

**TÜMORAL PANKREAS DOKULARINDA EPIDERMAL GROWTH FAKTOR
RESEPTÖRLERİNİN (EGF-R) DAGILIMININ IMMUNOHISTOKİMYASAL
OLARAK BELİRLENMESİ**

**IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF THE EPIDERMAL GROWTH
FACTOR RECEPTOR IN CANCER TISSUES OF PANCREAS**

GÜLÇİN ABBAN* , MÜFİDE GÖRGÜN, DENİZ ERDOĞAN****

Yazisma Adresi:

Gülçin Abban

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Kinikli/ DENİZLİ

Tlf: 0-258-2132945

e-mail: gabban@pamukkale.edu.tr

* Öğr.Gör. Gülçin Abban : Pamukkale Üniv. Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji A.D

** Prof.Dr. Müfide Görgün: Gazi Üniv.Tıp.Fak. Histoloji ve Embriyoloj A.D.

** Prof.Dr. Deniz Erdoğan : Gazi Üniv.Tıp.Fak. Histoloji ve Embriyoloj A.D.

**TÜMORAL PANKREAS DOKULARINDA EPIDERMAL GROWTH FAKTOR
RESEPTÖRLERİNİN (EGF-R) DAGILIMININ IMMUNOHISTOKİMYASAL
OLARAK BELİRLENMESİ**

ÖZET

Epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor) polipeptit yapısında olup hücre yüzeyinde bulunur. EGF, EGF reseptörlerine bağlanarak hücreyel olayları düzenler.

Bu çalışmada insan tümoral pankreas dokularında EGF reseptörlerinin dağılımını immunohistokimyasal yöntemlerle ışık mikroskobu düzeyinde incelendi.

Tümoral pankreas dokuları, ampulla Vateri' de gelişip pankreasa invazyon gösteren adenokarsinomlar olmak üzere 2 farklı tipte incelendi. Primer adenokarsinomlu pankreas dokularında asiner hücrelerde, kanal boyanma zayıftı. Ampulla Vateri' de gelişip pankreasa invazyon gösteren adenokarsinomlarda asiner hücreler, kanal hücreleri ve Langerhans adacığı pozitif boyanma gösterdi.

Mitotik aktivitenin artmasına bağlı olarak EGF reseptörleri tümoral dokularda belirgin olarak saptandı.

Anahtar kelimeler: epidermal growth faktör reseptör, pankreas, immunohistokimya

SUMMARY

Epidermal growth factor is a mitogenic polypeptide that binds to the EGF receptors and regulates a variety of cellular processes.

We examined the distribution of epidermal growth factor receptors in adult pancreas, newborn pancreas and in human pancreatic tumors.

Two types of pancreatic tumors were included in this study: Primary adenocarcinoma of pancreas and a metastatic adenocarcinoma of pancreas, derived from Ampulla Vateri.

EGF R immunostaining of acini and pancreatic ducts were stronger and well recognized when compared to weaker immunostaining of islets.

In invasive adenocarcinomas of pancreas derived from ampulla Vateri, EGF receptors showed strong immunostaining patterns in acini pancreatic ducts and Langerhans cells

Epidermal growth factor receptors predominantly observed in tumoral tissues. Because of the increased mitogenic activity in tumoral tissues EGF receptor densities are increased, thus making stronger immunostaining.

Key words: epidermal growth factor receptor, pancreas, immunohistochemistry

GIRIS

S.Cohen Sinir Büyüme Faktörü (Nerve Growth Faktörü, NGF) izole etmek üzere çalışmalar yaparken, bezlerden hazırladığı ekstrenin NGF'den farklı etkide bulunduğunu gözlemiştir. Bunu yenidoğan farelere her gün enjekte ettiğinde göz kapaklarının erken açıldığını, dişlerin erken patladığını saptamıştır. Daha sonraki çalışmalarında bu etken maddeyi izole etmiş ve bunun epidermin gelişimini hızlandırdığını saptamıştır. Bu etken maddeye epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Faktör , EGF) adını vermiştir (1,2).

EGF 53 aminoasitli olup alanin, fenilalanin ve lizin dışında tüm aminoasitleri bünyesinde bulundurur. Molekül ağırlığı 6040 daltondur. Epidermal ve mezotelyal hücrelerde mitojenik özelliğe sahiptir. İdrarda, mide ve pankreas sıvısında seminal sıvıda, prostat sıvısı, süt ve kanda bulunmaktadır. Aynı zamanda çok çeşitli dokularda varlığı saptanmıştır.

EGF hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanarak işlev yapar (3,4).

Bu reseptörler kan hücreleri dışında çok geniş hücre ve dokularda tanımlanmıştır. Yüksek bağlama kapasiteli reseptörler fibroblastlarda, kornea ve lenste, ince bağırsak epitelinde, glia hücrelerinde gösterilmiştir (5-7).

EGF reseptörünün molekül ağırlığı 170.000 daltondur. Reseptörde bulunan tirozin özgün protein kinaz aktivitesi gösterir. Tirozin kinazlar ilk tirozinin fosforilasyonu mitojenler tarafından başlatılan ilk intrasellüler sinyaldir (6,8,9,10).

Hücre dışında EGF, reseptörü ile bir hücre dışında EGF, reseptörü ile birleşmektedir. EGF, reseptörün sitoplazmik bölümündeki tirozin kinazı aktive etmektedir (5,6,11).

Büyüme faktörlerinin hücre çoğalmasında ve farklılaşmasında önemli rol oynadıkları pek çok çalışmada belirtilmiştir. Normal dokularda çoğalma ve farklılaşma, çok yönlü olarak büyüme faktörlerinin kontrolü altındadır. Son yıllarda araştırmalarda yara iyileşmesinde ve karsinogenezde de büyüme faktörlerinin etkili oldukları gösterilmiştir. Bununla birlikte bazen işlem kontrolünden çıkmakta ve sonuçta tümör dokuları oluşmaktadır (12-14).

Bu çalışmada, EGF reseptörlerinin pankreas tümörlerinde tanımlanmasının ve bu dokulardaki dağılımlarının tam olarak belirlenmesinin önemli olacağı düşünüldü. Bunun için tümoral pankreas dokularında EGF reseptörlerinin dağılımları immünohistokimyasal yöntemlerle saptanmaya çalışıldı. Elde edilen sonuçlar ışık mikroskopunda incelenip değerlendirildi.

GEREÇ ve YÖNTEM:

Pankreas tümörlerinde epidermal growth faktör reseptörlerinin dağılımını tanımlamak amacıyla Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalından sağlanan biyopsi materyallerine indirekt (iki aşamalı) immün boyama yöntemi uygulandı (15).

Dokuların Elde Edilmesi:

Patoloji Laboratuvarında tümör tanısı konulan biyopsi örneklerinden alındı.

Immünohistokimyasal Yöntem:

Pankreas dokuları nötral formalinle tesbit edildi. Dokulara alisilagelmis ışık mikroskop takip yöntemi uygulandı ve dokular parafine gömüldüler. Daha sonra 4,5mm kalınlığında kesitler önceden polilizinle kaplanmış lamlara alındı.

Immün boyamada kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada EGF reseptörlerini immünohistokimyasal olarak belirleyebilmek için Oncogene Research Production EGF reseptör kit kullanıldı. (Cat HCS16, Lot , DO1460)

- Primer antikor (AB-4 Polyclonal Rabbit IgG, Cat = PC19, Lot#799501- 1 Oncogene Research Primer antikor) PBS içinde dilue edildi.Sulandırma 1:40 (Khadija Hornietal 1994)
- Bloking Serum (Normal Tavşan IgG, Lot=962207, Cat=N101) 1ml. PBS içine 1 damla bloking serum eklenmesiyle elde edildi.

■ Biotinlenmiş sekonder antikor (Anti Tavşan Total 1g, Lot = A 1566). 1ml PBS içine 1 damla biyotinlenmiş sekonder antikor eklenerek hazırlandı.

■ ABC solüsyonu

A (Lot = A 1565) 1 damla A solüsyonu 1ml PBS içine damlatıldı ve karıştırıldı aynı solüsyon içine 1 damla B solüsyonu (Lot= A 1563) damlatıldı ve karıştırıldı.

■ Sponin: (Lot= 960815) Distile su ile 1:40 oranında dilüe edildi.

■ DAB: (Lot = A 1553) 1 tablet DAB 20 ml PBS/%0.3 H₂O₂ içinde çözüldü. Taze olarak kullanıldı.

Fosfat buffer solüsyon(PBS)=8gr NaCl, 0.24gr. 0.2g KCl, 1.44gr.

N₂HPO₄ KH₂PO₄ , 800ml distile suda çözüldü. PH'nin 7,4 olması için ortama HCL eklendi. Tekrar bir litre distile su eklenerek PBS solüsyonu elde edildi.

Boyama Yöntemi:

Kesitler, Ksilolde 3 kez 5'er dakika tutuldu.Sonra

■ %100 alkol'de 10 dakika

■ %95 alkol'de 10 dakika bekletildi.

■ Distile suda yıkandı.

■ %0.1 H₂O₂ de 30 dakika bekletildi.

■ Distile suda yıkandı.

■ Antijenik belirtilerin maskelenmemesi için saponin ile 30 dakika inkübe edildi.

■ Immünoglobulinlerin özgül olmayan bağlamalarını engellemek için bloking serumda 20 dakika bekletildi.

■ PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı.

■ Primer antikor ile +4 de 1 gece süresince inkübe edildi.

■ PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı.

■ Sekonder antikor ile 30 dakika inkübe edildi.

- PBS ile 3kez 5'er dakika yikandi.
- ABC solusyonu ile 30 dakika inkübe edildi.
- 3 kez PBS ile yikandi.
- DAB solüsyonu ile 1-3 dakika arasında inkübe edildi.
- Distile su ile yikandi.
- Zit boyama için hematoxilen (Harris) ile 2 dakika boyandı.
- Distile su ile yikandi.
- %95 alkolde 2kez 10'ar dakika bekletildi.
- %100 alkolde 2 kez 10'ar dakika kaldı.
- Ksilol'den 2 kez 10'ar dakika geçirildi.
- Yapıştırıcı solüsyonla kesitler lamelle kapatılıp ışık mikroskopunda incelendi ve resimleri çekildi.

Boyanmanın değerlendirilebilmesinde aşagidaki skala kullanıldı

(-) : Boyanma yok

(/+/-): Çok zayıf boyanma

+

 : Zayıf boyanma

++

 : Orta boyanma

+++

 : Kuvvetli boyanma

BULGULAR

Tümoral pankreas dokulari, ampulla Vateri'de gelisip pankreasa invazyon gösteren adenokarsinomlarla, primer pankreas kökenli adenokarsinomlar olmak üzere 2 farklı tipte incelendi.

Primer adenokarsinomlu pankreas dokularında, asinar hücrelerde oldukça kuvvetli pozitif boyanma saptandı (Resim 1,3). Bu grupta boyanma, apikal ya da bazal şekilde belirginlik göstermeyip tüm hücre sitoplazmasında yaygınlaşmıştı (Resim 2,3). Bazal hücre zarında yoğun pozitif boyanma dikkati çekti (Resim 2,3). Sentroasinar hücrelerde de koyu boyanma belirgindi.

Langerhans adacık hücrelerinin zayıf boyanma göstermesi oldukça ilgi çekiciydi. (Resim 3). Kanallar pozitif boyanma gösterdi (Resim 4). Yağ hücre zarında da pozitif reaksiyon belirgindi (Resim 2).

Ampulla vateride gelisip, pankreasa invazyon gösteren adenokarsinomlarda da asinar hücrelerin bazal hücre zarlarının kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdiği saptandı (Resim 5,7). Bu grupta hücreler normal görünümünü kaybetmişti (Resim 5,7). Intralobüler kanallar ve Langerhans adacığı belirgin olarak ayırd edilemiyordu (Resim 5,6). Daha büyük büyütme resimleri de, boyanma yaygın şekilde tüm asinar hücre sitoplazmasında izlenmekle birlikte, bazal hücre zarlarının diğer gruplardakilere göre daha kuvvetli reaksiyon gösterdiği ilgiyi çekti (Resim 6,7). Bu grupta da sentroasinar hücrelerde pozitif boyanma saptandı (Resim 7). Langerhans adacığı asinar hücrelerin arasına yayılmış şekildeydi. (Resim 6). Bu grupta da interlobüler kanal ve çevre bağ dokusu pozitif immün boyanma gösteriyordu (Resim 8).

Tablo-I- Tümöral pankreas dokusunda mikrofotografik alanlara özgü farklı bölgelerde EGF reseptörlerinin tanımlanması

	Primer Adenokarsinom	Invazyon tip Adenokarsinom
Asinar hücre	+++	+++
Asinar apikal sitoplazması	+++	+++
Asinar hücre apikal zari	+++	+++
Asinar hücre bazal sitoplazması	+++	+++
Asiner hücre bazal zari	+++***	+++***
Sentroasinar hücre	++	++
Intralobüler salgi Kanali	+++	+++
Interlobüler salgi Kanali	+++	+++
Bag dokusu	+++	+++
Yag dokusu	+++***	+++***
Langerhans adacigi kenar bölge hücreleri	+/-	+
Langerhans adacigi orta bölge hücreleri	+/-	+
Sinuzoit duvari	+++	+++
Septalar	+++	+++

*Boyanma daha yoğun

TARTISMA

Epidermal Growth Faktör Reseptörleri 170kD molekül ağırlığında ve fosfoglikoprotein yapısında olup hücre yüzeyinde bulunurlar (1,2). EGF, EGF reseptörlerine bağlanarak mitojenik olayları başlatır (16). Bu bağlanmaya karşı tirozin kinazın otofosforilasyonu gerçekleşir (17).

EGF + EGF reseptörleri hücre gelişiminin düzenlenmesinde ve farklanmasında önemli işlev görürler (18). EGF reseptörleri birçok hücrenin yüzeyinde tanımlanmış olmakla birlikte, bazı yayınlarda hücre içinde de yerleşik olabilecekleri bildirilmektedir (19).

Bu çalışmada EGF reseptörlerinin pankreas tümör hücrelerinde tanımlanmasının ve bu dokulardaki dağılımlarının tam olarak saptanmasının önemli olacağı düşünüldü.

Büyüme faktörlerinin pek çok hücrede çoğalmayı ve farklanmayı sağladığı ve ayrıca karsinogenezise neden olduğu bilinmektedir (20).

EGF reseptörleri de pek çok kanser dokusunda tesbit edilmiştir.

Soji Ozawa ve arkadaşları 1988 yılında EGF reseptörlerini immünohistokimyasal olarak özefagus, akciğer, pankreas, kolorektum, meme ve mide kanserlerinde incelemişlerdir. Çalışmada 33 özefagus , 10 kolorektal , 9 pankreas , 8 mide kanserli hastalardan dokular cerrahi olarak elde edilmiştir. İmmünohistokimyasal yöntemlerden avidin-biotin peroxidaz kompleks (ABC) tekniği uygulanmıştır. Bütün kanserli dokuların EGF reseptörleri bakımından oldukça iyi reaksiyon gösterdiği saptanmıştır. Pankreasda asinar, kanal ve adacık hücrelerinin oldukça yoğun boyandığı dikkati çekmiştir. Boyanmanın yaygın ve sitoplazmik granüler şekilde olduğu bildirilmiştir (21).

Bir diğer çalışmada TGF- α ve EGF reseptörleri eksokrin pankreas tümürlü hamsterlerde incelenmiştir. Çalışma büyüme faktörlerinin, özellikle TGF- α ve EGF'nin

kanserin olusmasinda ve gelismesinde etkin oldugu varsayimindan yola cikilarak planlanmistir. Hayvan modellerinde karsinogenesiz protein veya yag diyetiyle ya da koleosistokinin hormonunun verilmesiyle olusturulabilmektedir. Çalismada pankreatik karsinogenesiz, yag diyeti ve koleosistokinin analogu olan “*caerulein*” ile olusturulmustur. 105 tane syrian golden hamster türü kullanilmistir. 6-12 ay sonra deneye son verilerek cikarilan dokular immünohistokimyasal olarak incelenmislerdir. Tümoral dokularda ise TGF- α ve EGF reseptörleri oldukça yogun immün boyanma göstermistir. Boyanmanın özellikle sitoplazmada yaygin sekilde olmasi dikkati çekmistir. Langerhans adaciklarinin her iki reseptör için zayif reaksiyon gösterdigi bildirilmistir (22).

Bu çalismada, ampulla Vateri’de gelisip pankreasa invazyon gösteren adenokarsinomlarla, primer pankreas kökenli adenokarsinomlarda inceleme yapildi. Pankreasa invazyon göster adenokarsinomlarda, hücresel yapinin oldukça bozuldugu, adaciklarin normal yapisini kaybedip, ekzokrin son bölümler arasinda belirgin bir sinir göstermeden yayildigi saptandi. Son bölümlerde bazal hücre zarinda ve buna komşu sitoplazmada boyanma kuvvetliydi ancak tüm sitoplazmada granüler seklinde az yogun olarak görüldü. Kanallarda da pozitif boyanma dikkati çekti. Langerhans adaciklari da boyanmisti.

Primer pankreas kökenli adenokarsinomlarda da asinar hücrelerde ve kanallarda oldukça kuvvetli pozitif reaksiyon izlendi. Asinar hücrelerde bazal hücre zari daha kuvvetli boyanmakla birlikte sitoplazma tek düze sekilde pozitif reaksiyon vermisti. Langerhans adaciginda ise zayif pozitif boyanma belirlendi.

Bir grup arastirici, çeşitli hastanelerin hücre kültür laboratuvarlarında kültüre edilen pankreatik karsinoma hücrelerinde arastirma yapmislardir. Çalismada, kromozomal analizlerde G ve Q baglanma analiz yöntemi, cDNA hibridzasyonda ise Souther (23). yöntemi uygulanmistir. Çalismadan kanserli dokulardaki EGF reseptör miktarinin çok fazla oldugu sonucu çikmistir. Arastiricilar EGF reseptör miktarinin fazla olmasının

kanser dokularinin karakteristik özelliği olabileceğini bildirmisler. alısmada EGF reseptörlerinin kanserli dokulardaki anlamlı artisinin 7.kromozomun kısa kolunun translokasyonu ile ilgili olabileceği sonucuna varılmıstır (24).

Tümoral dokudaki boyanmanın oldukça yoğun olması, mitojenik aktivitenin bu dokularda fazla olmasına bağlanabilir kanisındayız.

EGF'nin hücre gelişmesini ve farklılaşmasını tetiklediği bilinmektedir. EGF, EGF reseptörlerine bağlanarak işlev yapmaktadır. Sonuç olarak, mitojenik aktivitenin fazla olduğu dönemlerde EGF reseptörlerinin miktarının artmasına kosut olarak kuvvetli pozitif boyanma göstermektedir.

RESİMLER

Resim 1: Primer pankreas kökenli adenokarsinomlu dokudan bir görünüm. Asiner hücreler; (A), Yağ hücreleri; (Yh).

(Immünperoksidaz, Hematoksilen, X100)

Resim 2: Aynı gruptan bir diğer görünüm. Pozitif boyanan asiner hücreler; (A), Bazal hücre zari; (kalin ok), Yağ hücreleri; (Yh) görülüyor.

(Immünperoksidaz, Hematoksilen, X200)

Resim 3: Aynı gruptan daha büyük büyültmede bir kesit. Asiner hücre; (A), Intralobüler kanal; (Ik), Langerhans adacığı;(L), Hücre zarları pozitif boyanan yağ hücreleri;(Yh).

(Immünperoksidaz, Hematoksilen, X400)

Resim 4: Aynı gruptan büyük büyültmede bir interlobüler kanal;(K), kanalı çevreleyen ve pozitif olarak tanımlanan bağ dokusu; (Bd).

(Immünperoksidaz, Hematoksilen, X400)

Resim 5: Ampulla Vateri'de gelişip pankreasa invazyon gösteren adenokarsinomdan bir görünüm. Normal şeklini kaybetmiş asiner ;(A).

(Immünperoksidaz, Hematoksilen, X200)

Resim 6: Aynı gruptan bir diğer görünüm. Pozitif boyanma gösteren asiner hücre; (A), daha koyu reaksiyon gösteren hücre bazali; (kalin ok), Langerhans adacığı; (L) .

(Immünperoksidaz, Hematoksilen, X400)

Resim 7: Aynı gruptan daha büyük büyültmede bir diğer görünüm. Pozitif boyanma gösteren asiner hücre; (A), daha koyu olarak boyanan hücre bazali; (kalin ok), Çekirdek; (Ç), Lümen ; (Lü), Sentroasiner hücre; (S).

Immünperoksidaz, Hematoksilen, X1000)

Resim 8: Aynı gruptan pozitif reaksiyon gösteren interlobüler kanal; (K), Kanali çevreleyen bağ dokusu; (Bd).

(İmmünperoksidaz, Hematoksilin, X1000)

KAYNAKLAR

1. Cohen S : Isolation of mouse submandibular gland protein elaborating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. J Biol Chem 237:1555-6, 1962.
2. Cohen S: Epidermal growth factor. Bioscience Rep 6:1017-28, 1986.
3. Breyer JA, Cohen S: The EGF precursor isolated from murine kidney membrane. J Biol Chem 265: 16564-70, 1990.
4. Cartilage SA, Elder JB: TGF α and EGF Levels in normal human gastric testinal mucosa. Br J Cancer 60:657-60, 1989.
5. Derynak R, Goeddel DV, Ullrich A: Synthesis of messenger RNAs for TGF- α and β and the EGF receptor by human tumors. Cancer Res 47: 707-12, 1987.
6. Savage CR, Ingani T, Cohen S: The primary structure of EGF. J Biol Chem 274 :7612-21, 1972.
7. Wright NA, Poulsem R, Stamp GW: EGF induces expression of regulatory peptides in damaged human gastrointestinal tissues. J Pathol 162: 279-84, 1996.
8. Carpenter G: Receptors for EGF and other polypeptide mitogens. Ann Rev Biochem 56:15: 881-914, 1987.
9. Hormi K, Lehy T: Developmental expression of TGF - α and EGF receptor protein in the human pancreas and digestive tract. Cell Tissue Res 278:130-50, 1994.

10. Jensen CH, Krogh TN : Protein structure of fetal Antigen 1 (FA1) A novel circulations human relation to the gene products at dlk and pG2. *Eur J Biochem* 225: 83-92, 1994.
11. Pratt RM : Role of EGF in embryonic development in current topics. *Developmental Biol* 22: 75, 1987.
12. Yamanaka Y, Friess H. : Coexpression of EGF receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness. *Anti -cancer Res* 13: 565-9, 1993.
13. Smith JJ, Derynck R, Korc M: Production of TGF- α in human pancreatic cancer cells. Evidence for a superagonist autocrine cycle. *Proc Natl Acad Sci* 84 : 7567-70, 1987.
14. Miettinen PJ, Heikinheimo K: TGF α and insulin gene expression in human fetal pancreas. *Development* 114:833-40, 1992.
15. John BD, Alan S: *Histological Technique*. 2nd. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1982.
16. Morquardt H, Hunkapiller MW, Hood LE: TGF type 1: Structure and relation of EGF. *Science* 223: 1079-82, 1984.
17. Gubits RM , Shaw PA, Gresik EW: EGF Gene expression is regulated differently in mouse kidney and submandibular gland. *Endocrinology* 119: 1382-5, 1986.
18. Oliver AM: Epidermal Growth factor receptor expression in human fetal tissues is age – dependent. *Brif Cancer* 58:461-3, 1988.
19. Domjonow I, Mildner B, Knowles BB: Immunohistokimyasal localization of the EGF receptor in normal human tissues. *Lab Inves* 55:588-93, 1986.
20. Menard D, Pothier P: Radioautographic localization of EGF receptors in human

- fetal gut. *Gastroenterology* 101:640-9, 1991.
21. Ozawa S, Ueda M, Ando M: EGF receptors in cancer tissues of esophagus, lung, pancreas, colorectum, breast and stomach. *Jpn J Cancer Res* 79:1201-7, 1988.
 22. Visser CJ, Woutersen RA, Bruggink AH: TGF- α and EGF expression in the exocrin pancreas of azaserin - treated rats. *Carcinogenesis* 16: 2075-82, 1995.
 23. Southern E: Epidermal growth factor. *J Mol Biol* 98:503, 1975.
 24. Korc M, Friess H, Yamanaka Y: Chronic pancreatitis is associated with increased concentrations of EGF receptor, TGF- α and phospholipase. *Gut* 35:1468-73, 1994.