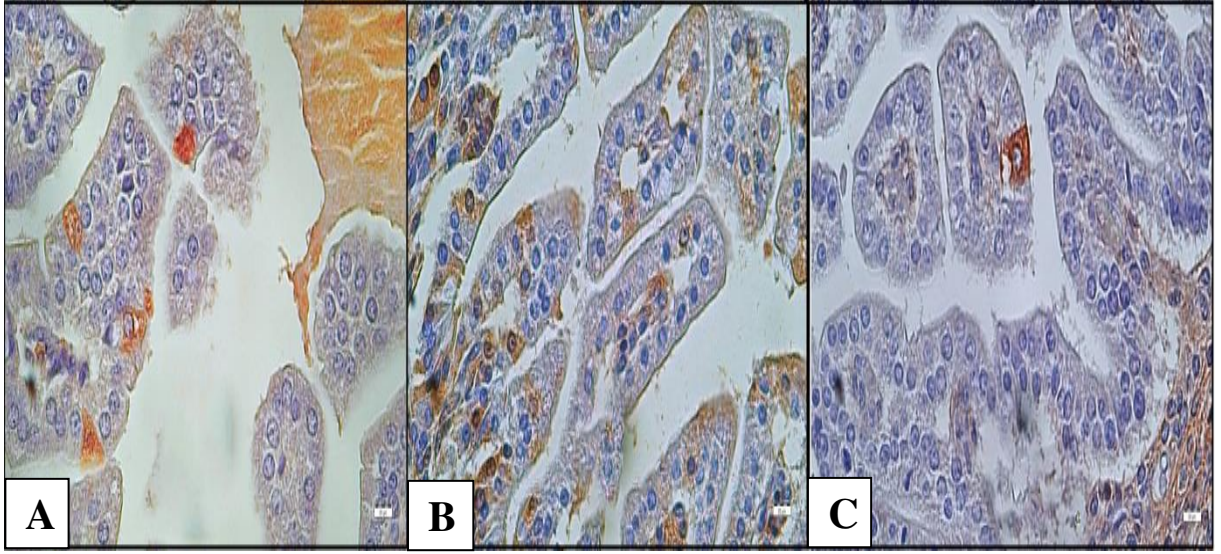
**Tablo 13a.**

| GP2 17.5 |                |            |                                 |
|----------|----------------|------------|---------------------------------|
| Grup     | Ortalama değer | Std. sapma | Anlamlılık(p)<br>Kruskal-wallis |
| Kontrol  | 1,66           | 0,51       | <b>0,001</b>                    |
| EGF      | 3,5            | 1,09       |                                 |
| Anti-EGF | 0,83           | 0,51       |                                 |
| Toplam   | 2              | 1,23       |                                 |

**Tablo 13b.**

| Mann Whitney U testi: Gp2 17.5 |                         |
|--------------------------------|-------------------------|
| Gruplar                        | Anlamlılık(p)<br>değeri |
| Kontrol /EGF                   | <b>0,021</b>            |
| EGF/Anti-EGF                   | <b>0,000</b>            |
| Anti-EGF/kontrol               | 0,143                   |

Gruplar arasında Kruskal Wallis testi ile anlamlı fark görülmüştür. Mann Whitney U testi ile yapılan ikili değerlendirmede kontrol ve anti-EGF karşılaştırmasında anlamlı fark gözlenmezken, diğer gruplarda anlamlı fark gözlenmiştir.



**Resim 13.** A’da E17.5 günlük kontrol grubu GP2 boyaması. B’de E17.5 günlük EGF grubu GP2 boyaması. C’de E17.5 anti-EGF grubu GP2 boyaması 40x görülmektedir.

## 5.TARTIŞMA

M hücreleri mukozal epitel içine yerleşmiş bağışıklık sistemi hücreleridir. Mukoza altında yer alan mukozal ilişkili lenfoid dokuya antijen sunumunu sağlayarak, hem mukozal hem de sistemik bağışıklık yanıtın gelişiminde başlangıç basamağını oluştururlar. M hücrelerinin sahip olduğu, komşu olduğu epitel hücrelerinden farklılık gösteren yapısal ve fonksiyonel özellikleri bu hücrelerin birincil görevlerinin antijen aktarımı olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda birçok patojen tarafından konakçı dokuya giriş kapısı olarak da kullanılırlar. Bu özellikleri M hücrelerini ağız ve burundan aşı, bağırsaktan ilaç uygulamaları için hedef haline getirmektedir. M hücrelerinin antijen örneklemeindeki rolü bu hücreleri oral bağışıklık tedavisi uygulamaları için de değerli kılmaktadır. *İn vitro* M hücresi kültürlerinde daha fazla gelişme sağlanması sonrasında M hücresi hakkında bilinenlerin artması, tedavi ve uygulamalarda M hücresi aracılı farklılıklar sağlayacaktır.

M hücrelerinin antijen aktarımından farklı bir görevi daha vardır. Aktarım sırasında T ve B hücrelerini uyaran ek etmenler (kofaktörler) salgılar. M hücrelerinin interlekin 1 (IL-1) ürettiği gösterilmiştir (Pappo ve ark. 1993). Sitokin üretimi bu hücrelerin sadece basit olarak antijen aktarımı yapmadığını, aynı zamanda mukozal bağışıklık yanıtının erken evresinde de düzenleyici rol oynadığını göstermektedir (Pappo ve ark. 1993).

Peyer Plakları bağırsakla ilişkili lenfoid dokunun (GALT) üzerindeki özel intestinal epitel alanlarından oluşur. Yakın zamanda bağırsakların sindirim fonksiyonları için gerekli olan tüm epitel hücrelerinin Lgr5 eksprese eden kök hücrelerden üretildiği gösterilmiştir. Kemik iliği kaynaklı immün hücrelerin efektör fonksiyonlarını kontrol ettiği bilinen ETS familyası transkripsiyon faktörü olan Spi-B, özellikle M hücrelerinde eksprese edilir. RankL in vivo olarak M hücre gelişimini indükleyebileceği gösterilmiştir. Bağırsak organoid ("minigut") kültürlerinde RankL ile uyarılmanın 24 saat içinde Spi-B ekspresyonunu ve daha sonra diğer M hücre belirteçlerinin ekspresyonunu indüklediğini göstermiştir. RankL kaynaklı Spi-B ekspresyonunun, Lgr5 kök hücre kaynaklı epitel prekürsörlerinin, hücreler halinde gelişim için şart olduğu sonucuna varılmıştır. Bu gen ekspresyonu en erken farelerde embriyolojik gelişiminin 15.5'inci gününde saptanmıştır (Lau ve ark. 2012). Biz çalışmamızda EGF kullanarak M hücre gelişimini, M hücrelerini gösteren belirteçlerin yoğunluğuna bakarak 15.5'inci günden erken olarak 13.5 günlük fare embriyosunda immunohistokimyasal olarak saptadık ve M hücre sayısında anlamlı bir artışı gözlemledik. EGF reseptörü blokörü monoklonal bir antikör kullanarak da M hücrelerinin gelişmesinin azaldığını gözlemledik.

M hücrelerindeki Spi-B gen ekspresyonu erişkin vahşi tip hayvanların embriyonik gelişimi sırasında Peyer Plaklarında ifade edilir. Bilinen herhangi bir transkripsiyonel regülatörün M hücre fenotipinde yer alıp almadığını belirlemek için floresansla aktive edilmiş hücre sıralama (FACS) yapılan ince bağırsak M hücrelerinden türetilmiş mikroyarray verileri değerlendirilmiş, PU1 ile yakından ilişkili bir ETS transkripsiyon faktörü olan Spi-B'nin anlamlı ifadesi gözlemlenmiştir (Dahl ve ark.2002). Biz çalışmamızda Peyer Plakları dışındaki epitel bölgelerinde de Spi-B gen ekspresyonu varlığını gözlemledik.

M hücrelerinin farklılaşmasının altında yatan moleküler mekanizmalar hakkındaki son çalışmalardan elde edilen bilgilerin toplanması, M hücrelerinin farklılaşma sürecinin ana bileşenlerini kademeli olarak ortaya koymuştur. RANKL tarafından tetiklenen alternatif NF- $\kappa$ B sinyalizasyonu, M hücre farklılaşmasının başlatılması için kritik öneme sahiptir. GALT'de RANKL (MCi hücreleri) eksprese eden subepitelyal mezenkimal hücreler farklılaşmalarını M hücrelerine yönlendirmek için intestinal epitelyal kök hücreler üzerinde etki gösterir. Transkripsiyon faktörü Spi-B M hücresi farklılaşması için gereklidir. Ayrıca farklılaştırılmış M hücreleri GP2'nin ekspresyonuna dayanan fonksiyonel olarak iki farklı alt tipte sınıflandırılır: GP2-yüksek hücreler olgun M hücreleridir ve yüksek bir alım kapasitesine sahipken, GP2-negatif veya düşük hücreler olgunlaşmamış M hücreleridir (Kimura 2018). Biz çalışmamızda embriyolojik gelişim sürecinde GP2 eksprese eden hücreleri gözlemledik. Bu da muhtemelen amniyon sıvısında bir antijenle karşılaşıldığının göstergesi olabilir.

Günlük EGF tedavisinin enterit oluşumunu, kilo kaybını engellediğini ve enteropatojenik *E. coli* bakterisine karşı GİS'i koruduğunu bildirilmiştir. Rotavirüs ile enfekte olmuş yenidoğan domuzlarda oral olarak verilen EGF'nin bağırsak epitelinin ve mukozasının yenilenmesi, enzim aktiviteleri üzerine pozitif yönde etkisi olduğu gösterilmiştir (Zijlstra ve ark. 1994). Anne sütündeki EGF'nin nekrotizan enterokolit gelişmesine engel olduğu saptanmıştır (Good ve ark. 2015). Gebe ratlarda uygulanan eksojen EGF'nin fetal gelişimi hızlandırdığı görülmüştür (Jansson ve Skarland 1990). Biz de çalışmamızda bağırsak epitel yüzey alanının EGF verilen gruplarda diğer gruplara göre daha erken artış gösterdiğini ve EGF reseptörlerinin bloke edildiği grubun 15.5 günlük embriyolarında fizyolojik herniasyona rastlarken, diğer 15.5 günlük embriyo gruplarında herniye olan bağırsak kısımlarının karın içinde olduğunu gözlemledik.

İn vitro çalışma ortamında uygulanan EGF'nin M hücre sayısında ve farklılaşmasında artış sağladığı görülmüştür (Chaikhumwang ve ark. 2017). Bizim in vivo çalışmamızda M hücre sayısının EGF verilen grupta arttığı, EGF reseptörlerinin bloke edildiği grupta ise belirteç yoğunluğuna göre bu hücrelerin sayısının azaldığını gözlemledik.

Özetle EGF uygulanması mikro-katlantı (M) hücrelerine ait spesifik belirteçlerin düzeylerinde artış sağlayarak hücrelerin erken gelişimine pozitif yönde etki ederken, uygulanan anti-EGF ise bu düzeylerde ve dolayısıyla hücre sayısında azalmaya neden olmuş ve M hücrelerinin gelişimini engellemiştir.



## 6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Mikrofold (M) hücrelerinin embriyolojik gelişim sürecinde EGF (Epidermal Büyüme Faktörü)'nün etkilerinin tespit edilmesi amaçlandı. Kontrol grubu, EGF verilen grup, EGF reseptörlerinin bloke edildiği grup olmak üzere toplamda 3 grup altında gebeliğin 13.5, 15.5, 17.5 günlerindeki fetusların bağırsakları immunohistokimyasal ve histokimyasal olarak değerlendirildi. EGF verilen grupta daha önce normal fetal gelişimin 15.5 gününde tespit edilen mikrofold hücre gelişimini bizim çalışmamızda 13.5'inci günde tespit ettik. Bu da EGF'nin in vivo ortamda mikrokatlantı (M) hücrelerinin erken gelişmesinde rolü olduğunu göstermiştir. Belirteçlerin yoğunluğuna göre EGF verilen gruplarda, diğer gruplara göre farklılaşan M hücrelerinin sayısında gözlenen artış EGF'nin M hücre sayısında da artışa neden olduğunu göstermektedir.

Rutin histokimyasal boyamalarda EGF verilen grupta bağırsak gelişiminin daha erken olduğu, diğer gruplarda ise EGF verilen gruba göre bağırsakların daha geç geliştiği saptanmıştır. Aynı zamanda EGF'nin epitel yüzey alanında da göreceli olarak daha erken bir artış sağladığını gözlemledik.

Bu bilgiler ışığında yaptığımız çalışmadan elde edilen sonuçların oral immunizasyon konusunda immun sistemi gelişmemiş bireyler veya prematüre doğan bebekler açısından faydalı olabileceği düşünülmektedir. Yaşlılarda azalan M hücre sayısının artırılmasının da bağışıklık sistemini desteklemek açısından faydalı olabileceği kanısına varmış bulunmatayız. Fakat bu desteğin aynı zamanda kanser hücrelerinde de pozitif etki gösterebileceğinden kanser hücresi oluşumunun hızlanabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Amniyosentez endikasyonu sonucunda yapılan işlem anında oral immunizasyon gerçekleştirme olasılığı da araştırmalar düşüncesinde olabilir. Böylece fetusun doğuma kadar anne karnında immunizasyon sürecine başlaması sağlanmış olabilir.

Ayrıca M hücreleri sayısındaki artışın normal bireylerde antijen uyarımında da artışa sebep olacağından bu durumun atopik bir bünye oluşturma ihtimali açısından ileri araştırmalar yapılabilir.

M hücreleri sayısındaki artışın normal bağırsak florası oluşurken bağırsak mikrobiyatasının oluşumunda negatif etki göstermesi de ihtimaller arasındadır. Bu durum yaşamın ileri yıllarında beslenme sorunu ve gastrointestinal şikayetleri olarak ortaya çıkacaktır. Aynı zamanda kommensal bakterilerin oluşmaması nedeniyle K vitamini gibi endojen sentezlenen moleküllerin oluşumunun etkilenmesi de birtakım sistemik sorunların ortaya çıkmasına sebep olabilecektir.

Sonuç olarak literatürde EGF ve M hücreleri arasındaki ilişkiyi hedefleyen, multidisipliner bir şekilde olumlu ve olumsuz yönleri tasarlanarak ve bu ilişkinin tüm vücut fonksiyonları üzerindeki etkisinin değeriendirilmesi amaçlanarak yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.



## ÖZET

### **FARELERDE EMBRİYOLOJİK GELİŞİM SÜRECİNDE EGF(EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ) ve ANTI-EGF'NİN MICROFOLD(M) HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

**KAYHAN B. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Ana Bilim Dalı Tıpta Uzmanlık tezi, 2019.**

Mikrokatlantı hücreleri (M hücreler) mukozal lenfoid folikülleri çevreleyen folikül ilişkili epitelde yer alan mukozal immün yanıtı başlatan özelleşmiş epitelyal hücrelerdir. M hücreler luminal antijenleri olarak mukoza altında yer alan mukoza ilişkili lenfoid dokulara (MALT) bu antijenleri sunmaktadırlar. Epidermal büyüme faktörü, hücrelerin bölünmesi, farklılaşması, yaşaması, çoğalması, büyümesi ve hücre göçünü uyaran protein yapıda bir büyüme faktörü olup, organizmadaki pek çok fizyolojik ve patolojik süreçte rol almaktadır. EGF, anti-enflamatuvar, anti-apoptotik, nörotrofik ve nöroprotektif etkilere sahiptir.

Bu çalışmada M hücrelerinin embriyolojik gelişim sürecinde EGF (Epidermal Büyüme Faktörü) ve Anti-EGF olarak EGF reseptör blokleri olan bir monoklonal antikor'un etkilerinin tespit edilmesi amaçlandı. Kontrol grubu, EGF verilen grup, EGF reseptörleri bloklanan 3 grup altında olmak üzere fetal gelişimin 13.5, 15.5, 17.5 günlerindeki fetusların bağırsakların immunohistokimyasal ve histokimyasal olarak değerlendirildi.

Yapılan deney sonuçlarına göre, kontrol ve anti-EGF gruplarına kıyasla EGF verilen gruptaki mikrokatlantı hücrelerinin daha erken geliştiği ve belirteçleri açısından değerlendirildiğinde düzeylerinde artış olduğu gözlemlendi. Bu çalışmanın sonuçlar ışığında ileri zamandaki multidisipliner çalışmalar için yardımcı ve yol gösterici olacaktır.

**Anahtar kelimeler:** Mikrokatlantı, bağırsak, embriyo, epidermal büyüme faktörü

## **SUMMARY**

### **THE EFFECT OF EGF (EPIDERMAL GROWTH FACTOR) AND ANTI-EGF ON MICROFOLD (M) CELLS IN THE MICE EMBRYOLOGICAL DEVELOPMENT PROCESS**

**Kayhan B. Aydın Adnan Menderes University Faculty of Medicine Department of Histology and Embryology,2019**

Microfold cells (M cells) are specialized epithelial cells that initiate the mucosal immune response in the follicle-related epithelium surrounding mucosal lymphoid follicles. M cells receive luminal antigens and present these antigens to the mucosa-associated lymphoid tissues (MALT) located under the mucosa. Epidermal growth factor is a protein growth factor that stimulates cell division, differentiation, survival, proliferation, growth and cell migration and is involved in many physiological and pathological processes in the organism. EGF has anti-inflammatory, anti-apoptotic, neurotrophic and neuroprotective effects.

The aim of this study was to determine the effects of EGF (Epidermal Growth Factor) and an EGF receptor blocker monoclonal antibody used for Anti-EGF effect in embryonic development of M cells. The control group, EGF group, EGF receptors were divided into three groups, and the fetal intestines were evaluated immunohistochemically and histochemically on the 13.5, 15.5, 17.5 days of fetal development.

According to the results of the experiment, it was observed that the microfold cells in the EGF-treated group developed earlier and were increased in terms of their markers compared to the control and anti-EGF groups. In the light of the results of this study, it will be helpful and guiding for future multidisciplinary studies.

**Keywords:** Microfold, intestine, embryo, epidermal growth factor

## KAYNAKLAR

**A. Banan, J. Z. Fields, D. A. Talmage, Y. Zhang, and A. Keshavarzian**, “PKC- $\beta$ 1 mediates EGF protection of microtubules and barrier of intestinal monolayers against oxidants,” *American Journal of Physiology—Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 281, no. 3, pp. G833–G847, 2001.

**A. Banan, L. J. Zhang, M. Shaikh, J. Z. Fields, A. Farhadi, and A. Keshavarzian**, “Inhibition of oxidant-induced nuclear factor- $\kappa$ B activation and inhibitory- $\kappa$ B $\alpha$  degradation and instability of F-actin/cytoskeletal dynamics and barrier function by epidermal growth factor: key role of phospholipase- $\gamma$  isoform,” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 309, no. 1, pp. 356–368, 2004.

**A. Bedford, T. Chen, E. Huynh et al.**, “Epidermal growth factor containing culture supernatant enhances intestine development of early-weaned pigs in vivo: Potential mechanisms involved,” *Journal of Biotechnology*, vol. 196–197, pp. 9–19, 2015.

**A. Buret, M. E. Olson, D. Grant Gall, and J. A. Hardin**, “Effects of orally administered epidermal growth factor on enteropathogenic *Escherichia coli* infection in rabbits,” *Infection and Immunity*, vol. 66, no. 10, pp. 4917–4923, 1998.

**A. G. Buret, A. C. Chin, and K. G. E. Scott**, “Infection of human and bovine epithelial cells with *Cryptosporidium andersoni* induces apoptosis and disrupts tight junctional ZO-1: effects of epidermal growth factor,” *International Journal for Parasitology*, vol. 33, no. 12, pp. 1363–1371, 2003.

**A. Iwabu, K. Smith, F. D. Allen, D. A. Lauffenburger, and A. Wells**, “Epidermal growth factor induces fibroblast contractility and motility via a protein kinase C  $\delta$ -dependent pathway,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 15, pp. 14551–14560, 2004.

**A. A. Maynard, K. Dvorak, L. Khailova et al.**, “Epidermal growth factor reduces autophagy in intestinal epithelium and in the rat model of necrotizing enterocolitis,” *American Journal of Physiology—Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 299, no. 3, pp. G614–G622, 2010.

**A. G. Buret, K. Mitchell, D. G. Muench, and K. G. E. Scott**, “*Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor,” *Parasitology*, vol. 125, no. 1, pp. 11–19, 2002.

**Adachi S, Yoshida H, Kataoka H, Nishikawa S.** 1997. Three distinct steps in Peyer's patch formation of murine embryo. *Int. Immunol.* **9**:507–514.

**Asai T, Morrison SL.** The SRC family tyrosine kinase HCK and the ETS family transcription factors SPI-B and EHF regulate transcytosis across a human follicle-associated epithelium model. *J Biol Chem.* 2013;288(15):10395-10405.

**Barker N, et al.** 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**:1003–1007.

**Barker N, van de Wetering M, Clevers H.** 2008. The intestinal stem cell. *Genes Dev.* **22**:1856–1864.

**Belyakov IM, Berzofsky JA.** Immunobiology of mucosal HIV infection and the basis for development of a new generation of mucosal AIDS vaccines. *Immunity.* 2004;20:247–253

**Belyakov IM, Derby MA, Ahlers JD, Kelsall BL, Earl P, Moss B, Strober W, Berzofsky JA.** Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-vaccinia challenge. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:1709–1714.

**Bienenstock J, Johnston N.** A morphologic study of rabbit bronchial lymphoid aggregates and lymphoepithelium. *Lab Invest.* 1976;35(4):343-348.

**Bjerknes M, Cheng H.** 2006. Intestinal epithelial stem cells and progenitors. *Methods Enzymol.* 419:337–383.

**Bockman DE, Cooper MD.** Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study. *American Journal of Anatomy.* 1973;136(4):455-477.

**Boeckx N, Janssens K, Van Camp G, Rasschaert M, Papadimitriou K, Peeters M, et al.** The predictive value of primary tumor location in patients with metastatic colorectal cancer: a systematic review. *Crit Rev Oncol/Hematol.* 2018;121(Supplement C):1–10.

**Borghesi C, Regoli M, Bertelli E, Nicoletti C.** Modifications of the follicle-associated epithelium by short-term exposure to a non-intestinal bacterium. *J Pathol.* 1996;180(3):326-332.

**Bouter A, Gounou C, Bérat R, et al.** Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair. *Nature Communications*. 2011;2(1):270.

**Boyce BF, Xing L.** Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(1):1-7.

**Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW.** Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunology*. 2008;1(1):31-37.

**Brayden DJ, Baird AW.** Apical membrane receptors on intestinal M cells: potential targets for vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56:721–726.

**Bunker JJ, Bendelac A.** IgA Responses to Microbiota. *Immunity*. 2018;49(2):211-224.

**C. Cellini, J. Xu, A. Arriaga, and T. L. Buchmiller-Crair,** “Effect of epidermal growth factor infusion on fetal rabbit intrauterine growth retardation and small intestinal development,” *Journal of Pediatric Surgery*, vol. 39, no. 6, pp. 891–897, 2004.

**Carpenter G, Cohen S .** Epidermal Growth factor. *the journal of biological chemistry*. Vol. 265, No. 14, Issue of May 15, pp. 7709-7712. 1990

**Carpenter, G., and Wahl, M. I.** (1990) *Handb. Exp. Pharmacol.* 951, 69-171

**Cerutti, A. and Rescigno, M.:** The biology of intestinal immunoglobulin A responses, *Immunity*, 28, 740-750 (2008).

**Chieppa M, Rescigno M, Huang AYC, Germain RN.** Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *Journal of Experimental Medicine*. 2006;203(13):2841-2852.

**Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, et al.** Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol*. **2005**;23(9):1803–10.

**Clark MA, Hirst BH, Jepson MA.** M-cell surface beta1 integrin expression and invasion-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun*. 1998;66(3):1237-1243.

**Clark MA, Jepson MA, Hirst BH.** 1995. Lectin binding defines and differentiates M-cells in mouse small intestine and caecum. *Histochem. Cell Biol*. **104**:161–168.

**Clark MA, Jepson MA, Simmons NL, Booth TA, Hirst BH.** Differential expression of lectin-binding sites defines mouse intestinal M-cells. *J Histochem Cytochem.* 1993;41(11):1679-1687.

**Cohen, S., and Elliott, G.** (1963) *J. Invest. Dermatol.* 40, 1-5

**Colomer V, Lal K, Hoops TC, Rindler MJ.** Exocrine granule specific packaging signals are present in the polypeptide moiety of the pancreatic granule membrane protein GP2 and in amylase: implications for protein targeting to secretory granules. *EMBO J.* 1994;13(16):3711-3719.

**D. N. Lee, W. F. Chang, I. T. Yu, P. W. S. Chiou, and C. F. Weng,** “Effects of diets supplemented with recombinant epidermal growth factor and glutamine on gastrointestinal tract development of early weaned piglets,” *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, vol. 21, no. 4, pp. 582–589, 2008.

**D. Wang, S. Xu, Y. Lin et al.,** “Recombinant porcine epidermal growth factor-secreting *Lactococcus lactis* promotes the growth performance of early-weaned piglets,” *BMC Veterinary Research*, vol. 10, no. 1, article 171, 2014.

**D.Gunzel and A. S. L. Yu,** “Claudins and themodulation of tightjunction permeability,” *Physiological Reviews*, vol. 93, no. 2, pp.525–569, 2013.

**D.-N. Lee, T.-Y. Kuo, M.-C. Chen, T.-Y. Tang, F.-H. Liu, and C.-F. Weng,** “Expression of porcine epidermal growth factor in *Pichia pastoris* and its biology activity in early-weaned piglets,” *Life Sciences*, vol. 78, no. 6, pp. 649–654, 2006.

**Dahl R, Ramirez-Bergeron DL, Rao S, Simon MC.** 2002. Spi-B can functionally replace PU.1 in myeloid but not lymphoid development. *EMBO J.* 21:2220 –2230.

**Dahl R, Ramirez-Bergeron DL, Rao S, Simon MC.** 2002. Spi-B can functionally replace PU.1 in myeloid but not lymphoid development. *EMBO J.* 21:2220 –2230.

**Darnay BG, Besse A, Poblentz AT, Lamothe B, Jacoby JJ.** TRAFs in RANK Signaling. In: *TNF Receptor Associated Factors (TRAFs)*. Vol 597. Advances in Experimental Medicine and Biology. New York, NY: Springer, New York, NY; 2007:152-159.

**de Lau W, Kujala P, Schneeberger K, et al.** Peyer's Patch M Cells Derived from Lgr5+ Stem Cells Require Spi-B and Are Induced by RankL in Cultured ‘Miniguts’. *Mol Cell Biol.* 2012;32(18):3639-3647.

**de Lau, W. et al.** Peyer's patch M cells derive from Lgr5 stem cells, require Spi-B and are induced by RankL in cultured 'organoids'. *Mol. Cell Biol.* 32, 3639–3647 (2012).

**de Lau, W. et al.** Peyer's patch M cells derived from Lgr5 stem cells require Spi-B and are induced by RankL in cultured "Miniguts". *Mol. Cell. Biol.* 32, 3639–3647 (2012).

**Donaldson, D.S. et al.** M cell depletion blocks oral prion disease pathogenesis. *Mucosal Immunol.* 5, 216–225 (2012).

**Ebisawa M, Hase K, Takahashi D, et al.** CCR6hiCD11c(int) B cells promote M-cell differentiation in Peyer's patch. *Int Immunol.* 2011;23(4):261-269.

**Ebisawa, M. et al.** CCR6hiCD11c(int) B cells promote M-cell differentiation in Peyer's patch. *Int. Immunol.* 23, 261–269 (2011).

**Fagarasan S, Muramatsu M, Suzuki K, Nagaoka H, Hiai H, Honjo T.** Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science.* 2002;298(5597):1424-1427.

**Fransen F, Zagato E, Mazzini E, et al.** BALB/c and C57BL/6 Mice Differ in Polyreactive IgA Abundance, which Impacts the Generation of Antigen-Specific IgA and Microbiota Diversity. September 2015.

**G. Duh, N. Mouri, D. Warburton, and D. W. Thomas,** "EGF regulates early embryonic mouse gut development in chemically defined organ culture," *Pediatric Research*, vol. 48, no. 6, pp. 794–802, 2000.

**G. Samak, S. Aggarwal, and R. K. Rao,** "ERK is involved in EGF-mediated protection of tight junctions, but not adherens junctions, in acetaldehyde-treated Caco-2 cell monolayers," *American Journal of Physiology—Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 301, no. 1, pp. G50–G59, 2011.

**Gebert A, Rothlotter H-J, Pabst R.** M Cells in Peyer's Patches of the Intestine. *International Review of Cytology.* 1996;167:91-159.

**Giannasca PJ, Giannasca KT, Falk P, Gordon JI, Neutra MR.** Regional differences in glycoconjugates of intestinal M cells in mice: potential targets for mucosal vaccines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1994;267(6):G1108-G1121.

**Golovkina TV, Shlomchik M, Hannum L, Chervonsky A.** Organogenic Role of B Lymphocytes in Mucosal Immunity. *Science*. 1999;286(5446):1965-1968. doi:10.1126/science.286.5446.1965.

**Gregory, H.** (1975) *Nature* 257,325-327

**H. F. Zeng and R. C. Harris,** “Epidermal growth factor, from gene organization to bedside,” *Seminars in Cell&Developmental Biology*, vol. 28, pp. 2–11, 2014.

**Hase K, Kawano K, Nochi T, et al.** Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature*. 2009;462(7270):226-230.

**Hase K, Kimura S, Takatsu H, et al.** M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex. *Nat Cell Biol*. 2009;11(12):1427-1432.

**Hase K, Ohshima S, Kawano K, et al.** Distinct gene expression profiles characterize cellular phenotypes of follicle-associated epithelium and M cells. *DNA Res*. 2005;12(2):127-137.

**Hase, K. et al.** The membrane-bound chemokine CXCL16 expressed on follicle-associated epithelium and M cells mediates lymph-epithelial interaction in GALT. *J. Immunol*. 176, 43–51 (2006).

**Hase, K. et al.** Uptake through glycoprotein 2 of FimH(§) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* 462, 226–230 (2009).

**Hase, K., Kawano, K., Nochi, T., Pontes, G. S., Fukuda, S.,** Ebisawa, M., Kadokura, K., Tobe, T., Fujimura, Y., Kawano, S., and other 12 authors: Uptake through glycoprotein 2 of FimH(§) bacteria by M cells initiates mucosal immune response, *Nature*, 462, 226e230 (2009).

**Hollenhorst PC, McIntosh LP, Graves BJ.** Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. *Annu Rev Biochem*. 2011;80(1):437-471.

**Iorember FM, Vehaskari VM.** Uromodulin: old friend with new roles in health and disease. *Pediatr Nephrol*. 2014;29(7):1151-1158.

**Iotsova V, Caamaño J, Loy J, Yang Y, Lewin A, Bravo R.** Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2. *Nat Med*. 1997;3(11):1285-1289.

**Iwasaki A, Kelsall BL.** Localization of Distinct Peyer's Patch Dendritic Cell Subsets and Their Recruitment by Chemokines Macrophage Inflammatory Protein (Mip)-3 $\alpha$ , Mip-3 $\beta$ , and Secondary Lymphoid Organ Chemokine. *J Exp Med*. 2000;191(8):1381-1394.

**J. A. Clark, A. T. Clark, R. S. Hotchkiss, T. G. Buchman, and C.M.Coopersmith,** "Epidermal growth factor treatment decreases mortality and is associated with improved gut integrity in sepsis," *Shock*, vol. 30, [33] P. Wee, H. Shi, J. Jiang, Y. Wang, and Z. Wang, "EGF stimulates the activation of EGF receptors and the selective activation of major signaling pathways during mitosis," *Cellular Signalling*, vol. 27, no. 3, pp. 638–651, 2015.

**J. A. Clark, S. M. Doelle, M. D. Halpern et al.,** "Intestinal barrier failure during experimental necrotizing enterocolitis: protective effect of EGF treatment," *American Journal of Physiology—Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 291, no. 5, pp. G938– G949, 2006.

**J. M. Lamb-Rosteski, L. D. Kalischuk, G. D. Inglis, and A. G. Buret,** "Epidermal growth factor inhibits *Campylobacter jejuni*-induced claudin-4 disruption, loss of epithelial barrier function, and *Escherichia coli* translocation," *Infection and Immunity*, vol. 76, no. 8, pp. 3390–3398, 2008.

**J.M.Campbell, J.D. Crenshaw, and J. Polo,** "The biological stress of early weaned piglets," *Journal of Animal Science and Biotechnology*, vol. 4, no. 1, article 19, 2013.

**Jang MH, Kweon MN, Iwatani K, Yamamoto M, Terahara K, Sasakawa C, Suzuki T, Nochi T, Yokota Y, Rennert PD, et al.** Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:6110–6115.

**Jang, M.H. et al.** Intestinal villous M cells: An antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 6110–6115 (2004).

**Jepson MA, Clark MA, Hirst BH.** M cell targeting by lectins: a strategy for mucosal vaccination and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56:511–525.

**Jinnohara T, Kanaya T, Hase K, et al.** IL-22BP dictates characteristics of Peyer's patch follicle-associated epithelium for antigen uptake. *J Exp Med*. 2017;216:jem.20160770.

**K. Jung, B.-K. Kang, J.-Y. Kim, K.-S. Shin, C.-S. Lee, and D.-S. Song,** “Effects of epidermal growth factor on atrophic enteritis in piglets induced by experimental porcine epidemic diarrhoea virus,” *Veterinary Journal*, vol. 177, no. 2, pp. 231–235, 2008.

**K. R. Groschwitz and S. P. Hogan,** “Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis,” *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 124, no. 1, pp. 3–20, 2009.

**Kanaya T, Hase K, Takahashi D, et al.** The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold cells. *Nat Immunol.* 2012;13(8):729-736.

**Kanaya T, Sakakibara S, Jinnohara T, et al.** Development of intestinal M cells and follicle-associated epithelium is regulated by TRAF6-mediated NF- $\kappa$ B signaling. *J Exp Med.* 2018;270:jem.20160659.

**Kanaya, T. et al.** The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold cells. *Nat. Immunol.* 13, 729–736 (2012).

**Kanaya, T. et al.** The Ets transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold cells. *Nat. Immunol.* 13, 729–736 (2012).

**Kashyap DR, Wang M, Liu L-H, Boons G-J, Gupta D, Dziarski R.** Peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by activating protein-sensing two-component systems. *Nat Med.* 2011;17(6):676-683.

**Kernéis S, Bogdanova A, Kraehenbuhl JP, Pringault E.** Conversion by Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science.* 1997;277(5328):949-952.

**Khan IU, Huang J, Liu R, Wang J, Xie J, Zhu N** (2017) Phage display-derived ligand for mucosal transcytotic receptor GP-2 promotes antigen delivery to M cells and induces antigen-specific immune response. *SLAS Discov* 22:879–886

**Kim D-Y, Sato A, Fukuyama S, et al.** The airway antigen sampling system: respiratory M cells as an alternative gateway for inhaled antigens. *J Immunol.* 2011;186(7):4253-4262.

**Kim, S. H., Seo, K. W., Kim, J., Lee, K. Y., and Jang, Y. S.:** The M cell-targeting ligand promotes antigen delivery and induces antigen-specific immune responses in mucosal vaccination, *J. Immunol.*, 185, 5787e5795 (2010).

**Kimura S, Kobayashi N, Nakamura Y, et al.** Sox8 is essential for M cell maturation to accelerate IgA response at the early stage after weaning in mice. *J Exp Med.* 2019;216(4):831-846.

**Kimura S, Yamakami-Kimura M, Obata Y, et al.** Visualization of the entire differentiation process of murine M cells: suppression of their maturation in cecal patches. *Mucosal Immunology.* 2015;8(3):650-660.

**Kishikawa S, Sato S, Kaneto S, et al.** Allograft inflammatory factor 1 is a regulator of transcytosis in M cells. *Nature Communications.* 2017;8:14509.

**Knoop KA, Kumar N, Butler BR, et al.** RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J Immunol.* 2009;183(9):5738-5747.

**Kobayashi A, Donaldson DS, Kanaya T, et al.** Identification of novel genes selectively expressed in the follicle-associated epithelium from the meta-analysis of transcriptomics data from multiple mouse cell and tissue populations. *DNA Res.* 2012;19(5):407-422.

**Kobayashi, A. et al.** Identification of novel genes selectively expressed in the follicle-associated epithelium from the meta-analysis of transcriptomics data from multiple mouse cell and tissue populations. *DNA Res.* 19, 407–422 (2012).

**Komban RJ, Strömberg A, Biram A, et al.** Activated Peyer's patch B cells sample antigen directly from M cells in the subepithelial dome. *Nature Communications.* 2019;10(1):2423.

**Komorowski L, Teegen B, Probst C, et al.** Autoantibodies against exocrine pancreas in Crohn's disease are directed against two antigens: the glycoproteins CUZD1 and GP2. *J Crohns Colitis.* 2013;7(10):780-790.

**Kozlowski PA, Neutra MR.** The role of mucosal immunity in prevention of HIV transmission. *Curr Mol Med.* 2003;3:217–228.

**Kunkel EJ, Butcher EC.** Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:822–829.

**Lapthorne S, Macsharry J, Scully P, Nally K, Shanahan F.** Differential intestinal M-cell gene expression response to gut commensals. *Immunology.* 2012;136(3):312-324.

**Lee MS, Menter DG, Kopetz S.** Right versus left colon cancer biology: integrating the consensus molecular subtypes. *afkorten.* 2017;15(3):411–9.

**Lelouard, H., Fallet, M., De Bovis, B., Meresse, S. & Gorvel, J.P.** Peyer's patch dendritic cells sample antigens by extending dendrites through M cell-specific transcellular pores. *Gastroenterology* 142, 592–601 (2012).

**Lo D, Tynan W, Dickerson J, Mendy J.** Peptidoglycan recognition protein expression in mouse Peyer's Patch follicle associated epithelium suggests functional specialization. *Cellular Immunology*. 2003;224(1):8-16.

**Lorenz, R.G. & Newberry, R.D.** Isolated lymphoid follicles can function as sites for induction of mucosal immune responses. *Ann. New York Acad. Sci.* 1029, 44–57 (2004).

**Luton F, Vergés M, Vaerman J-P, Sudol M, Mostov KE.** The SRC Family Protein Tyrosine Kinase p62 yes Controls Polymeric IgA Transcytosis In Vivo. *Mol Cell*. 1999;4(4):627-632.

**M. C. Arrieta, L. Bistritz, and J. B. Meddings,** “Alterations in intestinal permeability,” *Gut*, vol. 55, no. 10, pp. 1512–1520, 2006.

**M. Camilleri, K. Madsen, R. Spiller, B. G. Van Meerveld, and G. N. Verne,** “Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease,” *Neurogastroenterology and Motility*, vol. 24, no.6, pp. 503–512, 2012.

**M. D. Halpern and P. W. Denning,** “The role of intestinal epithelial barrier function in the development of NEC,” *Tissue Barriers*, vol. 3, no. 1-2, article e1000707, 2015.

**Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A.** Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunology*. 2013;6(4):666-677.

**Mach J, Hsieh T, Hsieh D, Grubbs N, Chervonsky A.** Development of intestinal M cells. *Immunological Reviews*. 2005;206(1):177-189.

**Man AL, Prieto-Garcia ME, Nicoletti C.** Improving M cell mediated transport across mucosal barriers: do certain bacteria hold the keys? *Immunology*. 2004;113:15–22.

**Manocha, M. et al.** Enhanced mucosal and systemic immune responses with intranasal immunization of mice with HIV peptides entrapped in PLG microparticles in combination with *Ulex Europaeus*-I lectin as M cell target. *Vaccine* 23, 5599–5617 (2005).

**Mantis NJ, Cheung MC, Chintalacharuvu KR, Rey J, Corthésy B, Neutra MR.** Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor. *J Immunol.* 2002;169(4):1844-1851.

**Mao C, Ray-Gallet D, Tavitian A, Moreau-Gachelin F.** Differential phosphorylations of Spi-B and Spi-1 transcription factors. *Oncogene.* 1996;12(4):863-873.

**Matsuo, T., Nishizuka, S. S., Ishida, K., Iwaya, T., Ikeda, M., Wakabayashi, G.** (2011). Analysis of the anti-tumor effect of cetuximab using protein kinetics and mouse xenograft models. *BMC research notes*, 4(1), 140.

**McDole JR, Wheeler LW, McDonald KG, et al.** Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature.* 2012;483(7389):345-349.

**McSorley SJ, Kaisho T, Williams IR, Ohno H** (2012) The Ets factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold cells. *Nat Immunol* 13:729–736

**Mestecky J.** The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol.* 1987;7:265–276.

**Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S. & Papaioannou, V.E.** RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869–877 (1992).

**Mutoh M, Kimura S, Takahashi-Iwanaga H, Hisamoto M, Iwanaga T, Iida J.** RANKL regulates differentiation of microfold cells in mouse nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT). *Cell Tissue Res.* 2016;364(1):175-184.

**N. de Diego-Cabero, A. Mereu, D. Menoyo, J. J. Holst, and I. R. Ipharraguerre,** “Bile acid mediated effects on gut integrity and performance of early-weaned piglets,” *BMC Veterinary Research*, vol. 11, no. 1, article 111, 2015.

**N. E. Avissar, H. T. Wang, J.-N. H. Miller, P. Iannoli, and H. C.Sax,** “Epidermal growth factor receptor is increased in rabbit intestinal brush border membrane after small bowel resection,” *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 45, no. 6, pp. 1145–1152, 2000.

**Nagashima K, Sawa S, Nitta T, et al.** Identification of subepithelial mesenchymal cells that induce IgA and diversify gut microbiota. *Nat Immunol.* 2017;18(6):675-682.

**Nagashima K, Sawa S, Nitta T, et al.** Targeted deletion of RANKL in M cell inducer cells by the Col6a1-Cre driver. *Biochem Biophys Res Commun.* September 2017.

**Nakato G, Fukuda S, Hase K, Goitsuka R, Cooper MD, Ohno H.** New Approach for M-Cell-Specific Molecules Screening by Comprehensive Transcriptome Analysis. *DNA Res.* 2009;16(4):227-235.

**Nakato G, Hase K, Suzuki M, et al.** Cutting Edge: Brucella abortus Exploits a Cellular Prion Protein on Intestinal M Cells as an Invasive Receptor. *J Immunol.* 2012;189(4):1540-1544.

**Neutra MR, Frey A, Kraehenbuhl JP.** Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell.* 1996.

**Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl J-P.** Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol.* 2001;2(11):1004-1009.

**Neutra, M.R., Mantis, N.J. & Kraehenbuhl, J.P.** Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* 2,1004–1009 (2001).

**Niedergang F, Kraehenbuhl JP.** 2000. Much ado about M cells. *Trends Cell Biol.* **10**:137–141.

**Niedergang F, Kraehenbuhl JP.** Much ado about M cells. *Trends Cell Biol.* 2000;10(4):137-141.

**Niess JH, Brand S, Gu X, et al.** CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science.* 2005;307(5707):254-258.

**Nochi, T. et al.** A novel M cell-specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine effectively induces antigen-specific immune responses. *J. Exp. Med.* 204, 2789–2796 (2007).

**Ohno H, Hase K.** 2010. Glycoprotein 2 (GP2): grabbing the FimH bacteria into M cells for mucosal immunity. *Gut Microbes* **1**:407– 410.

**Ohno H, Kanaya T, Williams IR.** M cell differentiation: distinct lineage or phenotypic transition? Salmonella provides answers. *Cell Host & Microbe.* 2012;12(5):607-609.

**Ohno H.** Intestinal M cells. *J Biochem.* 2016;159(2):151-160.

**Owen RL, Jones AL.** Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology.* 1974;66(2):189-203.

**Owen RL, Jones AL.** Epithelial Cell Specialization within Human Peyer's Patches: An Ultrastructural Study of Intestinal Lymphoid Follicles. *Gastroenterology*. 1974;66(2):189-203.

**Owen RL.** Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches— a personal and historical perspective. *Semin Immunol*. 1999;11(3):157-163.

**P. Arda-Pirincci and S. Bolkent,** “The role of epidermal growth factor in prevention of oxidative injury and apoptosis induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats,” *Acta Histochemica*, vol. 116, no. 1, pp. 167–175, 2014.

**P. B. Alexander, L. Yuan, P. Yang et al.,** “EGF promotes mammalian cell growth by suppressing cellular senescence,” *Cell Research*, vol. 25, no. 1, pp. 135–138, 2015.

**P. Kang, D. Toms, Y. Yin et al.,** “Epidermal growth factor expressing *Lactococcus lactis* enhances intestinal development of early-weaned pigs,” *The Journal of Nutrition*, vol. 140, no. 4, pp. 806–811, 2010.

**P. Sheth, A. Seth, M. Thangavel, S. Basuroy, and R. K. Rao,** “Epidermal growth factor prevents acetaldehyde-induced paracellular permeability in Caco-2 cell monolayer,” *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, vol. 28, no. 5, pp. 797–804, 2004.

**Pappo J, Ermak TH.** Uptake and translocation of fluorescent latex particles by rabbit Peyer's patch follicle epithelium: a quantitative model for M cell uptake. *Clin Exp Immunol*. 1989;76(1):144-148.

**Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, Di Bartolomeo M, Borgonovo K, Maggi C, et al.** Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *Eur J Cancer* (Oxford, England : 1990). 2015;51(5):587–946.

**Q. C. K. Cheung, Z. Yuan, P.W. Dyce, DeWu, K. Delange, and J. Li,** “Generation of epidermal growth factor-expressing *Lactococcus lactis* and its enhancement on intestinal development and growth of early-weaned mice,” *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 89, no. 3, pp. 871–879, 2009.

**R. K. Rao and G. Samak**, “Role of glutamine in protection of intestinal epithelial tight junctions,” *Journal of Epithelial Biology and Pharmacology*, vol. 5, supplement 1, pp. 47–54, 2012.

**R. R. Nair, B. B. Warner, and B. W. Warner**, “Role of Epidermal growth factor and other growth factors in the prevention of necrotizing enterocolitis,” *Seminars in Perinatology*, vol. 32, no.2, pp. 107–113, 2008.

**Ramakrishnan SK, Zhang H, Ma X, et al.** Intestinal non-canonical NFκB signaling shapes the local and systemic immune response. *Nature Communications*. 2019;10(1):660. doi:10.1038/s41467-019-08581-8.

**Rampoldi, L., Scolari, F., Amoroso, A., Ghiggeri, G. and Devuyst, O.** 2011. The rediscovery of uromodulin (Tamm-Horsfall protein): from tubulointerstitial nephropathy to chronic kidney disease. *Kidney Int.* 80:338.

**Rios D, Wood MB, Li J, Chassaing B, Gewirtz AT, Williams IR.** Antigen sampling by intestinal M cells is the principal pathway initiating mucosal IgA production to commensal enteric bacteria. *Mucosal Immunology*. November 2015.

**Roggenbuck D, Hausdorf G, Martinez-Gamboa L, et al.** Identification of GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, as the autoantigen of pancreatic antibodies in Crohn's disease. *Gut*. 2009;58(12):1620-1628.

**Rowland A, Dias MM, Wiese MD, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS, et al.** Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015;112(12):1888–94.

**Ruffer A.** Memoirs: On the Phagocytes of the Alimentary Canal. *Quarterly Journal of Microscopical Science*. 1890;s2-30:481-505.

**Rumbo M, Sierro F, Debard N, Kraehenbuhl J-P, Finke D.** Lymphotoxin beta receptor signaling induces the chemokine CCL20 in intestinal epithelium. *Gastroenterology*. 2004;127(1):213-223.

**S. Basuroy, A. Seth, B. Elias, A. P. Naren, and R. Rao**, “MAPK interacts with occludin and mediates EGF-induced prevention of tight junction disruption by hydrogen peroxide,” *Biochemical Journal*, vol. 393, no. 1, pp. 69–77, 2006.

**S. Cohen**, “Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 237, pp. 1555–1562, 1962.

**S. Kaur, C. Vaishnavi, P. Ray, M. Singh, and R. Kochhar**, “Preliminary investigation on the effect of lactobacillus and epidermal growth factor on tight junction proteins in experimental *Clostridium difficile* infection,” *Advances in Microbiology*, vol. 4, no. 8, pp. 425–435, 2014.

**S. N. Elliott, J. L. Wallace, W. McKnight et al.**, “Bacterial colonization and healing of gastric ulcers: the effects of epidermal growth factor,” *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 278, no. 1, pp. G105–G112, 2000.

**S. R. Guntaka, G. Samak, A. Seth, N. F. LaRusso, and R. Rao**, “Epidermal growth factor protects the apical junctional complexes from hydrogen peroxide in bile duct epithelium,” *Laboratory Investigation*, vol. 91, no. 9, pp. 1396–1409, 2011.

**S. Wang, L. Zhou, H. Chen et al.**, “Analysis of the biological activities of *Saccharomyces cerevisiae* expressing intracellular EGF, extracellular EGF, and tagged EGF in early-weaned rats,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 99, no. 5, pp. 2179–2189, 2015.

**S. Wang, C. Guo, L. Zhou et al.**, “Comparison of the biological activities of *Saccharomyces cerevisiae*-expressed intracellular EGF, extracellular EGF, and tagged EGF in early-weaned pigs,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 99, no. 17, pp. 7125–7135, 2015.

**Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, et al.** Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood*. 2012;120(24):4733-4743.

**Sato S, Kaneto S, Shibata N, et al.** Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells. *Mucosal Immunology*. 2012;6(4):838-846. doi:10.1038/mi.2012.122.

**Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al.** Single Lgr5 stem cells build crypt–villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 2009;459(7244):262-265.

**Sato, S., Kaneto, S., Shibata, N. et al.** 2013. Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells. *Mucosal Immunol.* 6:838.

**Sato, T. et al.** Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265 (2009).

**Savage, C. R., Jr., Hash, J. H., and Cohen, S.** (1973) *J. Biol. Chem.* 247, 7612-7672

**Savage, C. R., Jr., Inagami, T., and Cohen, S.** (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 7612-7672

**Savidge TC, Smith MW, James PS, Aldred P.** Salmonella-induced M-cell formation in germ-free mouse Peyer's patch tissue. *Am J Pathol.* 1991;139(1):177-184.

**Schotte, R., Nagasawa, M., Weijer, K., Spits, H. & Blom, B.** The ETS transcription factor Spi-B is required for human plasmacytoid dendritic cell development. *J. Exp. Med.* 200, 1503–1509 (2004).

**Schulz O, Pabst O.** Antigen sampling in the small intestine. *Trends in Immunology.* 2013;34(4):155-161.

**Sender R, Fuchs S, Milo R.** Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 2016;14(8).

**Spanò S, Galán JE.** A Rab32-dependent pathway contributes to *Salmonella typhi* host restriction. *Science.* 2012;338(6109):960-963.

**Stenmark H.** Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(8):513-525.

**Su GH, Chen HM, Muthusamy N, et al.** Defective B cell receptor-mediated responses in mice lacking

**Su T, Bryant DM, Luton F, et al.** A kinase cascade leading to Rab11-FIP5 controls transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor. *Nat Cell Biol.* 2010;12(12):1143-1153.

**Su, G.H. et al.** Defective B cell receptor-mediated responses in mice lacking the Ets protein, Spi-B. *EMBO J* 16, 7118–7129 (1997).

**Sun S-C.** The noncanonical NF- $\kappa$ B pathway. *Immunological Reviews.* 2012;246(1):125-140.

**Suzuki K, Kawamoto S, Maruya M, Fagarasan S.** GALT: organization and dynamics leading to IgA synthesis. *Adv Immunol.* 2010;107:153-185.

**T. M. Brand, M. Iida, C. Li, and D. L. Wheeler,** “The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer,” *Discovery Medicine*, vol. 12, no. 66, pp. 419–432, 2011.

**T. Nojiri, T. Yoshizato, T. Fukami et al.,** “Clinical significance of amphiregulin and epidermal growth factor in colostrum,” *Archives of Gynecology and Obstetrics*, vol. 286, no. 3, pp. 643–647, 2012.

**T. Suzuki, A. Seth, and R. Rao,** “Role of phospholipase C $\gamma$ -induced activation of protein kinase C $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ) and PKC $\beta$ I in epidermal growth factor-mediated protection of tight junctions from acetaldehyde in Caco-2 cell monolayers,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, pp. 3574-3583, 2008.

**Tahoun A, Mahajan S, Paxton E, et al.** Salmonella Transforms Follicle-Associated Epithelial Cells into M Cells to Promote Intestinal Invasion. *Cell Host & Microbe.* 2012;12(5):645-656.

**Tahoun, A. et al.** Salmonella transforms follicle-associated epithelial cells into M cells to promote intestinal invasion. *Cell Host Microbe* 12, 645–666 (2012).

**Takahashi, Y. et al.** Nonhuman primate intestinal villous M-like cells: an effective poliovirus entry site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368,501–507 (2008).

**Taylor RT, Patel SR, Lin E, et al.** Lymphotoxin-Independent Expression of TNF-Related Activation-Induced Cytokine by Stromal Cells in Cryptopatches, Isolated Lymphoid Follicles, and Peyer’s Patches. *J Immunol.* 2007;178(9):5659-5667.

**Terahara K, et al.** 2008. Comprehensive gene expression profiling of Peyer’s patch M cells, villous M like cells, and intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 180:7840 –7846.

**Terahara K, Yoshida M, Igarashi O, et al.** Comprehensive gene expression profiling of Peyer's patch M cells, villous M-like cells, and intestinal epithelial cells. *J Immunol.* 2008;180(12):7840-7846.

**Terahara, K. et al.** Comprehensive gene expression profiling of Peyer’s patch M cells, villous M-like cells, and intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 180, 7840–7846 (2008).

**Terahara, K. et al.** Distinct fucosylation of M cells and epithelial cells by Fut1 and Fut2, respectively, in response to intestinal environmental stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404, 822–828(2011).

**V. Garc'ia-Hern'andez, C. Flores-Maldonado, R. Rincon-Heredia et al.,** “EGF regulates claudin-2 and -4 expression through Src and STAT3 in MDCK cells,” *Journal of Cellular Physiology*, vol. 230, no. 1, pp. 105–115, 2015.

**Van IJzendoorn SCD, Tuvim MJ, Weimbs T, Dickey BF, Mostov KE.** Direct interaction between Rab3b and the polymeric immunoglobulin receptor controls ligand-stimulated transcytosis in epithelial cells. *Dev Cell.* 2002;2(2):219-228.

**Verbrugghe P, et al.** 2006. Murine M cells express annexin V specifically. *J. Pathol.* 209:240–249.

**Verbrugghe P, Waelput W, Dieriks B, Waeytens A, Vandesompele J, Cuvelier CA.** Murine M cells express annexin V specifically. *J Pathol.* 2006;209(2):240-249.

**Vincenzi B, Schiavon G, Silletta M, Santini D, Tonini G.** The biological properties of cetuximab. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008;68(2):93–106.

**W. Jeong, J. Kim, F. W. Bazer, and G. Song,** “Epidermal growth factor stimulates proliferation and migration of porcine trophectoderm cells through protooncogenic protein kinase 1 and extracellular-signal-regulated kinases 1/2 mitogen-activated protein kinase signal transduction cascades during early pregnancy,” *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 381, no. 1-2, pp. 302–311, 2013.

**Wang, J., Gusti, V., Saraswati, A. & Lo, D.D.** Convergent and divergent development among M cell lineages in mouse mucosal epithelium. *J. Immunol.* 187, 5277–5285 (2011).

**Watarai M, Kim S, Erdenebaatar J, et al.** Cellular prion protein promotes *Brucella* infection into macrophages. *Journal of Experimental Medicine.* 2003;198(1):5-17.

**Wood MB, Rios D, Williams IR.** TNF- $\alpha$  Augments RANKL-Dependent Intestinal M Cell Differentiation in Enteroid Cultures. *American Journal of Physiology - Cell Physiology.* July 2016:ajpcell.00108.2016.

**Wu, Y. et al.** Mcell-targeted DNA vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 9318–9323 (2001). Sasaki, I. et al. Spi-B is crucial for plasmacytoid dendritic cell function and development. *Blood* 120, 4733–4743 (2012).

**Xu, D. Wang, P. Zhang et al.,** “Oral administration of *Lactococcus lactis*-expressed recombinant porcine epidermal growth factor stimulates the development and promotes the health of small intestines in early-weaned piglets,” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 119, no. 1, pp. 225–235, 2015.

**Y. Geng, J. Li, F.Wang et al.,** “Epidermal growth factor promotes proliferation and improves restoration after intestinal ischemiareperfusion injury in rats,” *Inflammation*, vol. 36, no. 3, pp. 670– 679, 2013.

**Y.-B. Yu and Y.-Q. Li,** “Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier,” *World Journal of Gastroenterology*, vol. 20, no. 32, pp. 11273–11280, 2014.

**Y.-L.Chen, H.-C. Peng, Y.-C.Hsieh, and S.-C. Yang,** “Epidermal growth factor improved alcohol-induced inflammation in rats,” *Alcohol*, vol. 48, no. 7, pp. 701–706, 2014.

**Yanagihara S, Kanaya T, Fukuda S, et al.** Uromodulin-SlpA binding dictates *Lactobacillus acidophilus* uptake by intestinal epithelial M cells. *Int Immunol.* 2017;29(8):357-363.

**Yu S, Lowe AW.** The pancreatic zymogen granule membrane protein, GP2, binds Accepted Article This article is protected by copyright. All rights reserved.*Escherichia coli* type 1 Fimbriae. *BMC Gastroenterology* 2010 10:1. 2009;9(1):1-7.

**Yu, S., Michie, S.A. & Lowe, A.W.** Absence of the major zymogen granule membrane protein, GP2, does not affect pancreatic morphology or secretion. *J. Biol. Chem.* 279, 50274–50279 (2004).

**Zhao X, Sato A, Cruz Dela CS, et al.** CCL9 is secreted by the follicle-associated epithelium and recruits dome region Peyer's patch CD11b+ dendritic cells. *J Immunol.* 2003;171(6):2797-2803.

**Zhao, X. et al.** CCL9 is secreted by the follicle-associated epithelium and recruits dome region Peyer's patch CD11b $\delta$  dendritic cells. *J. Immunol.* 171, 2797–2803 (2003).

## ETİK KURUL KARARI



T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK  
KURULU  
(ADÜ-HADYЕК)



Aydın 23.Mart. 2018

**Oturum** : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2018 Yılı III. Oturum  
**Sayı** : 64583101/2018/046  
**Proje Başlığı** : Farelerde embriyolojik gelişim sürecinde EGF (epidermal büyüme faktörü) ve Anti-EGF'nin microfold(M) hücreleri üzerindeki etkisi  
**Proje Yürütücüsü** : Kemal ERGİN  
**Proje Ekibi** : Bahadır KAYHAN

**Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:**

İnsan embriyosu ve fötüsü kullanılması  
İnsan embriyosu ve fötüsü dokularının kullanılması  
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması

**Hayvan Çalışması** İnsanlarda araştırma  
İnsan olmayan primatların kullanılması  
Transgenik hayvanların kullanılması  
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

**Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.**

Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN  
Başkan

Prof. Dr. Turhan DOST  
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. İsmail SÖNMEZ  
Üye

Prof. Dr. Deniz ÇOBAN  
Üye

Prof. Dr. Yücel KOCA  
Üye

Doç. Dr. Evrim DERELİ FİDAN  
Üye

Vet. Hek. Dr. Serdar AKTAŞ  
Üye

Vet. Hek. Dr. Birgül ÜNAL  
Üye

(Toplantıya Katılmadı)  
Yurdagül ALTINBAŞ  
Üye

