

Horozlarda Üropigi Bezinde IGF-I Reseptörünün İmmunohistokimyasal Yerleşimi

Berrin ZİK*

Geliş Tarihi: 26.05.2004

Kabul Tarihi: 20.07.2005

Özet: Çalışmanın amacı, hücre gelişmesi ve farklılaşmasında önemli rol oynayan insülin benzeri büyüme faktör - I reseptörünün (IGF-IR), horozların üropigi bezindeki dağılımını belirlemek ve reseptörün hücre içindeki yerleşim yerinin belirlenmesi amacıyla planlanmıştır. Üropigi bezinden elde edilen parafin bloklara, indirekt Streptavidin-Biotin Peroksidaz immunohistokimyasal yöntemi uygulandı.

Çalışmada IGF-I reseptörünün üropigi bezinin bazal ve apikal bölgesindeki hücrelerde eksprese olduğu gözlemlendi. Özellikle bazal bölgede yer alan tubulusların bazal membran üzerine yerleşen hücrelerinde IGF-I reseptör ekspresyonu çok yoğun olarak belirlendi. IGF-I reseptör, üropigi epitel hücrelerinin sitoplazmasında, granül halinde gözlemlendi.

Sonuçlarımıza göre; üropigi bezinde çoğalma ve farklılaşma özelliğindeki hücrelerde IGF-IR ekspresyonunun çok yüksek olduğu, tamamen farklılaşmış hücrelerde ise bu reseptörün eksprese olmadığı sonucuna varılabilir.

Anahtar Kelimeler: Üropigi bezi, İnsülin benzeri büyüme faktör-I (IGF-I), İmmunohistokimya.

Immunohistochemical Localization of Insulin Like Growth Factor-I Receptors in the Uropygial Gland of Cockrell

Summary: The objective of the present study was to determine the distribution and intracellular localization of insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR), that plays a very important role in the differentiation and growth of the cells, in the uropygial gland of cockrell. We applied Labelled Streptavidin Biotin immunohistochemistry to paraffin sections to show the localization of IGF-IR.

IGF-I receptor was found in the cells of both basal region and apical region. Particularly, basal cells, which lie on the basement membrane of the tubules in the basal region, showed the strongest immunoreactivity to the IGF-I receptor antibody. In our study, IGF-I receptors showed a granular localization in the cytoplasm of uropygial epithelial cells.

Our results show that IGF-I receptors are widely expressed by epithelial cells with proliferative and undifferentiated and that these receptors may be largely down-regulated in highly differentiated epithelial cells.

Key Words: Uropygial gland, Insulin like growth factor-I (IGF-I), Immunohistochemistry.

Giriş

Yağ bezlerinin gelişimi bazal hücrelerin bölünmesi ve bu hücrelerin olgun yağ hücrelerine farklılaşmasıyla gerçekleşir. Hücrelerdeki çoğalma ve farklılaşmada büyüme faktörleri önemli rol oynar¹. İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-I ve IGF-II) fonksiyonel, metabolik, anabolik özel-

likleri ile insüline bağlı, polipeptid hormonlar ailesine aittir^{2,3} ve otokrin/ parakrin mekanizmalarla değişik dokular tarafından sentezlenir^{3,4}. IGF-I ve IGF-II yapısı ve biyolojik aktivitesiyle insüline benzerdir^{5,6}. IGF-I'in etkisi hormonun bağlandığı ekstrasellüler iki alfa subunit ve sitoplazmik bölgede tirozin kinaz aktivitesine sahip iki beta subunitten oluşan tetramerik

* U.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

transmembran glikoprotein reseptörleriyle sağlanır³. IGF-I reseptörü (IGF-IR) güçlü antiapoptotik sinyaller göndererek hücrelerin gelişmesini, hücrelerin transformasyonunu ve bazı hücre tiplerinde ise farklılaşmayı uyarmaktadır¹. Son yıllarda IGF-IR ile yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda, bu reseptörün hücre gelişmesi ve farklılaşmasında önemli rol oynadığı gözlenmiştir^{1,4,7-9}.

Kanatlılarda bulunan üropigi bezi başlıca yağ sentezleyen, çift loblu, holokrin bir bezdir¹⁰⁻¹³. Bağıdokudan bir kapsülle sarılı olan bezin, her bir lobu, lumen çevresinde radial bir şekilde dizilmiş çok katlı epitel ile kaplı pek çok tubulustan oluşur. Bu tubulusların alt yarısı yağ bölgesi, lumene bakan üst yarısı ise glikojen bölgesi olarak tanımlanır. Yağ bölgesindeki hücrelerde lipid sentezi, memeli hayvanların yağ bezlerinde olduğu gibidir ve lipid metabolizmasında aktif olan enzimler bol miktardadır¹⁴⁻¹⁶. Glikojen bölgesindeki hücrelerde glikojen ve asit fosfatazın bulunduğu bildirilmektedir¹⁰. Histolojik ve histokimyasal çalışmalarla üropigi bezinin memelilerdeki yağ bezlerine benzer bir fonksiyona sahip olduğu ve gonadal hormonların etkisi altında bulunduğu bildirilmiştir¹⁷. Ayrıca üropigi bezinin androjenite için iyi bir marker olabileceği¹⁸ ve üropigi bezinin yağ benzeri bezler üzerine androjenlerin etkisini incelerken bir model oluşturacağı ileri sürülmüştür^{17,19}. Kanatlılarda üropigi bezi yağ sekresyonu bakımından önemli bir organ olduğu için çalışmaların büyük bir çoğunluğu yağ bölgesindeki hücrelerin farklılaşması¹⁹⁻²² ve enzim aktiviteleri^{17,20,21} üzerine yoğunlaşmıştır. Birinci zon olarak adlandırılan yağ bölgesinin, bazalde proliferatif zon, ortada farklılaşma zonu ve iç kısımda lumeni çevreleyen holokrin zon olmak üzere üç bölgeye ayrıldığı bildirilmiştir¹⁷. Üropigi bezi üzerine yapılan çalışmaların çoğunluğunu histolojik ve histokimyasal çalışmalar oluşturmaktadır. Üropigi bezi devamlı olarak bölünen ve farklılaşma sürecindeki hücrelerden oluştuğu için, farklılaşmayı tetikleyen sinyallerin belirlenmesi ve farklılaşma süresince düzenlenen gen ekspresyon çalışmaları için de etkili bir modeldir. Yağ bezleri üzerine büyüme hormonları ve insülin benzeri büyüme faktörlerinin etkisini inceleyen²³⁻²⁸, ayrıca hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının çok görüldüğü derideki keratinositler üzerine büyüme faktörlerinin etkisini inceleyen in vitro çalışmalar bulunmaktadır^{9,29-31}. Fakat memelilerdeki yağ bezlerine benzer özellikte olan üropigi bezinde yapılan immunohistokimyasal çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmanın amacı,

hücre gelişmesi ve farklılaşmasında önemli rol oynayan insülin benzeri büyüme faktör - I reseptörünün (IGF-IR), hücre bölünmesinin ve farklılaşmasının fazla olduğu üropigi bezindeki dağılımını belirlemek ve reseptörün hücre içindeki yerleşim yerinin belirlenmesi amacıyla planlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırmada özel bir tavukçuluk işletmesinden alınan 10 adet 1 günlük yaşta Isobrown erkek civcivler kullanıldı. Civcivler 20 hafta süre ile UÜ Veteriner Fakültesi Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan araştırma kümeslerinde normal rasyonla beslenerek, barındırıldı.

Çalışmanın sonunda, hayvanların boyunları kesilip öldürüldükten hemen sonra üropigi bezleri çıkartıldı ve %10'luk formol-alkol solusyonunda tespit edildi. Daha sonra dokular rutin histoloji tekniğiyle yüzeye paralel olarak parafinde bloklandılar. Parafin bloklardan elde edilen 5-7 µm kalınlığındaki kesitlere indirekt Streptavidin-Biotin Peroksidaz immunohistokimyasal yöntem uygulandı³².

Immunohistokimyasal prosedür

İmmunohistokimyasal boyamada IGF-IR karboksil ucundaki bir peptid bölgesine karşı hazırlanmış poliklonal anti-IGF-IR primer antikor (Santa Cruz) kullanıldı.

IGF-IR'ün immunohistokimyasal olarak belirlenmesi için, standart Streptavidin Biotin Peroksidaz kompleks tekniği LSAB kit (Dako) kullanılarak yapıldı. Kesitler deparafinize edildikten sonra suyu giderildi ve proteoliz için 0.05 % Saponin solusyonunda 20dk. tutuldu. Endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için 10dk. distile su içinde hazırlanmış 3% H₂O₂ içinde inkübe edildi. Daha sonra kesitler 1 gece 4 °C de 1:1500 dilusyondaki primer poliklonal antikor anti-IGF-IR ile muamele edildi. Goat anti-rabbit sekonder antikor ile 20dk. 37C⁰ ve daha sonra enzim olarak streptavidin- horseradish peroxidase ile 37C⁰ de 30dk. inkübe edildi. Son olarak kromojen olarak 3,3'-diaminobenzidine (DAB) kullanıldı ve hematoksilin ile zıt boyama yapılarak preparatlar entellan yapıştırıcı ile kapatıldı. Negatif kontrol kesitlere primer antikor yerine PBS solusyonu uygulandı.

Tüm kesitler iki bağımsız gözlemci tarafından incelenerek aşağıdaki skorlamaya göre değerlendirilmeler yapıldı.

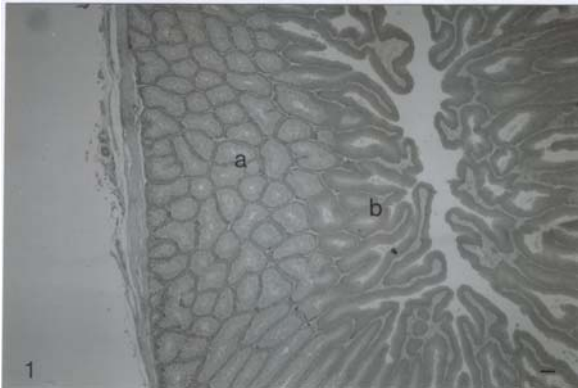
Boyanmama = -, Çok zayıf boyanma = +/-, Zayıf boyanma = +,

Orta derecede boyanma = ++, Kuvvetli boyanma = +++,

İmmunohistokimyasal skorlama tabloda gösterilmiştir.

Bulgular

Üropigi bezinin bağ dokusundan bir kapsül ile sarılı olduğu ve lumene doğru uzanan pek çok tubulustan meydana geldiği gözlemlendi. IGF-IR boyanma yoğunluğu bakımından tubulusların, bazal ve apikal olmak üzere iki bölgeden oluştuğu, apikal bölgedeki hücrelerin yoğunluğu orta şiddette IGF-IR boyanması gösterirken, bazal bölgede yer alan hücrelerin yoğunluğu zayıf şiddette IGF-IR boyanması gösterdi (Şekil 1).



Şekil 1:

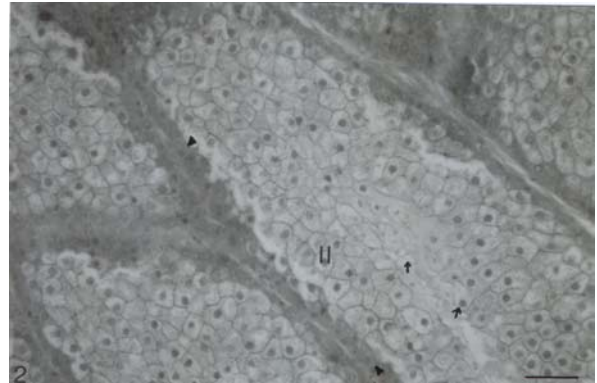
Üropigi bezinde IGF-IR yerleşimi. a: Bazal kısım
b: Apikal kısım Bar 50µm

Fig. 1:

The localization of IGF-IR in the uropygial gland. a. Basal region b. Apical region. Bar 50µm.

Üropigi bezinin bazal bölgesinde yer alan tubullerde farklı boyanma yoğunluğundaki hücreler gözlemlendi. Bazal bölgede bulunan ve tubullerin birinci katmanını oluşturan, bazal membran üzerine yerleşmiş tek sıralı yassı hücrelerde IGF-IR boyanmasının çok yoğun olduğu, II. katmanda tubulün lumenine doğru yer alan 3-4 sıra halinde yerleşmiş yuvarlak çekirdekli poligonal hücrelerde reaksiyonun daha zayıf, lumene bakan birkaç

piknotik çekirdekli poligonal hücrelerde ise boyanmanın olmadığı gözlemlendi (Şekil 2, tablo). Tubulün apikal yarımında, bazal membran üzerine yerleşen yassı hücrelerde ve bunun üzerinde yer alan poligonal şekilli 2-3 sıra halinde yerleşmiş hücrelerde IGF-IR yoğunluğu orta şiddette olup, lumene bakan ve üçüncü sırayı oluşturan birkaç sıralı poligonal şekilli hücrelerde ise IGF-IR boyanma yoğunluğunun çok zayıf olduğu belirlendi (Şekil 3, tablo).

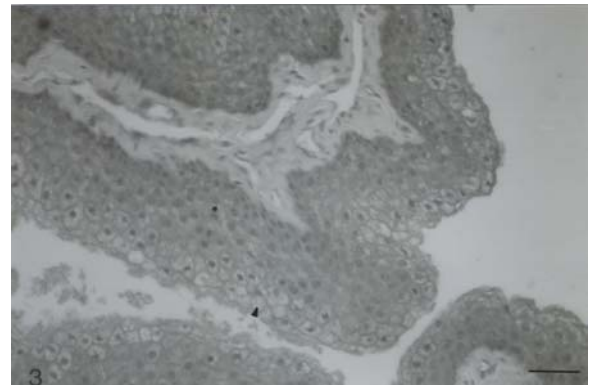


Şekil 2:

Tubullerin bazal bölümü. Bazal hücreler (okbaşı), II. katmandaki hücreler (II); III. katmandaki hücreler (oklar) Bar 25 µm.

Fig. 2:

The basal region of the tubules. Basal cells (arrowhead); The cells of zone II. (II); The cells of zone III. (arrows) Bar 25 µm.



Şekil 3:

Tubullerin apikal bölümü. I. ve II. katmandaki hücrelerde IGF-IR immunreaksiyonu (*). III. katmandaki hücrelerde IGF-IR immunreaksiyonu (okbaşı) Bar 25 µm.

Fig. 3:

The apical region of the tubules. IGF-IR immunoreaction in the zone I. and II. (arrowhead). IGF-IR immunoreaction in the zone III. (arrow) Bar 25 µm.

Tablo. Horozların üropigi bezinde IGF-IR'ün immunreaksiyonunu gösteren skor değerleri.

Table. Shows the score evaluations of IGF-IR immunoreaction in the uropygial gland of Cockrell.

Bölgeler	I. katmandaki Hücreler	II. katmandaki Hücreler	III. katmandaki Hücreler
Bazal Bölge	+++	+	-
Apikal Bölge	++	++	+/-

Semboller: Boyanmama= -, Çok zayıf boyanma = +/-, Zayıf boyanma = +, Orta derecede boyanma = ++, Kuvvetli boyanma = +++.

Reseptörün hücre içindeki yerleşimine baktığında, bazal bölgede yer alan tubullerin birinci katmanında bazal membran üzerine yerleşen hücrelerde yoğun granül tarzında, diğer bölgelerde ise sitoplazma içinde homojen şekilde dağılmış granüller halinde olduğu belirlendi (Şekil 3).

Tartışma ve Sonuç

Histolojik çalışmalarda üropigi bezindeki tubulusların bazal yarımı yağ, apikal yarımı ise glikojen bölgesi olarak tanımlanmıştır^{17,19,22,33}. Sunulan immunohistokimyasal çalışmada da belirgin iki bölge ayırt edildi. Apikal bölgedeki hücrelerin çoğunluğu orta şiddette IGF-IR boyanması gösterirken, bazal bölgede yer alan hücrelerin çoğunluğu zayıf şiddette IGF-IR boyanması gösterdi. Erkek güvercinlerde 1. zon olarak adlandırılan yağ bölgesinin proliferatif zon, ortada farklılaşma zonu ve iç kısımda lumeni çevreleyen holokrin zon olmak üzere üç bölgeye ayrıldığı bildirilmiştir¹⁷. Erkek bıldırcınlarda 1. zondaki hücreler bazal farklılaşmamış, intermediyet veya farklılaşmış ve olgun veya tamamiyle farklılaşmış hücreler olarak tanımlanmıştır¹⁹. Güvercinlerde üropigi bezinin yağ bölgesinde, bazal membran üzerine yerleşmiş yassı hücreler, bunların üzerinde 2-3 sıralı büyük yuvarlak nükleuslu, lipid damlacıklı intermediyet hücreler, tamamiyle farklılaşmış piknotik nükleuslu, bol lipidli sentral hücreler olmak üzere üç hücre tipi ve lumene hücre döküntüleri ile salgı materyalleri tespit edilmiştir²². Horozların üropigi bezi yağ bölgesinde ise bazal membran üzerine yerleşmiş bazal hücreler ve tubulusun periferinden lumenine doğru göç eden salgılama aşamasında hücreler belirlenmiştir³³. Pekin ördeklerinde üropigi bezinde bazal membran üzerine yerleşmiş yassı çekirdekli küçük bazal hücreler, tubulusun lumenine doğru lipid damlacıkları ile dolu daha

büyük hücreler ve lumene yakın piknotik nükleuslu ve daha büyük lipid damlacıkları ile dolu hücrelerin bulunduğu bildirilmiştir^{20,21}. Sunulan çalışmada yukarıdaki literatürlerde de belirtildiği gibi^{17,19-21} bazal bölgede yer alan tubulusların bazal membran üzerine yerleşen farklılaşmamış olarak adlandırılan tek sıralı yassı hücrelerinde IGF-IR boyanmasının çok yoğun olduğu, bunun üzerinde yer alan II. katmandaki 3-4 sıralı poligonal hücrelerde ise boyanmanın daha zayıf olduğu, lumen tarafındaki, tamamen farklılaşmış olan adlandırılan birkaç hücrede ise boyanmanın olmadığı gözlemlendi. Dolayısıyla farklılaşmamış hücrelerde IGF-IR ekspresyonunun çok fazla, II. katmandaki intermediyet hücrelerde ise orta şiddette, tamamen farklılaşmış hücrelerde ise reseptör ekspresyonunun olmadığı gözlenmiştir.

Kanatlılarda üropigi bezi yağ sekresyonu bakımından önemli bir organ olduğu için çalışmaların büyük bir çoğunluğu yağ bölgesindeki hücrelerin farklılaşması¹⁹⁻²² ve enzim aktivitele-ri^{17,20,21} üzerine yoğunlaşmıştır. Glikojen bölgesindeki hücreleri inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sunulan çalışmada ise tubulusların apikal yarımını oluşturan glikojen bölgesindeki hücrelerin, bazal yarımda bazal membran üzerine yerleşen tek sıralı hücrelerde gözlenen IGF-IR boyanmasına göre daha zayıf reaksiyon gösterdiği gözlemlendi. Tubulusun bazal membran üzerine yerleşen yassı hücrelerinde ve bunun üzerinde yer alan poligonal şekilli 2-3 sıra halinde yerleşmiş hücrelerinde IGF-IR yoğunluğu orta şiddette olup, lumene bakan ve III. katmanı oluşturan birkaç sıralı poligonal şekilli hücrelerde ise IGF-IR boyanma yoğunluğunun çok zayıf olduğu gözlemlendi. Murine keratinosit kültür modellerinde yapılan çalışmada insulin ve IGF-I'nin keratinositlerde proliferasyonu farklı yollarla indüklediği⁶, IGF-IR'ün deride farklılaşmamış germinatif epitelde, folliküler dış kök kısmında, yağ bezi epitel hücrelerinde ve kıl matriksinde eksprese olduğu gösterilmiştir³¹. İnsan yağ bezlerine pek çok yönden benzeyen, rat preputial hücre kültür modellerinde yapılan bir çalışmada büyüme hormonu (GH) ve insulin benzeri büyüme faktörlerinin (IGF) yağ bezlerindeki hücrelerin gelişmesini ve farklılaşmasını uyardığı belirtilerek, çoğalma potansiyeline sahip epitel hücrelerde IGF-I reseptörün fazla miktarda eksprese olduğu, buna rağmen tamamen farklılaşmış hücrelerde ise reseptörün ekspresyonunun gözlenmediği sonucuna varılmıştır²³. Sunulan çalışmada da yukarıdaki literatürlere^{23,31} benzer olarak üropigi bezinde IGF-IR'ün farklı-

laşmamış hücrelerde daha fazla eksprese olduğu, lumene yakın olan birkaç hücrede ise ekspresyonun olmadığı, bu hücrelerin tamamen farklılaştığını göstermektedir.

Çalışmada IGF-IR'ün hücrenin sitoplazmasında granül tarzında homojen bir şekilde yayıldığı gözlemlendi. İnsan ve rat kolon epitel hücrelerinde yapılan çalışmada IGF-IIR'ünün bu hücrelerde hem apikal hemde basolateral bölgede yerleştiğini³⁴, yine ratların jejunumunda yapılan bir çalışmada IGF-IIR'ünün villus epitel hücrelerinin nukleuslarının çevresine yerleştiği bildirilmiştir³⁵.

Sonuç olarak, sunulan çalışmada üropigi bezinde bazal ve apikal bölgede boyanmanın gözlenmediği birkaç hücre dışında genelde tüm hücrelerde farklı yoğunlukta IGF-IR boyanmasının gözlenmesi bu bezlerde hücre proliferasyonunun ve hücre farklılaşmasının çok yoğun olarak meydana geldiğini göstermektedir. Ayrıca bazal bölgede yer alan bazal membran üzerine yerleşmiş farklılaşmamış olarak adlandırılan yassı hücrelerde IGF-IR ekspresyonunun fazla olması bu hücrelerde bölünmenin aktif olarak meydana geldiğini, lumene doğru ise IGF-IR boyanma yoğunluğunun azalmasına rağmen tüm tubullerde yer alan hücrelerde farklılaşma sürecinin devam ettiği sonucuna varılabilir.

Kaynaklar

1. BASERGA R. The contradictions of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Oncogene* 2000; 19 : 5574-81
2. FROESCH ER., SCHMID C., SCHWANDER J., ZAPF J. Actions of insulin-like growth factors. *Annu. Rev. Physiol* 1985; 47: 443-67
3. TERMANINI B., NARDI RV., FINAN TM., PARIKH I., KORMAN LY. Insulinlike growth factor I receptors in rabbit gastrointestinal tract. Characterization and autoradiographic localization. *Gastroenterology* 1990; 99 : 51-60.
4. CHEN K, NEZU R, WASA M, SANDO K, KAMATA S, TAKAGI Y, OKADA A. Insulin-like growth factor-1 modulation of intestinal epithelial cell restitution. *JPEN. J. Parenter. Enteral. Nutr* 1999; 23 : 89-92.
5. RECHLER MM, NISSLEY SP. *Handbook of Pharmacology, Peptide Growth Factors and Their Receptors I* (Sporn, M. S., Roberts, A. B. eds.) Springer-Verlag, New York, 1990.
6. SHEN S., ALT A., WERTHEIMER E., GARTSBEIN M., KUROKI T., OHBA M., BRAIMAN L., SAMPSON S. R., TENNENBAUM T. A Divergence Point in the Signaling of Insulin and IGF-1-Induced Proliferation of Skin Keratinocytes. *Diabetes*; 2001; 50: 255-264
7. DUNCAN MD, KORMAN LY, BASS BL. Epidermal growth factor primes intestinal epithelial cells for proliferative effect of insulin-like growth factor I. *Dig. Dis. Sci.* 1994; 39 : 2197-201.
8. JEHLE PM, FUSGAENGER RD, BLUM WF, ANGELUS NK, HOEFLICH A, WOLF E, JUNGWIRTH RJ. Differential autocrine regulation of intestine epithelial cell proliferation and differentiation by insulin-like growth factor (IGF) system components. *Horm. Metab. Res.* 1999; 31 : 97-102.
9. SU HY, HICKFORD JG, BICKERSTAFFE R, PALMER BR. Insulin-like growth factor 1 and hair growth. *Dermatol. Online. J.* 1999; 5 :1.
10. STETTINHEIM P. *The Integument of Birds. Avian Biology. Volume II*, Academic Press, New York, 1972.
11. BELL DJ, FREEMAN BM. *Physiolgy and Biochemistry of the Domestic Fowl, Volume I*, Academic Press London and New York, 1971.
12. DOĞUER S, ERENÇİN Z. *Evcil Kuşların Komparativ Anatomisi. Ankara Üniv. Vet. Fak. Yayınları*, 176, 94-95, 1964.
13. NICKEL R, SCHUMMER A, SEIFERLE E. *Anatomy of the Domestic Birds. Verlag Paul Parey Berlin, Hamburg*, 156-157, 1977.
14. KING AS, MCLELLAND J. *Birds, Their Structure and Function. Bailliere Tindall, London*, 28, 290, 1984.
15. EVANS HE. *Diseases of Cage and Aviary Birds. Anatomy of the budgeriar. Philadelphia: Lea and Febiger*, 127, 613, 1982.
16. KOLATTUKUDY PE. *Avian Uropygial (Preen) Gland. Methods Enzymology* 1981; 72: 714-20.
17. ASNANI MV, RAMACHANDRAN AV. Roles of Adrenal and Gonadal Steroids and Season in Uropygial Gland Function in Male Pigeons, *Columba Livia. General and Comparative Endocrinology* 1993; 92: 213-224.
18. ABALAIN JH, AMET Y, DANIEL JY, FLOCH HH. Androgen Regulation of Secretions in the Sebaceous-like Uropygial gland of the Male Japanese Quail. *J. Endocr.* 1984; 103: 147-153.
19. ABALAIN J H, AMET Y, LECAQUE D, SECCHI J, DANIEL JY, FLOCH HH. Ultrastructural Changes in the Uropygial Gland of the Male Japanese Quail, *Coturnix Coturnix*, after Testosterone Treatment. *Cell Tissue Res.* 1986; 246: 373-378.
20. JENIK RA, FISCH EJ, GOODRIDGE AG. Terminal Differentiation in the Avian Uropygial Gland. Accumulation of Fatty Acid Synthase and Malic

- Enzyme in non- Dividing Cells. *Cell Tissue Res.* 1987; 250 : 315-321.
21. CARPENTER WR, GOODRIDGE AG. Differentiation in Culture of Cells from an Avian Holocrine Secretory Gland: Preparation of Isolated Cells and Conditions Which Induce Accumulation of Malic Enzyme. *Journal of Cellular Physiology* 1988; 137: 205-213.
 22. BHATTACHARYYA SP, SAHU C. Histomorphological and Histochemical Studies on the Preen Gland of Cortisone- Treated Male Pigeons. *Anat. Anz. Bd.* 1976; 140: 162-169.
 23. DEPLEWSKI D, ROSENFELD L R. Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factors Have Different Effects on Sebaceous Cell Growth and Differentiation. *Endocrinology* 1999; 140: 4089-94.
 24. HANSEN LH, MADSEN B, TEISNER T, NIELSEN JH, BILLESTRUP N. Characterization of the Inhibitory Effect of Growth Hormone on Primary Preadipocyte Differentiation. *Mol. Endocrinol.* 1998; 12: 1140 - 1149.
 25. SATO T, IMAI N, AKIMOTO N, SAKIGUCHI T, KITAMURA K, ITO A. Epidermal growth factor and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppress lipogenesis in hamster sebaceous gland cells in vitro. *J. Invest. Dermatol.* 2001; 117 : 965-70.
 26. AKIMOTO N, SATO T, SAKIGUCHI T, KITAMURA K, KOHNO Y, ITO A. Cell Proliferation and Lipid Formation in Hamster Sebaceous Gland Cells. *Dermatology*; 2002; 204: 118-123
 27. RIDDERSTRALE M, DEGERMAN E, TORNQVIST H. Growth hormone stimulates the tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in primary adipocytes. *J Biol Chem.* 1995; 270 : 3471-4.
 28. ROSENFELD RL, KENTSIS A, DEPLEWSKI D, CILETTI N. Rat preputial sebocyte differentiation involves peroxisome proliferator-activated receptors. *J.Invest.Dermatol.*1999; 112 : 226-32.
 29. CROS DL DU, ISAACS K, MOORE GP. Localization of epidermal growth factor immunoreactivity in sheep skin during wool follicle development. *Journal of Investigative Dermatology.* 1992; 98: 109-115.
 30. GREEN MR, BASKETTER DA, COUCHMAN JR, REES DA. Distrubution and number of epidermal growth factor receptors in skin is related to epithelial cell growth. *Dev. Biol. Dec.* 1983; 100 : 506-12
 31. HODAK E, GOTTLIEB AB, ANZILOTTI M, KRUEGER JG. The insulin-like growth factor 1 receptor is expressed by epithelial cells with proliferative potential in human epidermis and skin appendages: correlation of increased expression with epidermal hyperplasia. *J. Invest. Dermatol.* 1996 ; 106 : 564-70.
 32. JACKSON P, BLYTHE D. Immunolabelling techniques for light microscopy. Editor Beesley JE, *Immunocytochemistry*, Oxford Universty Press, New York, 1993.
 33. WAGNER RC, BOORD RL. Cytological Differentiation in the Uropygial Gland. *J.Morphol.* 1975; 146 : 395-413.
 34. PILLION DJ, GRIZZLE WE, YANG M, MEEZAN E, STOCKARD CR, GANAPATHY V, LEIBACH FH, MYERS RB, HASKELL JF. Expression of IGF- II/Man-6-P receptors on rat, rabbit, and human colon epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 1993; 264 : 1101-10.
 35. YOUNG GP, TARANTO TM, JONAS HA, COX AJ, HOGG A, WERTHE GA. Insulin-like growth factors and the developing and mature rat small intestine: receptors and biological actions. *Digestion.* 1990; 46: 240-252.