

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Halis ÖCAL

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Aydın GİRĞİN

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Berrin GENÇER TARAKÇI

Danışman

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ayşe Kühn

Prof. Dr. Sadık Yılmaz

Doç. Dr. Şahin AŞlan

Doç. Dr. Leyla Koyutürk

Yrd. Doç. Dr. Berrin Gençer Tarakçı

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamın planlanması ve yürütülmesi sırasında yardım ve desteğini gördüğüm danışman hocam Yrd. Doç.Dr. Berrin Gençer Tarakçı'ya ve tüm emeği geçenlere teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca bu çalışmayı destekleyen Fırat Üniversitesi Araştırma Fonu'na (FÜNAF-462) da teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ	3
3.1. Calbindinin Endokrin Bez ve Hücrelerdeki Dağılımı.....	5
3.1.1. Tiroid.....	5
3.1.2. Adren.....	6
3.1.3. Hipofiz.....	7
3.1.4. Pankreas.....	8
3.1.5. Mide ve Bağırsaklar.....	11
4. GEREÇ VE YÖNTEM	15
4.1. İmmunohistokimyasal Yöntem.....	16
4.1.2. ABC Tekniği.....	16
4.1.3. PAP Tekniği.....	17
5. BULGULAR	18
6. TARTIŞMA	33
7. KAYNAKLAR	40
8. ÖZGEÇMİŞ	49

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1: Rat tiroidinin parafoliküler hücrelerinde calbindin D28k immunoreaktivitesi.....	21
Şekil 2: Rat tiroidinin parafoliküler hücrelerinde calbindin D28k immunoreaktivitesi	21
Şekil 3: Rat tiroidinin follikül epitel hücreleri (s) ile kolloidde (t) Calbindin D28k immunoreaktivitesi görülmemekte	22
Şekil 4: Rat paratiroidinde calbindin D28k immunoreaktivitesi görülmemekte.....	22
Şekil 5: Rat tiroid parafoliküler hücrelerinde kalsitonin immunoreaktivitesi.....	23
Şekil 6: Rat tiroid parafoliküler hücrelerinde kalsitonin immunoreaktivitesi	23
Şekil 7: Rat adenohipofizinde calbindin D28k Immunoreaktivitesi.....	24
Şekil 8: Rat adenohipofizinde calbindin D28k immunoreaktivitesi	24
Şekil 9: Rat hipofizinin intermedier lobunda (ok) calbindin D28k immunoreaktivitesi görülmemekte.....	25
Şekil 10: Rat adrenal medullasındaki kromaffin hücrelerinde calbindin D28k immunoreaktivitesi	25
Şekil 11: Rat adrenal medullasındaki kromaffin hücrelerinde calbindin D28k immunoreaktivitesi.....	26
Şekil 12: Rat adrenal medullasının kromaffin hücrelerinde (1) ve sinir tellerinde (2) calbindin D28k immunoreaktivitesi. İmmunohistokimyasal boyama.....	26
Şekil 13: Rat adrenal medullasının sinir tellerinde calbindin D28k immunoreaktivitesi	27

Şekil 14: Rat mide fundusunda calbindin D28k İmmunoreaktivitesi.....	27
Şekil 15: Rat mide fundusunun sinir tellerinde calbindin D28k immunoreaktivitesi.....	28
Şekil 16: Rat mide fundusunda sinir tellerindeki calbindin D28k immunoreaktivitesi	28
Şekil 17: Rat midesinin sinir tellerinde calbindin D28k immunoreaktivitesi.....	29
Şekil 18: Rat endokrin pankreasında calbindin D28k immunoreaktivitesi görülmemekte.....	29
Şekil 19: Rat ekzokrin pankreasında calbindin D28k immunoreaktivitesi görülmemekte.....	30
Şekil 20: Rat pankreasının Langerhans adacığında glukagon immunoreaktivitesi	30
Şekil 21: Rat pankreasının Langerhans adacığında insülin immunoreaktivitesi.....	31
Şekil 22: Rat duodenumunda calbindin D28k immunoreaktivitesi görülmemekte.....	31
Şekil 23: Rat kalın bağırsağında calbindin D28k immunoreaktivitesi görülmemekte.....	32

1. ÖZET

Bu çalışmada, Elazığ Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen 20 adet ergin Wistar rat kullanıldı. Eter ile anestezi edilen hayvanlardan, tiroid, paratiroid, hipofiz, adren, pankreas, ince ve kalın bağırsaklar ve mide dokuları alınarak parafin ve kryostat kesitler için rutin doku yürütme prosedürü uygulandı.

Tavuk bağırsağındaki calbindin-D28k'ya karşı hazırlanmış olan antiserum kullanılarak, immunohistokimyasal yöntemlerle calbindinin ratların bazı endokrin bezleri (tiroid, paratiroid, hipofiz, adren) ve sindirim kanalı ile pankreas endokrin hücrelerindeki dağılımları incelendi. Paratiroid, bağırsaklar ve pankreasın endokrin hücrelerinde herhangi bir spesifik immunoreaktiviteye rastlanmadı. Bununla beraber, immunoreaktivite tiroidin parafoliküler hücrelerinde, hipofizde ve adrende gözlemlendi. Midede ki endokrin hücrelerde çok zayıf immunoreaktivite vardı. Midedeki immunoreaktivite çoğunlukla sinir tellerinde görüldü.

Ayrıca insülin ve glukagonun pankreasta, kalsitoninin ise tiroidin parafoliküler hücrelerinde immunoreaktivitesi yoğundu.

Calbindin-D28k'nun tiroid, hipofiz, adren ve midedeki dağılım tarzı dikkate alınarak bunun intrasellüler ve ekstrasellüler ortamlardaki kalsiyum homeostazisinde veya endokrin hücre uyarılmasını düzenleyen kalsiyum mekanizmasında rol alabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Calbindin, rat, endokrin bez, endokrin hücre, immunohistokimya.

2. ABSTRACT

In this study, 20 adult Wistar rats which have been obtained from Elazığ Veterinary Control Research Institute were used. After anesthesia with ether, tissue samples were taken from thyroid, parathyroid, pituitary, adrenals, pancreas, small and large intestine, and stomach. The tissue samples were processed for paraffin and cryostat sections.

Distribution of calbindin in thyroid, parathyroid, pituitary, adrenals, pancreas, small and large intestine, and stomach were investigated immunohistochemically using an antiserum raised against the 28k Da calbindin from chicken duodenum. Parathyroid, intestine and pancreatic endocrine cells failed to react with the antibodies although immunoreactivity was found in the thyroid, pituitary and adren. Calbindin immunoreactivity was rare in the stomach. But several nerve fibres were showed positive immunoreactivity.

In addition, insulin and glucagon immunoreactivity were seen in the pancreas, calcitonin immunoreactivity was found in the thyroid parafollicular C cells.

Localization of calbindin D28k in the thyroid, pituitary, adrenals and stomach is suggested to be in a role for calbindin in the mechanisms of calcium mediated endocrine cell stimulation or of intracellular and extracellular calcium homeostasis.

Key Words: Calbindin D28k, rat, endocrine gland, endocrine cell, immunohistochemistry.

3. GİRİŞ

İntrasellüler kalsiyum, hücreyel uyarı iletiminde anahtar rol oynar ve etkisi intrasellüler kalsiyum bağlayan proteinler (CaBPs) ile düzenlenir (21, 30, 17). Darwin ve arkadaşları (30) kalsiyum bağlayan proteinleri EF-hand grubu ve anexin olmak üzere iki alt gruba ayırmıştır. EF-hand grubu üyeleri, kalsiyuma bağlanan bölgelerin aldıkları şekillerinden dolayı bu isimle adlandırılırlar (72). Anexin grubundakiler kalsiyuma ilaveten fosfolipidlere de bağlanırlar (10). EF hand grubunda ilk tanımlanan hormon parvalbumin'dir. Bunun bulunmasından sonra Calmodulin, Traponin C, Calbindin-D28k, Calbindin-D9k ve S-100 proteini gibi protein gruplarını içeren 40'dan fazla farklı grup bulunmuştur (8, 54, 72).

Calbindin-D28k, yaklaşık olarak 28,000 moleküler ağırlığa sahip bir kalsiyum bağlayıcı protein olup (21) EF-hand grubuna dahildir (72). Bu protein ilk kez tavuk intestinal mukozasından izole edilmiştir (103). Daha küçük ve genetik olarak ilişkisiz EF hand grubuna ait calbindin-D9k memeli bağırsağında, kanatlı bağırsağındaki calbindin-D28k ile yer değiştirir (59, 96). İntestinal epiteliyumdaki her iki proteinin konsantrasyonu vitamin D ile düzenlenir (21, 49, 65, 90, 96, 99, 101). Bu nedenle bu proteinler bazen vitamin D bağımlı kalsiyum bağlayıcı proteinler (D-CaBP) olarak adlandırılır yada calbindin-D ifadesinde olduğu gibi vitamin D bağımlı olduğunu gösteren "D" son eki verilir.

Kanatlı bağırsağındaki epiteliyal lokalizasyonuna ilaveten, calbindin-D 28k memeliler ve kuşların periferel ve sentral sinir sisteminde de bulunmuştur (5,9, 14, 19, 36, 43, 62, 79, 95, 110). İntestinal calbindin-D28k seviyesinin vitamin D

modulasyonunun aksine bunun sentral sinir sistemindeki konsantrasyonu Vitamin D'den bağımsız gibi görünür (21, 70). Calbindin D28k'nın beyinde intrasellüler Ca^{+2} tamponu gibi fonksiyon gördüğüne inanılmaktadır (21, 30, 61, 71, 87). Bu tampon etkisinin yüksek uyarıma bağlı olarak hücre içinde artmış olan kalsiyumun nörotoksik etkisinden hücreleri koruduğu düşünülmektedir.

Bazı dokularda calbindinin normal sentezi için, kalsiyum düzenleyici hormona (1,25(OH)₂D) ihtiyaç vardır. Bu hormon aktif bir vitamin D metabolitidir ve calbindin D28k gibi kalsiyum bağlayıcı proteinlerin sentezini stimüle eden steroid bir hormon olarak rol oynar (69). 1,25(OH)₂D hormonu, çok farklı organlar ve hedef hücrelerde bulunur (69, 93). Bu hormon, insülin sekresyonu (27, 48), derinin farklılaşması (42) gibi birçok değişik fonksiyonlarda etki gösterir.

Direkt veya indirekt kalsiyum metabolizmasını etkileyen hormonların birçoğunu (örneğin, paratiroid hormonu, tiroksin, tiroid stimulan hormon (TSH), noradrenalin ve gastrin) seçici olarak kalsiyum düzenleyici hormon tutmaktadır (25, 31, 93). Bazı dokularda, örneğin tavukların bağırsaklarında ve ratların böbreklerinde calbindin sentezini kalsiyum düzenleyici hormon ayarlar. Memeli pankreası ve tavuk böbrekleri gibi bazı organlarda ise bu hormonun eksikliğinde dahi calbindin sentezi gerçekleşmektedir. Beyinde calbindin sentezi üzerine bu hormonun hiçbir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Bu durumları açıklayacak kesin bir teori ileri sürülmemekle birlikte calbindin'in bağırsak ve böbrek epitellerinde kalsiyum transportu için gerekli olduğu bildirilmiştir (104).

3.1. Calbindin'in Endokrin Bez ve Hücrelerdeki Dağılımı

Calbindin'in, pankreas ve gastrointestinal kanaldaki yaygın endokrin hücreleri ile bazı endokrin bezlerdeki (tiroid, hipofiz, adren) dağılımı birçok memeli ve kanatlı türlerinde belirlenmiştir (1, 13, 15, 29, 44, 45, 76, 94, 102, 111).

3.1.1. Tiroid

Calbindin içeren immunoreaktif hücrelerinin kalsiyum düzeyinin regülasyonunda direkt veya indirekt rolü olduğu bildirilmiştir (29). Tiroidin parafoliküler hücreleri (C hücreleri) çok sayıda polipeptid hormonunu salgılar. Bunlardan en iyi bilineni kalsitonindir (33, 114). Kalsitonin hipokalsemik hormon olup hiperkalsemiden sorumludur (51). Yapılan immunohistokimyasal çalışmalar ile kalsitonin immunoreaktif hücrelerinin dağılımı rat tiroidinin parafoliküler hücrelerinde gösterilmiştir (3, 56, 112, 113, 115).

Tiroidin parafoliküler hücrelerinde calbindin immunoreaktivitesi, kuş, kedi, köpek (15), kobay (15, 94, 111) ve ratda (2, 15, 45) belirlenmiştir.

M. Zabel ve arkadaşları (111, 113) yaptıkları immunohistokimyasal çalışmalarda rat tiroidinin parafoliküler hücrelerinde kalsiyum bağlayıcı proteine rastlamadıklarını açıklamışlardır.

Ratların tiroid bezlerinde calbindin D-28k ile yakından benzerliği olan spot-35 calbindin'in dağılımı immunohistokimyasal olarak incelenmiştir (2). Bu çalışmada spot-35 calbindin immunoreaktivitesi, tiroidin folliküler hücrelerinin bazal yüzeyine yakın olarak yerleşmiş çok sayıda salgı granülü ile karakterize parafoliküler hücrelerde yoğun olarak gözlenmiştir. Calbindin'in hücrelerdeki bu

görünümüne bakarak, tiroidin salgı prosesinin düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmektedir (2).

Calbindin immunoreaktivitesi tavuk embriyolarının tiroidlerindeki folliküler hücrelerde de gözlenmiştir (45). Ayrıca Inpanbutr ve Taylor, ışık ve elektron mikroskopik olarak immunohistokimyasal yöntemlerle yaptıkları çalışmada tavukların yaşa göre değişen derecelerde olmak üzere, tiroid folliküler hücrelerinde calbindin-D28k immunoreaktivitesinin bulunduğunu bildirmişlerdir (46). Bu çalışmaya göre calbindin-D28k'nın folliküler hücrelerin organelden yoksun kenarları boyunca dağılmış ve nükleusa doğru genişlemiş olduğu belirtilmiştir. Fakat aynı çalışmada kolloid ile folliküler epitel hücrelerinde calbindin-D28k immunoreaktivitesi gözlemlenmemiştir.

Calbindin-D28k üzerine yapılan bir çalışma sonucunda bu proteinin, tavuk ultimobronşiol bez hücrelerinde kalsitonin ile kolokalizasyon içerisinde bulunduğu bildirilmiştir (97).

3.1.2. Adren

Adren medullasının esasını kromaffin hücreler oluşturur. İçerdikleri kromaffin granüllerin büyük ya da küçük oluşuna göre bu hücrelerin adrenal ve noradrenalin hücreleri olmak üzere iki tipi vardır. Bu hücreler adren medullasındaki APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) sistemine dahil olan endokrin hücrelerdir. Bu hücrelerin salgı aktivitesi, gangliyonik sempatik innervasyon ile düzenlenen postgangliyonik sempatik nöronlar ile modifiye edilir (51).

Adren medullasının kromaffin hücrelerinde kalsiyum bağlayıcı proteinlerin dağılımı ile ilgili yayınlar az sayıdadır. Çeşitli kemiricilerin adreninde calbindin-D28k'nın dağılımı üzerine yapılan bir çalışmada ergin fare ve ratların tüm noradrenerjik kromaffin hücrelerinde calbindin immunoreaktivitesi bulunmuştur (4). Adren medullasında calbindin-D28k ile noradrenalinden adrenalin sentez eden PNMT (phenylethanolamine n-methyl transferase enzimi) enziminin kolokalizasyon çalışmalarında, PNMT ile boyanmayan hücrelerin kuvvetli bir şekilde calbindin-D28k immunoreaktivitesi gösterdiği dolayısı ile bu hücrelerin noradrenerjik kromaffin hücreler olduğu bildirilmiştir (4, 24, 57).

Tavukların adreninde calbindin immunoreaktivitesi zayıf olarak bulunmuştur (22).

Kedi ve köpek adren medullasında Spot 35 calbindin immunoreaktivitesinin bulunduğu bildirilmiştir (15, 44). Kobay adrenal medullasında ise CaBP immunoreaktivitesine rastlanılmamıştır (44).

3.1.3. Hipofiz

Köpek ve kobay hipofizinin anterior lobundaki çeşitli hücrelerde, spot 35 calbindin immunoreaktivitesi bildirilmiştir. Aynı çalışmada kedilerde herhangi bir immunoreaktivite bulunamamıştır (44).

Bir başka çalışmada kalsiyum bağlayıcı protein olan spot 35 calbindin'in rat anterior hipofizinde dağılımı araştırılmıştır. Bu çalışmaya göre spot 35 calbindin immunoreaktivitesinin, anterior hipofizin ACTH (Adrenokortikotrop Hormon), LH

(Lüteinizasyon Hormon) ve TSH (Tiroid Stimulan Hormon) gibi hormon üreten hücrelerinde dağılımı tespit edilmiştir (1).

Buffa ve ark. (15) yaptıkları çalışmada köpek, kedi, rat ve kobay hipofizinin anterior lobunda calbindin-D28k ile seçici olarak reaksiyona giren immunoreaktif hücreler belirlemişlerdir.

Ratların anterior hipofizindeki hücrelerde calbindin gibi EF hand grubuna ait kalsiyum bağlayıcı protein olan calretin immunoreaktivitesi tespit edilerek, calretinin TSH hücreleri ile kolokalizasyon içerisinde bulunduğu bildirilmiştir (23). Yine bu çalışmada calretin immunoreaktivitesine anterior ve posterior hipofizin sinir tellerinde de rastlanılmıştır (23).

Bir başka çalışmada ratların posterior hipofizindeki sinir sonlarında yoğun bir şekilde calbindin-D28k ve calretin immunoreaktivitesi belirlenmiştir (63). Burada calbindin ve calretin için yapılan çifte boyamalarda calbindine oksitosin ve vazopressin içeren sinir sonlarının her ikisinde de bulunmuştur. Fakat calretin immunoreaktivitesi sadece oksitosin terminallerinde görülmüştür. Bu çifte boyama çalışmaları ile calbindin ve calretinin aynı oksitosin sinir sonlarında kolokalizasyon içinde bulunduğu bildirilmiştir (63).

3.1.4. Pankreas

Pankreasın endokrin bölümünde calbindin içeren immunoreaktif hücreler, ratlarda (13, 50, 58, 64, 75, 76, 100) tavuklarda (41, 64, 75, 76, 81), kobayda (15, 106), golden hamster ve gerbilde (106), insanda (50, 75), kedi ve köpekte (15, 64) ve farede (64, 106) bulunmuştur.

İmmunolojik çalışmalara ilaveten yapılan biyokimyasal (52) çalışmalara göre memeli ve kanatlı pankreasının her ikisinde de calbindin-D28k'nın bulunduğu açıklanmıştır. Biyokimyasal çalışmalara göre pankreasta kalsiyum bağlayıcı proteinler için spesifik reseptörler bulunur (22, 73). Otoradyografik çalışmalar ile rat pankreasındaki insülin salgılayan B hücrelerinin çekirdeğinde kalsiyum bağlayıcı proteinin yer aldığı bildirilmiştir (25).

Kalsiyum ve vitamin D, langerhans adacıklarında çeşitli metabolik olayların düzenlenmesinde etkilidir. Bunlar özellikle endokrin pankreasta B hücrelerinden insülin salgılanmasında önemli rol oynar. Kalsiyumun bu etkileri muhtemelen kalsiyum bağlayıcı proteinler ile düzenlenir (11, 27, 47).

Langerhans adacıklarındaki B hücreleri, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ için spesifik reseptörler ile donanmıştır ve vitamin D bağımlı kalsiyum bağlayıcı proteinler (calbindin-D) içerirler. İnsülin salgısı, vitamin D ile yıkıma uğrarken $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ile tekrar yapılır. Fakat calbindin-D yolu ile B hücreleri üzerine, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün etkisi açık değildir (13). Bu çalışmada calbindin-D28 k ile D9k arasındaki ilişki; vitamin D eksikliği ve $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ fazlalığı olan ratlarla normal rat gruplarının endokrin pankreaslarında incelenmiştir. Bu çalışmada hiçbir hayvan grubunun endokrin ve ekzokrin kısmında calbindin D9k varlığı gözlenmemiştir. Fakat vitamin D eksikliğinde calbindin D28k'nın arttığı ve kısmen kalsiyum düzenleyici hormon tarafından yeniden yapılandırıldığı görülmüştür. Calbindin D28k pozitivitesi yalnızca endokrin bölüm A ve B hücrelerinde bulunmuştur. Özellikle glukagon salgılayan A hücrelerindeki boyamanın daha yoğun olduğu tespit

edilmiştir. Boyama yoğunluğundaki bu farklılık vitamin D eksikliğinde artmasına karşılık, kalsiyum düzenleyici hormon uygulandığında ise azaldığı belirlenmiştir. Calbindin D28k'nın A hücrelerindeki bu üstünlüğü, A ve B hücrelerinin nasıl bir etkileşim içinde bulunduğunu ve calbindin-D28k'nın kalsiyum metabolizmasındaki rolünün nasıl olduğu sorularını ortaya çıkarmıştır (13).

Chertow ve ark. (20) vitamin D eksikliği olan hayvanların endokrin adacıklarındaki kalsiyum birikiminde bir eksiklik olduğunu belirlemişler ve vitamin D'nin endokrin adacıklardaki kalsiyum metabolizması üzerinde spesifik bir etkiye sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir (27, 68). Bu etki ile intrasellüler kalsiyum seviyesindeki muhtemel bir artışın insülin salınımını kolaylaştıracağı bildirilmiştir.

Clark ve ark. (26), yaptıkları araştırmada vitamin D metaboliti olan kalsiyum düzenleyici hormonun olgun ve gelişmekte olan rat pankreasının langerhans adacıklarındaki B hücrelerinde bulunduğunu ve bunun adacıklardaki insülin salgılayan B hücrelerinin olgunlaşmasında rol oynadığını bildirmişlerdir.

Rat pankreasının glukagon içeren alfa (A) hücrelerinin B hücrelerinden daha çok calbindin (D27k) içerdiği bildirilmiştir (76). B hücrelerindeki calbindin'in vitamin D ile düzenlendiği belirtilmiş ve calbindin'in, B hücresi dışındaki lokalizasyonu ile pankreasta calbindin'in daha başka bir rolü olduğu ileri sürülmüştür (76).

Roth ve ark. (81) ile Morrissey ve ark. (64), tavuklarda calbindin-D28k'nın yalnızca insülin üreten hücrelerde (B hücreleri) yer aldığını bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada Pochet ve ark. (76), tavukların B hücrelerinin

yoğun bir şekilde calbindin ile boyanmasının yanında B hücresi olmayan hücrelerin de farkedilebilir miktarda calbindin içerdiğini belirlemişlerdir. Roth ve ark. (81) ile Pochet ve ark. (76)'nın bildirdiği bu farklılıkların nedeni tam olarak açık değildir.

Yapılan bir çalışmada (78) calbindin-D28k ile yakından ilişkili olan calsineurin ve calretin gibi kalsiyum bağlayıcı proteinlere, gerbil, Syrian hamster ve rat pankreasının endokrin hücrelerinde rastlanmıştır.

3.1.5. Mide ve Bağırsaklar

İntestinal calbindinler ile Vitamin D bağlantılıdır ve bağırsaklarda yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar (34). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tüm intestinal absorptif prosesi 3 aşamada etkilediği belirtilmiştir. Bunlar a) hücre içine Ca^{+2} transferi b) hücre içine Ca^{+2} translokasyonu ve c) intestinal hücreden Ca^{+2} ekstrüzyonudur (105). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ilk aşama üzerine ikinci aşamadan daha fazla etkilidir ve fosfolipid metabolizmasındaki değişiklikleri düzenler. İlk aşama protein sentezine bağlı olmayabilir. Fakat ikinci aşama calbindin sentezi ile düzenlenir. Calbindin tüm absorptif yüzeydeki Ca^{+2} 'u etkileyen ikinci aşamada rol oynar (35, 60).

Kolloidal altın tekniği kullanılarak kanatlılar üzerinde yapılan çalışmalarda Taylor ve Inpanbutr (98), gittikçe azalan konsantrasyonlarda $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verilmesinden kısa bir süre sonra intestinal hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda calbindin-D28k bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Bu sonuçlara göre intestinal calbindin'in, transsellüler kalsiyum transportunda düzenleyici bir rol oynadığı belirtilmiştir (98).

İmmunohistokimyasal olarak calbindin, birçok kanatlı ve memeli türlerinin bağırsaklarında prizmatik epitelial hücrelerin sitosolünde lokalize olmuştur (6, 98). İmmunohistokimyasal yöntemler ile calbindinin membran ile çevrili sitoplazmik kompartmanlarda yada sellüler membranlı unsurlarda yer almadığı belirtilmiştir (98). Bununla beraber biyokimyasal teknikler kullanılarak yapılan araştırmalarda, calbindin-D28k'nın membranla ilişkili formunun tavuk intestinal mukozasında belirlendiği açıklanmıştır (85).

Calbindin-D28k'nın birçok kanatlı ve memeli türlerindeki dağılımı türe ve bağırsak bölümlerine göre değişmektedir. Calbindin-D28k içeren endokrin hücreler; domuzların duodenum, ileum ve jejunumunda, keçilerin duodenum ve ileumunda ve ratlarda ise nadir olarak ileumda tespit edilmiştir (74). Başka bir çalışmada ratların hem duodenum hemde ileumlarındaki endokrin hücrelerinde calbindin immunoreaktivitesine seyrek olarak rastlanılmıştır (80). Bu hücreler epitelial yüzeye doğru ince uzun tüp şeklinde uzanmış ve siyah ya da koyu kahverengi görünümde saptanmıştır. Bunlar kriptlerden daha çok villuslarda yer alırlar. Fare duodenumunda da calbindin reaktif hücreler gözlenmiştir (84). Kobay ve köpek duodenumu ile kuşların kolonunda ve insan duodenumundaki endokrin hücrelerinde de calbindin immunoreaktif hücrelerine rastlanılmakla beraber aynı çalışmada rat duodenum ve kalın bağırsağında immunoreaktivite görülmemiştir (15). Ayrıca Japon bildircininin'in kalın bağırsağında da çok sayıda calbindin bulunmuştur (79).

Pochet ve ark. (74), endokrin hücrelerin yanısıra intestinal absorptif hücrelerde de calbindin-D28k dağılımlarını incelemişler ve domuz ve jerboanın intestinal absorptif hücrelerinde calbindin'e özellikle domuz duodenumunda yoğun bir şekilde rastladıklarını ve bunların villuslar boyunca dağıldığını fakat kriplerde gözlenmediğini bildirmişlerdir. Bununla beraber fare, rat ve keçi absorptif hücrelerinde hiçbir calbindin-D28k immunoreaktivitesi görülmediğini belirtmişlerdir.

Calbindin'in başlıca memeli ve kanatlı duodenumunun absorptif hücre sitoplazmasındaki lokalizasyonu, bu proteinin intestinal kalsiyum diffüzyonunun intrasellüler bir kolaylaştırıcısı olarak rol oynadığını gösterir (34). Ayrıca calbindin'in, bazolateral membranlara kalsiyum transfer edebilen intrasellüler depo alanlarına, kalsiyum taşıyıcısı olarak rol oynadığı bildirilmiştir. Yine diffüzyonu kolaylaştıran intestinal calbindin, vitamin D bağımlı transsellüler kalsiyum transportu esnasında biriken toksik seviyedeki kalsiyumu önlemek için intrasellüler tampon olarak rol oynar (66).

İnsan mide fundusunun mukozal hücreleri ile ince bağırsakların üst kısmında da calbindin içeren hücelere rastlanmıştır. Aynı çalışmada bu organlarda kalsiyum bağlayıcı bir protein olan calretin immunoreaktivitesi bulunmamasına karşın, çok nadiren ileum ve kolonda immunoreaktivite gözlenmiştir(102).

Enterokromaffin hücreleri (ECL hücreleri), memeli midesinin oksintik mukoza bölümünde bulunurlar (39, 88). ECL hücreleri oksintik mukozanın temelinde yer alan endokrin hücreler ile yakından ilişkilidir. Ultrasütruktürel

çalışmalara göre ECL hücreleri membranla çevrili tipik salgı granüllerine sahiptirler ve endokrin hücrelerin bir sınıfını oluştururlar (16, 89). Midede gastrik mukozanın ECL hücrelerinde calbindine, rat, kobay, kedi ve köpekte rastlanılmıştır. İnsanda ve kuşlarda ise gözlenmemiştir (15).

Rat midesinde gastrik ECL hücreleri tarafından üretilen histamin gastrik asit sekresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (7). Gastrin histamin sekresyonunu stimüle eder ve intrasellüler Ca^{+2} da bir artışa neden olur (77). Kalsiyum bağlayıcı protein olan, Calbindin-D28k, insan gastrik mukozasında (37) morfolojik olarak somatostatin ve ECL hücrelerine benzeyen hücrelerde immunohistokimyasal olarak yapılan çalışmalar sonucunda ışık mikroskopik olarak belirlenmiştir.

Bu araştırmanın amacı, yukarıdaki literatürlerin ışığı altında ergin ratların bazı endokrin bezlerinde (tiroid, paratiroid, hipofiz ve adrenal medulla), mide, bağırsak ve pankreasındaki yaygın endokrin hücrelerinde calbindin-D28k'nın dağılımını immunohistokimyasal yöntemlerle belirlemektir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Elazığ Hayvan Hastalıkları ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen 20 adet ergin rat kullanıldı. Diethyl ether ile genel anestezi altında hayvanların tiroid, paratiroid hipofiz, adren, ince barsak, kalın bağırsak, pankreas ve midelerinden dokular alındı. Bu dokular parafin ve kryostat kesitler için uygun prosedürlerden geçirildi.

Parafin Kesitler: Alınan doku örnekleri, fosfat tamponu (phosphate buffer saline-PBS) ile hazırlanan % 10' luk formaldehit (pH 7,2), solusyonunda 24 saat tespit edildi. Bunu takiben 24 saat çeşme suyunda yıkandı. Daha sonra bu dokular %70, 80, 96 I, 96 II, 100 I, 100 II'lik alkol serilerinden (herbirinde yarım saat) ardından xylol I ve xylol II (20'şer dakika) serisinden geçirilerek 45C°'lik etüvde önce xylol-parafin karışımında 45 dakika, sonra üç ayrı parafin serisinde de birer saat bekletilerek parafin bloklar hazırlandı. Bu bloklardan mikrotomda 4-5 µ kalınlığında krom alüm-jelatinle kaplı lamlara kesitleri alındı.

Kryostat Kesitler: Kryostat kesit için alınan dokular %4'lük formaldehit ve sodyum cacodylate tamponu, (0.1 M, pH 7.2) karışımında 48 saat tespit edildi. Sonra %20 sukroz içeren 0.1M sodyum cacodylate (pH 7.2) solusyonunda 4C°'de 24 saat bekletildi. Kesit için dokular birer birer yuvarlak plaklara konuldu. Üzerleri creomatrix denilen jel (O.C.T compound) ile kapatılarak -60 C°'de donduruldu ve kryostat mikrotomunda (6-7 µ), krom alüm-jelatinle kaplı lamlara kesitleri alındı.

Daha sonra ise immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak boyama gerçekleştirildi.

4.1. İmmunohistokimyasal Yöntem

İmmunohistokimyasal incelemeler için immunoperoksidaz metodlarından streptavidin horserodish peroksidaz (ABC) ve peroksidaz anti-peroksidaz (PAP) teknikleri kullanıldı.

Antijeniteyi artırmak ve parafini gidermek için kesitler herbirinde 2'şer dakika olmak üzere xylol ve alkol serilerinden (xylol I, xylol II; % 100 alkol I, %100 alkol II,% 100 alkol III, % 70 alkol) geçirildi. Daha sonra, endojen peroksidaz aktivitesini azaltmak için kesitler metanolle hazırlanmış % 0,08 hidrojen peroksidaz (H₂O₂) solüsyonunda 5 dakika bekletildi (92).

4.1.1. ABC Tekniği: Kesitler primer antiserum (Mouse anti-Calbindin IgG, mouse anti Glukagon, mouse anti İnsülin-Sigma) ile 16-20 saat 4°C de inkube edildi. Antiserumlar içerisinde % 2.5 sığır serum albumini ve % 0.25 sodyum azid içeren fosfat buffer salin (PBS), pH 7.2 ile 1:500, 1:1000, 1:2000 oranında sulandırıldı. Daha sonra biotinleştirilmiş sekonder antiserum (keçi anti-mouse IgG Sigma) ile ve bunu takiben streptavidin horseradish peroksidaz kompleksi (Dako) ile oda ısında 1'er saat süre ile inkube edildi. Her iki antiserum PBS ile 1:50 oranında seyreltilti. Kesitler her inkübasyon öncesi 30 dk süre ile PBS solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra kesitler glukoz-oksidaz diamin benzidin nikel (GDN) substratına (86) daldırılıp su ile yıkanıp, eozin ile boyandı ve mounting medium ile kapatılarak ışık mikroskobunda incelendi.

4.1.2. PAP Tekniği: Kesitler tavşan poliklonal antiserum (Rabbit anti-calsitonin IgG, Sigma) ile 16-20 saat 4°C'de inkübe edildi. Antiserum içerisinde %2.5 sığır serum albumini ve % 0.25 sodyum azid içeren fosfat buffer salin (PBS), pH 7.2 ile 1:500 oranında seyreltildi. Kesitler daha sonra keçi anti-rabbit IgG (Dako) ile ve bunu takiben tavşan-peroksidaz anti-peroksidaz (PAP) (Zymed) ile oda ısısında 1'er saat süreyle inkübe edildi. Her iki antiserum PBS ile 1:50 oranında sulandırıldı. Kesitler her inkübasyon öncesi 30 dakika süreyle PBS solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra kesitler glukoz-oksidaz diaminobenzen dihidroklorür (DAB) substratına (86) daldırılıp su ile yıkandı ve eozin ile boyanıp ışık mikroskopunda incelendi.

Fotoğraflama işlemleri Nikon marka araştırma mikroskobu yardımıyla yapıldı. Terimlerin yazımında *Nomina Histologica*' dan yararlanıldı (67).

İmmunohistokimyasal reaksiyonun spesifik kontrolü Sternberger (91) tarafından bildirilen metod ile yapıldı.

5. BULGULAR

İmmunohistokimyasal incelemeler sonucunda tiroid, hipofiz ve adren'de calbindin D28k ile pozitif immunoreaktivite gösteren hücreler belirlendi. Midede calbindin-D28k immunoreaktivitesi zayıf olarak gözlemlendi. Bağırsaklar, pankreas ve paratiroidde ise herhangi bir immunoreaktivite gözlenmedi.

Tiroid: Calbindin-D28k yönünden kuvvetli pozitif immunoreaktivite gösteren hücreler ergin rat tiroidinde oldukça fazlaydı (Şekil 1, 2). Bu hücreler folliküler hücrelerin bazal yüzeyine yakın olarak yerleşmiş ve çok sayıda salgı granülüne sahip olan parafolliküler hücrelerdi (endocrinocytus parafollicularis). Parafolliküler bölgede küçük gruplar halinde yada bir-iki tane immunoreaktivite gösteren parafolliküler hücreler seçilmekteydi (Şekil 2). Bunlar genellikle tiroid loblarının merkezi kısımlarında yerleşmişlerdi. Bu hücrelerde calbindin immunoreaktivitesi sitoplazmada kuvvetli ve çekirdekte ise zayıf olarak gözlemlendi. Tiroid bezinin follikül epitel hücrelerinde ve kolloidde ise hiçbir immunoreaktiviteye rastlanmadı (Şekil 3).

Tiroidin parafolliküler bölgesindeki çok sayıda C hücrelerinde rabbit anti-calsitonin immunoreaktivitesi gözlemlendi (Şekil 5, 6). Bunlar calbindin immunoreaktivitesi gösteren hücreler ile aynı görünümde idi.

Paratiroid: Tiroid bezinin cranial kısmında yer alan paratiroid bezinde calbindin-D28k immunoreaktivitesi görülmedi (Şekil 4). Yine paratiroid bezinde calsitonin immunoreaktivitesine de rastlanmadı.

Hipofiz: Hipofizde calbindin D28k immunoreaktivitesine anterior (adenohypophysis) lobda rastlandı (Şekil 7, 8). İmmunoreaktivite gösteren

hücreler anterior lobun tamamına dağılmıştı. Posterior (neurohypophysis) lobta calbindin-D28k immunoreaktivitesine sinir tellerinde rastlandı (Şekil 9). İntermedier lobta ise herhangi bir immunoreaktivite görülmedi (Şekil 9).

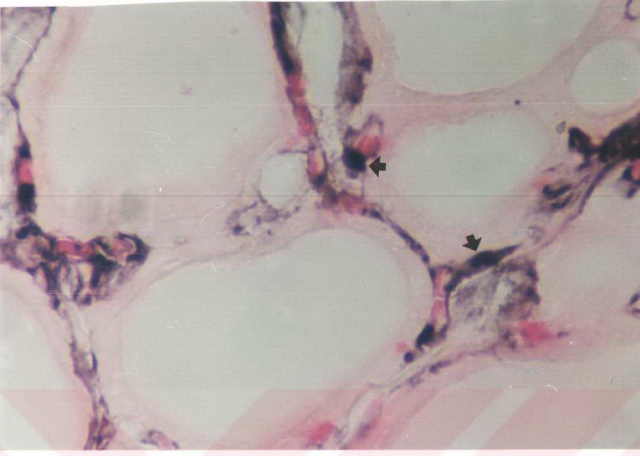
Adren: Adren medullasındaki kromaffin hücreler calbindin D28k ile pozitif reaksiyon verdi. Parafin kesitlerinin immunohistokimyasal boyamasında sadece kromaffin hücreler pozitif reaksiyon verirken (Şekil 10), kryostat kesitlerinin boyanmasında ise kromaffin hücrelerle (Şekil 11, 12) beraber sinir tellerinin de (Şekil 13) immunoreaktivite gösterdiği görüldü. Adren korteksinde ise herhangi bir immunoreaktiviteye rastlanmadı.

Mide: Midede calbindin yönünden pozitif endokrin hücrelere parafin kesitlerinde az da olsa rastlandı (Şekil 14). Bunlar midenin oksintik mukozasında bulunan ECL (enterochromaffin- like-cells) hücreleri ile karakterize idi. Midede calbindin ile seçici olarak reaksiyona giren immunoreaktif hücrelere kryostat kesitlerinde daha çok sinir tellerinde rastlandı (Şekil 15,16,17). Bunlar ince uzun görünümde idi. Pylorusa ait mukozada calbindin immunoreaktivitesine rastlanmadı.

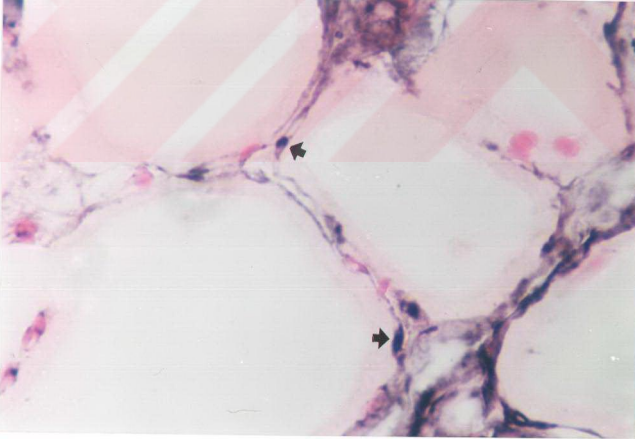
Pankreas: Calbindin-D28k IgG ile yapılan immunohistokimyasal boyamada pankreasın endokrin bölümünü oluşturan Langerhans (pars endocrina pancreatis) adacıklarında immunoreaktiviteye rastlanmadı (Şekil 18). Aynı şekilde ekzokrin bölümde (pars exocrina pancreatis) de herhangi bir immunoreaktivite gözlenmedi (Şekil 19).

Pankreasın Langerhans adacığının mouse anti glukagon IgG ve mouse anti insülin IgG ile immunohistokimyasal olarak boyanması sonucunda immunoreaktiviteye rastlandı (Şekil 20, 21). Langerhans adacığındaki glukagon salgılayan hücreler (A hücreleri) daha çok adacığın periferinde koyu kahverenginde kuvvetli boyamalar gösterdi. İnsülin salgılayan hücreler (B hücreleri) ise daha çok sentral bölgede yerleşmişti. Langerhans adacığının insülin ile boyanmasında glukagona göre daha zayıf bir immunoreaktivite gözlemlendi.

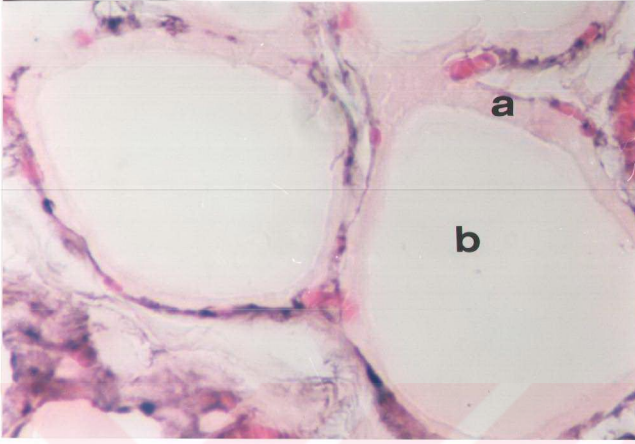
Bağırsaklar: İnce ve kalın bağırsakların endokrin hücrelerinde calbindin-D28k yönünden herhangi bir immunoreaktiviteye rastlanmadı (Şekil 22, 23). Kryostat kesitlerinde mukozada sinir tellerinde orta derecede pozitiflik görüldü.



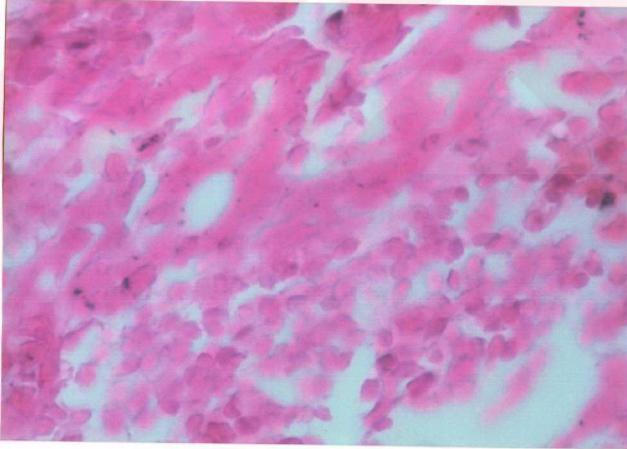
Şekil 1: Rat tiroidinin parafoliküler hücrelerinde calbindin-D28k immunoreaktivitesi (oklar). X 200



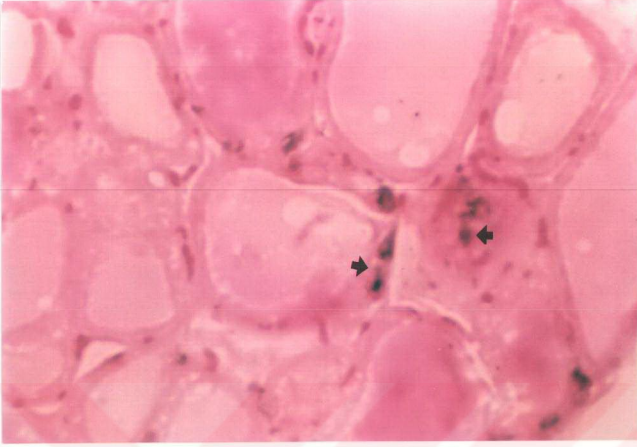
Şekil 2: Rat tiroidinin parafoliküler hücrelerinde calbindin-D28k immunoreaktivitesi (oklar). X 200



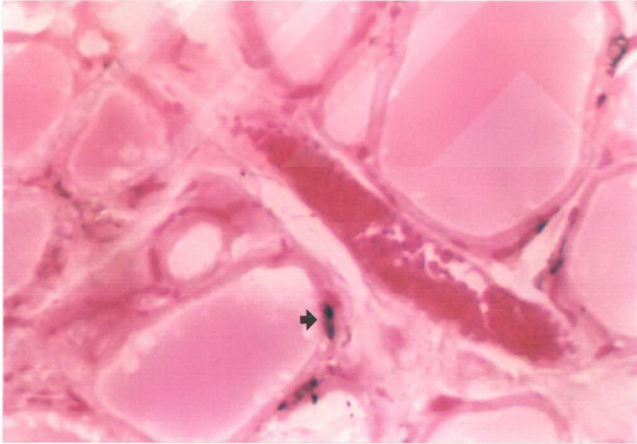
Şekil 3: Rat tiroidinin follükül epitel hücreleri (a) ile kolloidde (b) calbindin-D28k immunoreaktivitesi görülmemekte, X 200



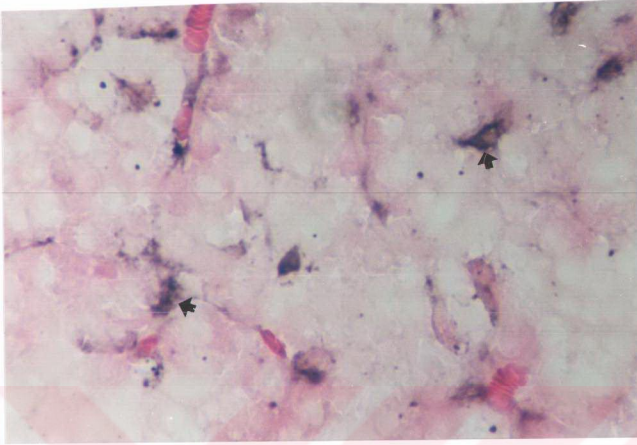
Şekil 4: Rat paratiroidinde calbindin-D28k immunoreaktivitesi görülmemekte, X 200



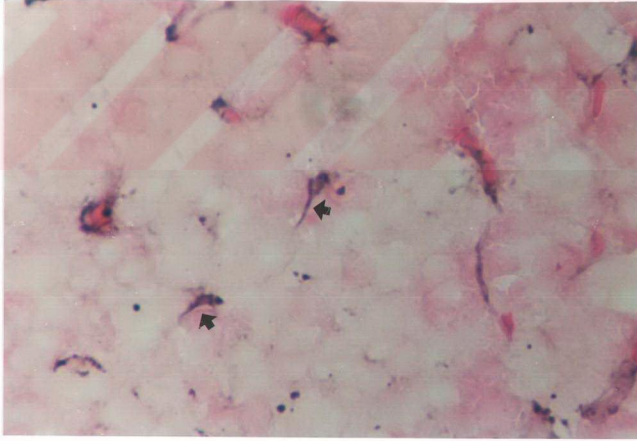
Şekil 5: Rat tiroid parafoliküler hücrelerinde calsitonin immunoreaktivitesi (oklar). X 200



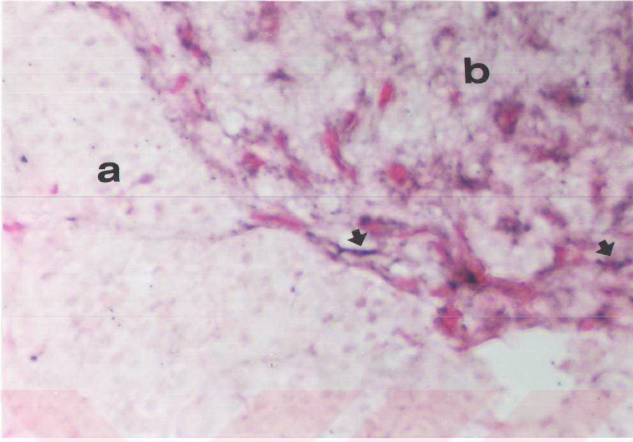
Şekil 6: Rat tiroid parafoliküler hücresinde calsitonin immunoreaktivitesi (ok). X 200



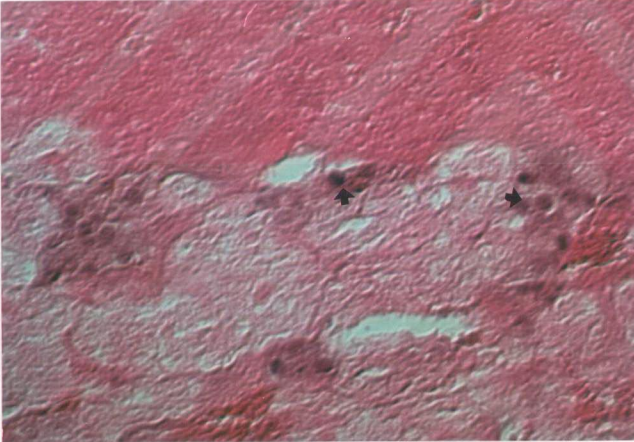
Şekil 7: Rat adenohipofizinde calbindin-D28k immunoreaktivitesi (oklar). X 200



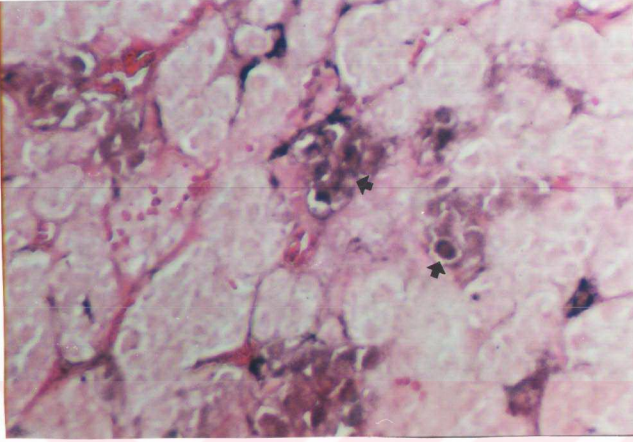
Şekil 8: Rat adenohipofizinde calbindin-D28k immunoreaktivitesi (oklar). X 200



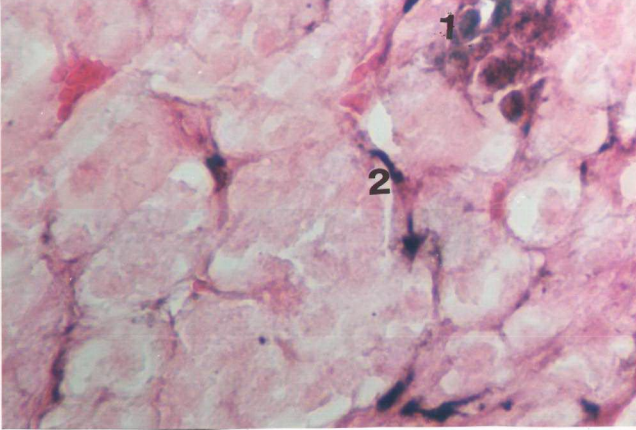
Şekil 9: Rat hipofizinin intermedier lobunda (a) calbindin-D28k immunoreaktivitesi görülmekte. Posterior lobunda (b) sinir tellerinde (oklar) calbindin-D28k immunoreaktivitesi X 100



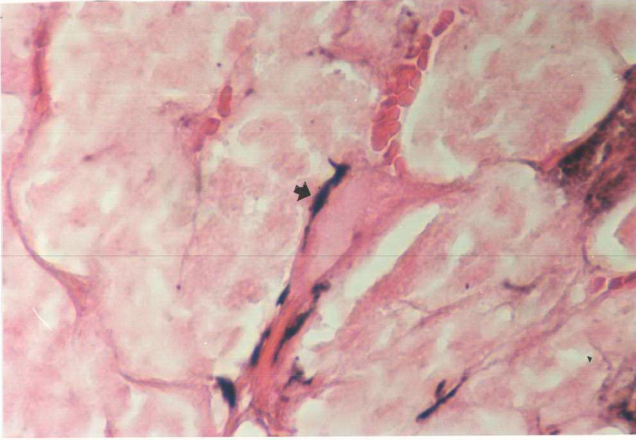
Şekil 10: Rat adrenal medullasındaki kromaffin hücrelerinde calbindin-D28k immunoreaktivitesi (oklar). X 100



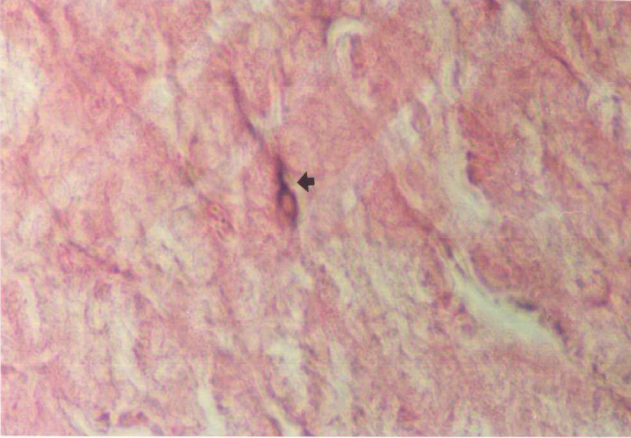
Şekil 11: Rat adrenal medullasındaki kromaffin hücrelerinde calbindin-D28k immunoreaktivitesi (oklar). X 100



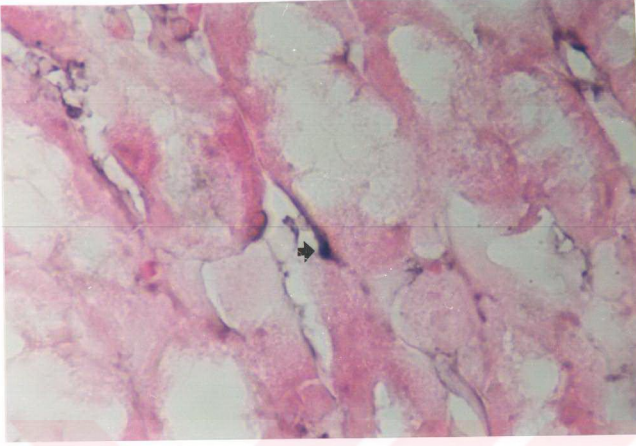
Şekil 12: Rat adrenal medullasının kromaffin hücrelerinde (1) ve sinir tellerinde (2) calbindin-D28k immunoreaktivitesi. X 200



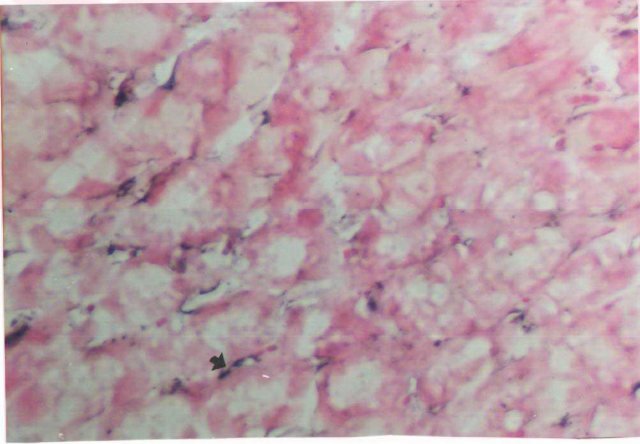
Şekil 13: Rat adrenal medullasının sinir tellerinde calbindin-D28k immunoreaktivitesi (ok). X 200



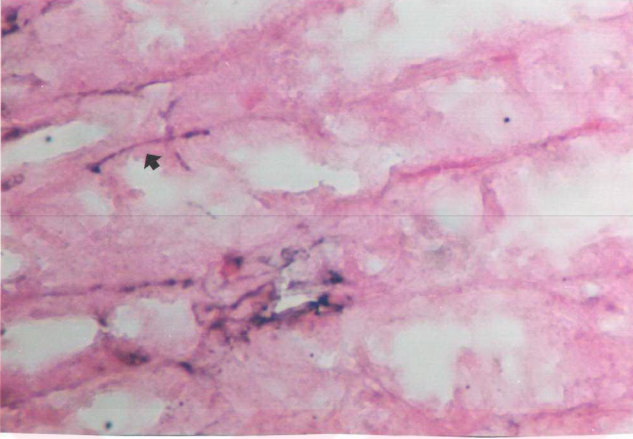
Şekil 14: Rat mide fundusunda calbindin-D28k immunoreaktivitesi (ok). X 200



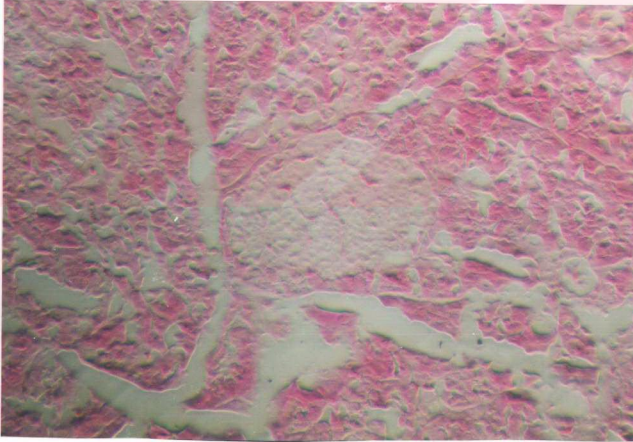
Şekil 15: Rat mide fundusunun sinir tellerinde calbindin-D28k immunoreaktivitesi (ok). X 200



Şekil 16: Rat mide fundusunda sinir tellerindeki calbindin-D28k immunoreaktivitesi (ok). X 100



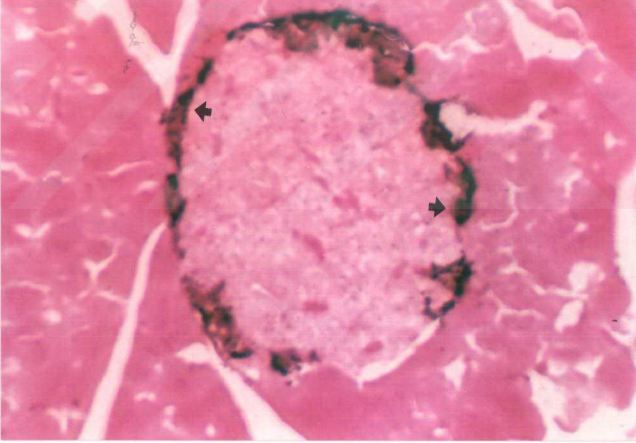
Şekil 17: Rat midesinin sinir tellerinde calbindin-D28k immunoreaktivitesi (ok). X 200



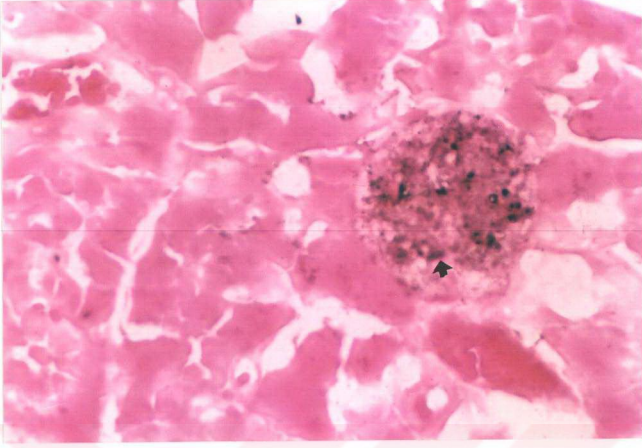
Şekil 18: Rat endokrin pankreasında calbindin-D28k immunoreaktivitesi görülmemekte, X 50



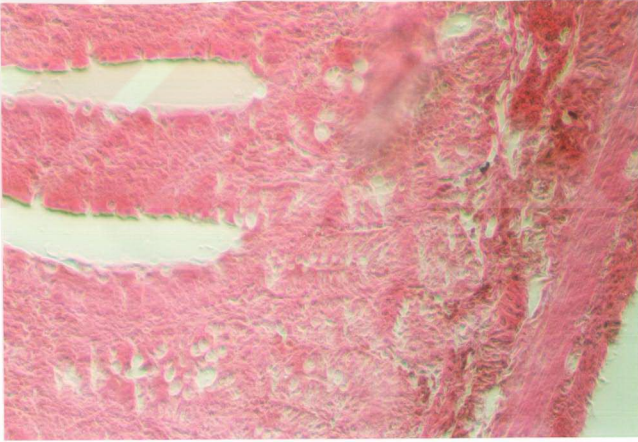
Şekil 19: Rat ekzokrin pankreasında calbindin-D28k immunoreaktivitesi görülmemekte, X 200



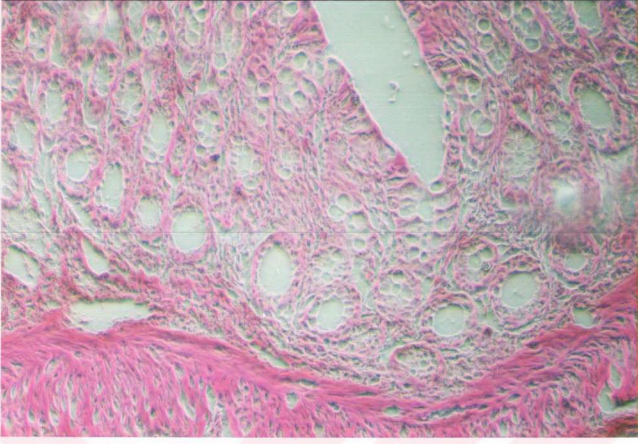
Şekil 20: Rat pankreasının Langerhans adacığında glukagon immunoreaktivitesi (oklar). X 100



Şekil 21: Rat pankreasının Langerhans adacığında insülin immunoreaktivitesi (ok). X 50



Şekil 22: Rat duodenumunda calbindin-D28k immunoreaktivitesi görülmemekte, X 100



Şekil 23: Rat kalın bağırsağında calbindin-D28k immunoreaktivitesi görülmemekte, X 100

6. TARTIŞMA

Calbindin-D28k sitosolik kalsiyum bağlayıcı protein olup ilk kez tavukların intestinal mukozasından izole edilmiştir (103). Kanatlı bağırsağındaki epiteliyal lokalizasyonuna ilaveten calbindin-D28k memeliler ve kuşların periferel ve sentral sinir sisteminde de bulunmuştur. Buralarda calbindin-D28k'nın intrasellüler kalsiyum tamponu gibi işlev gördüğüne inanılmaktadır. Bu tampon etkisinin yüksek uyarıma bağlı olarak hücre içinde artmış olan kalsiyumun nörotoksik etkisinden hücreleri koruduğu düşünülmektedir (21, 30, 61, 87).

Sunulan çalışmada ergin ratların tiroid, hipofiz ve adren medullasındaki yaygın endokrin hücrelerinde calbindin-D28k immunoreaktivitesi görülmekle beraber paratiroid, pankreas ve bağırsaklarda herhangi bir calbindin immunoreaktivitesine rastlanmamıştır. Mide de ise calbindin yönünden pozitif immunoreaktivite gösteren hücrelerin az sayıda olduğu belirlenmiştir.

Tiroidde parafoliküler hücrelerin hipokalsemik bir hormon olan kalsitoninin salgılanmasından sorumlu olduğu bildirilmiştir (29). Yapılan araştırmada immunohistokimyasal boyama sonucunda rat tiroidinin follikül epitelleri arasında kalan parafoliküler bölgesindeki kalsitonin salgılayan C hücrelerinde calbindin-D28k immunoreaktivitesinin yoğunluğunun oldukça fazla olduğu belirlenmiştir. Calbindin'in benzer şekilde tiroid parafoliküler hücrelerdeki dağılımı kuş, kedi, köpek (15), kobay (15, 94, 116) ve ratda (2, 15) belirlenmiştir.

Zabel ve ark. (113) ise rat tiroidinin parafoliküler hücrelerinde kalsiyum bağlayıcı proteine rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Bu durum yapılan diğer çalışmalar (2, 15) ve bu çalışma ile tezatlık göstermektedir. Bunun nedeni belkide Zabel ve ark. (113)'nin yaptıkları çalışmada kullandıkları immunoglobulinin dokudaki antijen ile çapraz reaksiyona girememesinden kaynaklanıyor olabilir.

İmmunoreaktivite açısından calbindin ile yakından benzerliği olan spot 35 protein'in, kobay, kedi ve köpek (44) ve rat (2) tiroidinin parafoliküler hücrelerinde yer aldığı bildirilmiştir.

Tiroid parafoliküler hücrelerinden kalsitonin hormonunun salgılanması üzerine Ca^{+2} iyonları, Vit D³, biyojenik aminler ve bazı polipeptid hormonları etki eder (28, 32, 56, 116). Sunulan ve daha önce yapılan benzeri çalışmalarda (2, 44, 15, 94, 116) tiroidin parafoliküler hücrelerinde calbindin-D28k ve spot 35 gibi kalsiyum bağlayıcı proteinlerin varlığının tespit edilmesi bu proteinlerin hücrelerdeki kalsiyum iyonlarının modülasyonu üzerine etki ederek parafoliküler hücrelerden kalsitoninin sentez ve salınımı ile ilişkili mekanizmada rol oynayabileceği görüşünü ortaya çıkarabilmektedir. Kanatlılarda yapılan bir çalışmada calbindin-D28k ile kalsitoninin kolokalizasyonu ultimobranchial bez hücrelerinde tespit edilmiştir (97). Tiroid parafoliküler hücrelerinde kalsiyum bağlayıcı proteinler ve kalsitoninin aynı anda ve aynı hücrelerde immunohistokimyasal yöntemlerle belirlenmesinin bu görüşü destekleyeceği kanısındayız.

Hozumi ve ark. (44) kobay, köpek ve kedi paratiroidlerinde calbindin immunoreaktivitesine rastlamamışlardır. Yapılan çalışmada da rat paratiroidinde calbindin immunoreaktivitesinin belirlenmemesi bu çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Adrenin medullasındaki kromaffin hücrelerinde kalsiyum bağlayıcı protein olan calbindin, rat (4, 15, 24), fare (4, 24), kobay, kedi, köpek ve insanda (15) tespit edildiği bildirimleri yapılan bu araştırma ile uyum halindedir.

Fare ve rat adren medullasında calbindin-D28k immunoreaktivitesinin noradrenalin içeren hücrelerde görülmesine karşın adrenalin içeren hücrelerde görülmediği bildirilmiştir (4, 24).

Calbindin ile yakından benzerliği olan spot 35 protein (107-109) immunoreaktivitesi rat adrenal medullasında belirlenmiştir (55). Bunun calbindin-D28k ile yapılan çalışma ile büyük oranda benzerlik gösterdiği söylenebilir.

Adren medullasındaki kromaffin hücrelerinin salgı aktiviteleri postgangliyonik sempatik innervasyon ile düzenlenen postgangliyonik sempatik nöronlar ile modifiye edilmektedir (51). Bu kromaffin hücrelerinin uyarılmasında rol oynayan kalsiyum iyonlarının (38) modülasyonu üzerine calbindin-D28k veya spot 35 gibi kalsiyum bağlayıcı proteinlerin etkili olabileceği düşünülmektedir. Çünkü calbindin-D28k'nın sinir hücrelerinde intrasellüler kalsiyum tamponu gibi fonksiyon gördüğüne inanılmaktadır. Bu tampon etkisi ile yüksek uyarıma bağlı olarak hücre içerisinde artmış olan kalsiyumun nörotoksik etkisinden hücreleri koruduğu düşünülmektedir (21, 30, 61, 87).

Hipofizin anterior lobunda calbindin immunoreaktif hücrelerinin varlığı rat (1, 15, 82, 93), kedi ve insanda (15) bildirilmiştir. Yine köpek ve kobay hipofizinin anterior lobunda calbindin-D28k ile yakından benzerliği olan spot 35 calbindin immunoreaktivitesi belirlenmiştir (44). Yapılan çalışmada da calbindin-D28k immunoreaktivitesinin anterior lobda belirlenmesi bu çalışmalar ile uyumludur.

Hipofizin endokrin hücrelerinde kalsiyum aksiyon potansiyelinin tespit edilmiş olması (38) calbindin-D28k'nın hipofizin endokrin hücrelerinde de nöronlarda olduğu gibi kalsiyum tamponu olarak görev yaptığı görüşünü akla getirebilmektedir.

Abe ve ark. (1) yaptıkları çalışmada spot 35 calbindinin rat anterior hipofizinde TSH hücrelerinde dağılımını tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada Sar ve ark. (82), kalsiyum düzenleyici hormon olan $1,25\text{OH}_2\text{D}_3$ için seçici bir immunoreaktivitenin rat anterior hipofizinin TSH hücrelerinde bulunduğunu bildirmiştir. Calbindin-D28k ile TSH'nın aynı hücrelerde kolokalizasyonunun belirlenmesi ile bu protein ile TSH hormonu arasındaki ilişki ortaya konulabilir.

Miyata ve ark. (63), yaptıkları çalışmada rat hipofizinin posterior lobunda calbindin-D28k ile calretin immunoreaktivitesine sinir tellerinde rastladıklarını ve bunun sinir tellerinin sekretorik aktivite periyoduna bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da rat hipofizinin posterior lobunda calbindin-D28k immunoreaktivitesine sinir tellerinde rastlanılmıştır.

Rat pankreasının endokrin bölümünde bazı kalsiyum bağlayıcı proteinler tespit edilmekle birlikte (13, 50, 58, 64, 75, 76, 100) sadece birkaç çalışmada calbindin-D28k immunoreaktivitesi belirlenmiştir (50, 13). Fakat sunulan çalışmada pankreasın endokrin bölümünde calbindin-D28k immunoreaktivitesi gözlenmemiştir. Bu zıtlık, Johnson ve ark.'nın (50) antijeniteyi arttırmak için dokuya uyguladıkları farklı uygulamalarından veya Bourlon ve ark.'nın (13) kullandıkları immunoglobulin farklılığından kaynaklanabilir.

Sunulan çalışmada rat pankreasının endokrin bölümünde insülin ve glukagon immunoreaktivitesi gözlemlenmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda insülin ve glukagonun kalsiyum metabolizması veya homeostazis ile ilgili olduğu bildirilmiştir (12, 25). Bu durum rat pankreasının endokrin bölümündeki kalsiyum modülasyonunun calbindin-D27k gibi diğer kalsiyum bağlayıcı proteinler (58, 64, 75, 76, 100) veya insülin ile glukagon tarafından düzenlendiğini akla getirmektedir.

Gastrik ECL hücreleri hipokalsemik madde olan histamini üretmektedir ve gastrine karşı oldukça duyarlı olan bu hormon ya C hücrelerinden kalsitonin salgılayarak veya gastrik oksintik mukozada bilinmeyen hedefler üzerine etki ederek hipokalsemiyi oluşturduğu bilinmektedir (18, 39, 40, 53, 83, 89).

İnsan mide fundusundaki mukozal hücrelerinde calbindin içeren hücrelerin bulunması (102), memelilerin midesinin oksintik mukozasındaki enterokromaffin hücrelerinin (ECL) yer aldığı belirlenmesi (39, 88) ve rat, kobay, kedi ve köpek mide mukozasında ECL hücrelerinde calbindin'in az sayıda

bulunması ve mide pylorusunda herhangi bir immunoreaktivite gözlenmemesi araştırma bulguları ile paralellik göstermektedir. Araştırmada kryostat kesitlerinde daha çok sinir tellerinde calbindin-D28'ya rastlanılmıştır.

Taylor ve Inpanbutr (98) kanatlılarda gittikçe artan konsantrasyonlarda $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ verilmesinden hemen sonra intestinal hücrelerin nükleoluslarında yüksek konsantrasyonda calbindin-D28k bulunduğunu gözlemlemiştirlerdir. Bu sonuçlara göre intestinal calbindin transsellüler kalsiyumun nükleer düzenleyicisi olarak fonksiyon gördüğüne inanılmaktadır (98, 101). Rat bağırsaklarında calbindin-D28k immunoreaktivitesi çok nadir olarak gözlemlenmiş (15, 80) yada hiç görülmemiştir (15). Sunulan çalışmada da calbindin-D28k immunoreaktivitesi ince ve kalın bağırsaklarda gözlenmemiştir. Bu durum bazı araştırmacılarında bildirdiği gibi (59, 96) calbindin-D9k'nın memeli bağırsağında, kanatlı bağırsağındaki calbindin-D28k ile yer değiştirmesinden dolayı olabilir.

Yapılan çalışmada, paratiroid, bağırsaklar ve pankreasın endokrin hücrelerinde spesifik bir calbindin-D28k immunoreaktivitesine rastlanmadı. Bununla beraber, calbindin-D28k immunoreaktivitesi tiroidin parafoliküler hücrelerinde, hipofizde ve adrende gözlemlendi. Midede ki endokrin hücrelerde çok zayıf immunoreaktivite gözlemlendi. Dolayısı ile calbindin-D28k, tiroidin parafoliküler hücreleri, adrenal medullanın kromaffin hücreleri, hipofiz ön lobunun endokrin hücreleri ile mide fundusunun gastric ECL hücreleri üzerine nöronlarda olduğu gibi "intracellüler Ca tamponu" gibi etki gösteriyor olabilir. Ayrıca pankreas ile bağırsaklarda ise calbindin-D28k'nın olmaması kalsiyum

modulasyonunun pankreasta calbindin-D27k, bağırsaklarda ise calbindin-D9k gibi farklı kalsiyum bağlayıcı proteinler tarafından düzenleniyor olduğu görüşünü akla getirebilir.



7. KAYNAKLAR

1. Abe H, Amano O, Yamakuni T, Takahashi Y, Kondo H. (1990). Localization of Spot 35-Calbindin (Rat Cerebellar Calbindin) in the Anterior Pituitary of the Rat: Developmental and Sexual Differences. *Arch Histol Cytol.* 53 (5): 585-591.
2. Abe H, Watanabe M, Kondo H. (1992). Transient Appearance of Ca-Binding Protein (Spot 35-Calbindin) in Bronchial Epithelial Cells, Thyroid Parafollicular Cells and Thymic Epithelial Cells during the Development of Rats. *Histochemistry.* 97(2): 155-160.
3. Alumets J, Hakanson R, Lundqvist G, Sundler F, Thorell J. (1980). Ontogeny and Ultrastructure of Somatostatin and Calcitonin Cells in the Thyroid Gland of the Rat. *Cell Tissue Res.* 206(2): 193-201.
4. Anderson C R, Penkethman S L, Howe P R , Murphy S M. (2000). Rodent Noradrenergic Chromaffin Cells Contain Calbindin D28K Immunoreactivity. *Neuroreport.* 11(6): 1119-1202.
5. Antal M, Freund T F, Polgar E. (1990). Calcium Binding Proteins, Parvalbumin and Calbindin D28k İmmunoreaktive neurons in the rat Spinal Cord and Dorsal Root Ganglia: A Light and Electron microscopic Study. *J Comp Neurol.* 295: 467-484.
6. Arnold B M, Kovacs K, Murray T M. (1976). Cellular Localization of Intestinal Calcium Binding Protein in Pig Duodenum. *Digestion.* 14(1):77-84.
7. Axelsson J, Hakanson R, Rosengren E, Sundler F. (1988). Hypergastrinemia İnduced by Acid Blockade Evokes Enterochromaffin-Like (ECL) Cell Hyperplasia in Chicken, Hamster and Guinea Pig Stomach. *Cell Tissue Res.* 254: 511-516.
8. Baimbridge K G, Celio M R, Rogers J H.(1992). Calcium-Binding Proteins in the Nervous System. *Trends Neurosci.* 15(8): 303-308.
9. Baimbridge K G, Miller J J, Parkers C O. (1982). Calcium- Binding Protein Distribution in the Rat Brain. *Brain Res.* 239(2): 519-525.
10. Bazzi M D, Nelsestuen G L. (1991). Proteins that Bind Calcium in a Phospholipid- Dependent Manner. *Biochemistry* 30(4): 971-979.
11. Billaudel B, Labrijii-Mestaghanmi H, Sutter B C, Malaisse W J. (1988). Vitamin D and Pancreatic Islet Function. II. Dynamics of Insulin Release and Cationic Fluxes. *J Endocrinol Invest.* 11(8): 585-593.
12. Birge S J, Avioli L V. (1969). Glucagon-Induced Hypocalcemia in Man. *J Clinic Endocrinol Metab.* 29(2): 213-218.
13. Bourlon P M, Faure-Dussert A, Billaudel B, Sutter B C , Tramu G, Thomasset M. (1996). Relationship between Calbindin- D28K Levels in the A and B Cells of the Rat Endocrine Pancreas and Secretion of Insulin and Glucagon: Influence of Vitamin D₃ Deficiency and 1,25 Dihydroxyvitamin D₃. *J Endocrinol.* 148(2): 223-232.

14. Buchan A M. (1991). Neurofilament M and Calbindin D_{28k} are Present in Mutually Exclusive Subpopulations of Enteric Neurons in the Rat Submucous Plexus. *Brain Res.* 538(1): 171- 175.
15. Buffa R, Mare P, Salvatore M, Solcia E, Furness J B, Lawson D E. (1989). Calbindin 28kDa in Endocrine Cells of Known or Putative Calcium- Regulating Function. Thyro-Parathyroid C Cells, Gastric ECL Cells, Intestinal Secretin and Enteroglucagon Cells, Pancreatic Glucagon, Insulin and PP Cells, Adrenal Medullary NA Cells and Some Pituitary (TSH) Cells. *Histochemistry.* 91(2): 107-113.
16. Capella C, Vassallo G, Solcia E. (1971). Light and Electron Microscopik Identification of the Histamine- Storing Argyrophil (ECL) Cell in Murine Stomach and of its Equivalent in Other Mammals. *Z Zellforsch.* 118: 68-84.
17. Carafoli E. (1987). Intracellular Calcium Homeostasis. *Ann Rev Biochem.* 56: 395-433.
18. Care A D, Bruce J B, Boelkins J, Kenny A D, Conaway H, Anast C S. (1971). Role of Pancreozymin-Cholecystokinin and Structurally Related Compounds as Calcitonin Secretogogues. *Endocrinology.* 89(1):262-271.
19. Carr P A, Yamamoto T, Karmy G, Baimbridge K G, Nagy J I. (1989). Parvalbumin is Higly Colocalized with Calbindin D 28k and rarely with Calcitonin Gene-Related Peptide in Dorsal Root Ganglia Neurons of Rat. *Brain Res.* 497: 163-170.
20. Chertow B S, Sivitz W I, Baranetsky N G, Cordle M B, DeLuca H F. (1986). Islet Insulin Release and Net Calcium Retention in vitro in Vitamin D Deficient Rats. *Diabetes.* 35(7): 771-775.
21. Christakos S, Gabrielides C, Rhoten W B. (1989). Vitamin D-Dependent Calcium Binding Proteins: Chemistry, Distribution, Functional Considerations, and Molecular Biology. *Endocr Rev.* 10(1): 3-26.
22. Christakos S, Norman A W. (1979). Studies on the Mode of Action of Calciferol. Evidence for a Spesific High Affinity Binding Protein for 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ in Chick Kidney and Pancreas. *Biochem Biophys Res Commun.* 89(1):56-63.
23. Cimini V, Isaacs K R, Jacobowitz D M. (1997). Calretin in the Rat Pituitary: Colocalization with Thyroid-Stimulating Hormone. *Neuroendocrinology.* 65: 179-188.
24. Clark S A, Stumpf W E, Bishop C W, DeLuca H F, Park D H, Joh T H. (1986). The Adrenal: A New Target Organ of the Calcitropic Hormone 1,25- Dihydroxyvitamin D₃ .*Cell Tissue Res.* 243(2): 299-302.
25. Clark S A, Stumpf W E, Sar M, DeLuca H F, Tanaka Y. (1980). Target Cells for 1,25 - Dihydroxyvitamin D₃ in the Pancreas. *Cell Tissue Res.* 209(3): 515 –520.
26. Clark S A, Stumpf W E, Sar M, DeLuca H F. (1987). 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ Target Cells in Immature Pancreatic Islets. *Am J Physiol.* 253(1pt): E99-E105.

27. Clark S A, Stumpf W E, Sar M. (1981). Effects of 1,25 Dihydroxyvitamin on Insulin Secretion. *Diabetes*. 30(5): 382-386.
28. Cooper C W, Borosky S A, Peng T C. (1985). Secretion of Calcitonin Gene-Related Peptide from Baby Rat Thyroid Glands in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med*. 180: 562-566.
29. Copp D H. (1964). Parathyroid, Calcitonin and Control of Plasma Calcium. *Recent Prog Horm Res*. 20:59-88.
30. Darwin L C. (1991). Ca²⁺ Binding Proteins as Neuronal Markers. *Neurosci Facts*. 2:1-4.
31. Dencker L, Tjalve H. (1973). Distribution of Vitamin D₃: Evidence of Accumulation in Renal Proximal Tubuli and Thyroid Parafollicular Cells. *Experientia*. 29(6): 719-722.
32. Endo T, Saito U T, Onaga T. (1988). Effects of Somatostatin and Serotonin on Calcitonin Secretion from cultured Rat Parafollicular Cells. *Acta Endocrinol*. 117: 214-218.
33. Ericson L E, Sundler F. (1984). Thyroid Parafollicular Cells; in Motta, *Ultrastructure of Endocrine Cells and Tissues*. pp. 276-285 (Nijhoff, Boston).
34. Feher J J. (1983). Facilitated Calcium Diffusion by Intestinal Calcium-Binding Protein. *Am J Physiol*. 244: C303-307.
35. Fontaine O, Matsumoto T, Goodman D B, Rasmussen H. (1981). Liponomic Control of Ca⁺² Transport: Relationship to Mechanism of Action of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci USA*. 78(3): 1751-1754.
36. Furness J B, Keast J R, Pompolo S, Bornstein J C, Costa M, Emson P C, Lawson D E. (1988). Immunohistochemical Evidence for the Presence of a Calcium-Binding Proteins in Enteric Neurons. *Cell Tissue Res*. 252(1): 79-87.
37. Furness J B, Padbury R T A, Baimbridge K G, Skinner J M, Lawson D E. (1989). Calbindin Immunoreactivity is a Characteristic of Enterochromaffin-Like Cells (ECL Cells) of the Human Stomach. *Histochemistry*. 92(5): 449-451.
38. Hagiwara S, Byerly. (1981). Calcium Channel. *Ann Rev Neurosci*. 4: 69-125.
39. Hakanson R, Bottcher G, Ekblad E, Panula P, Simonsson M, Dohlsten M. (1986). Histamine in Endocrine Cells in the Stomach. A Survey of Several Species Using a Panel of Histamine Antibodies. *Histochemistry* 86(1): 5-17.
40. Hakanson R, Larsson LI, Liedberg G, Oscarson J, Sundler F, Vang J. (1976). Effects of Antrectomy or Portacaval Shunting on the Histamine-Storing Endocrine-Like Cells in Oxyntic Mucosa of Rat Stomach: A Fluorescence Histochemical, Electron Microscopic and Chemical Study. *J Physiol*. 259(3): 785-800.
41. Hall A K, Norman A W. (1991). Acute Actions of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ upon Chick Pancreatic Calbindin-D28K. *Biochem and Biophys Res Commun*. 176(3): 1057-1061.

42. Hosomi J, Hosoi J, Abe E, Suda T, Kurokoi T. (1983). Regulation of Terminal Differentiation of Cultured Mouse Epidermal Cells by 1-Alpha, 25-Dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology*. 113: 1950-1957.
43. Houghton P E, Buchan A M, Challis J R. (1992). Ontogeny of the Distribution and Colocalization of Calbindin D28k within Neural and Endocrine Cells of the Gastrointestinal Tract of Fetal and Neonatal Sheep. *Regul Pept*. 37(2): 73-83.
44. Hozumi I, Iwanaga T, Fujita T, Yamakuni T, Takahashi Y. (1986). A Purkinje Cell- Specific Protein (Spot 35 Protein) Showing Wide Distribution in the Endocrine System of Some Mammals. An Immunohistochemical Study. *Acta Histochem Cytochem*. 19(5): 545-553.
45. Inpanbutr N, Taylor A N, Deftos L J. (1987). Calbindin D28k Distribution in Chick Ultimobranchial and Rat Thyroid Glands. In: Norman A W, Vanaman T C, Means A R (eds). *Calcium- Binding Proteins in Health and Disease*. Academic Press, San Diego, pp 609-611.
46. Inpanbutr N, Taylor A N. (1989). Calbindin-D Immunolocalization in Developing Chick Thyroid: A Light and Electron Microscopic Study. *J Histochem Cytochem*. 37 (4): 487-492.
47. Ishida H, Norman A W. (1988). Demonstration of a High Affinity Receptor for 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ in Rat Pancreas. *Mol Cell Endocrinol*. 60(2-3): 109-117
48. Ishida H, seino Y, Seino S, Tsuda K, Takemura J, Nishi S, Ishizuka S, Imura H. (1983). Effect of 1,25-Dihydroxyvitamin on Pancreatic B and D Cell Function. *Life Sci*. 33: 1779-1786.
49. Jande S S, Maler L, Lawson D E. (1981). Immunohistochemical Mapping of Vitamin D-Dependent Calcium-Binding Protein in Brain. *Nature* 294(5843):765-767.
50. Johnson J A, Grande J P, Roche P C, Kumar R. (1994). Immunohistochemical Localization of the 1,25(OH)₂D₃ Receptor and Calbindin D28k in Human and Rat Pancreas. *Am J Physiol*. 267(3pt1): E356-360.
51. Junquera L C, Carneiro J, Kelley R O. (1998). Adrenals, Islets of Langerhans, Thyroid, Parathyroid, Pineal Gland. In: *Basic Histology*. 9th Edt. McGraw-Hill, USA. 387-405.
52. Kadowaki S, Norman A W. (1984). Pancreatic Vitamin D-Dependent Calcium Binding Protein: Biochemical Properties and Response to Vitamin D. *Arch Biochem Biophys*. 233(1): 228-236.
53. Kaplan E L, Norberg H P, Schulak J A, Hill B J. (1976). The Importance of the Stomach in Mediating Histamine-Induced Hypocalcemia in the Rat. *Metabolism*. 25(10):1151-1156.
54. Kawasaki H, Nakayama S, Kretsinger R H. (1998). Classification and Evolution of EF-Hand Proteins. *Biometals*. 11(4): 277-295.
55. Kondo H, Kuramoto H, Iwanaga T, Fujita T. (1985). Cerebellar Purkinje Cell-Specific Protein-Like Immunoreactivity in Noradrenalin-Chromaffin Cells and Ganglion Cells but not in Adrenaline- Chromaffin Cells in the Rat Adrenal Medulla. *Arch Histol Jap*. 48: 421-426.

56. Larsson L I. (1985). Differential Changes in Calcitonin, Somatostatin and Gastrin/Cholecystokinin-Like Immunoreactivities in Rat Thyroid Parafollicular Cells During Ontogeny. *Histochemistry*. 82(2): 121-130
57. Livett B G. (1984). The Secretory Process in the Adrenal Medulla Cells. In: Cantin M (ed). *Cell Biology of the Secretory Process*. Karger, Basel, pp 309-388.
58. Malaisse W J, Blachier F, Pochet R, Manuely Keenoy B, Sener A. (1990). Calmodulin and Calbindin in Pancreatic Islet Cells. *Adv Exp Med Biol*. 269: 127-133.
59. Marche P, Le Guern C, Cassier P. (1979). Immunocytochemical Localization of a Calcium-Binding Protein in the Rat Duodenum. *Cell Tissue Res*. 197(1): 69-77.
60. Matsumoto T, Fontaine O, Rasmussen H. (1981). Effect of 1,25 Dihydroxyvitamin D3 on Phospholipid Metabolism in Chick Duodenal Mucosal Cell. *J Biol Chem* 256(7): 3354-3360.
61. Mattson M P, Rychlik B, Chu C, Christakos S. (1991). Evidence for Calcium-Reducing and Excito-Protective Roles for the Calcium-Binding Protein Calbindin D_{28k} in Cultured Hippocampal Neurons. *Neuron*. 6(1): 41-51.
62. Messenger J P, Furness J B. (1992). Distribution of Enteric Nerve Cells that Project to the Coelic Garglion of the Guinea Pig. *Cell Tissue Res*. 269: 119-132.
63. Miyata S, Nakai S, Kiyohara T, Hatton G I. (2000). Calbindin-D28k and Calretinin in the Rat Posterior Pituitary; Light and Electron Microscopic Localization and Upregulation with Dehydration. *J Neurocytol*. 29(1): 5-17.
64. Morrissey R L, Bucci T J, Empson R N, Lufkin E G. (1975). Calcium Binding Protein: Its Cellular Localization in Jejunum, Kidney and Pancreas. *Proc Soc Exp Biol Med*. 149(1): 56-60.
65. Morrissey R L, Zolock D T, Bucci T J, Bikle D D. (1978). Immunoperoxidase Localization of Vitamin D Dependent Calcium Binding Protein. *J Histochem Cytochem*. 26(8): 628-634.
66. Murer H, Hildmann B. (1981). Transcellular Transport of Calcium and Inorganic Phosphate in the Small Intestine Epithelium. *Am J Physiol*. 240(6): G409-416
67. *Nomina Histologica*, Revised 2nd. Ed. (1992). International Committee on Veterinary Histological Nomenclature and Authorized by the 8th General Assembly of the World Association of Veterinary Anatomists Gent (Belgium).
68. Norman A W, Frankel J B, Heldt A M, Grodsky G M. (1980). Vitamin D Deficiency Inhibits Pancreatic Secretion of Insulin. *Science*. 209(4458): 823-825
69. Norman A W, Roth J, Orci L. (1982). The Vitamin D Endocrine System: Steroid metabolism, Hormone Receptors, and Biological Response (Calcium Binding Proteins). *Endocr Rev*. 3: 331-366.

70. Pasteels J L, Pochet R, Surardt L, Hubeau C, Chirnoaga M, Parmentier M, Lawson D E. (1986). Ultrastructural Localization of Brain "Vitamin D-Dependent" Calcium Binding Proteins. *Brain Res.* 384(2): 294-303.
71. Pearse A G E. (1976). Peptides in Brain and Intestine. *Nature* 262: 92-94.
72. Persechini A, Moncrief N D, Kretsinger R H. (1989). The EF-Hand Family of Calcium-Modulated Proteins. *Trends Neurosci.* 12(11):462-467.
73. Pike J W. (1982). Receptors for 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ in Chick Pancreas: A Partial Physical and Functional Characterization. *J Steroid Biochem.* 16(3): 385-395.
74. Pochet R, Blachier F, Gangji V, Kielbaska V, Due P H, Resibois A. (1990). Calbindin D28k in Mammalian Intestinal Absorptive Cells: Immunohistochemical Evidence. *Biol Cell.* 70(1-2): 91-99.
75. Pochet R, Blachier F, Malaisse M, Parmentier M, Pasteels B, Pohl V, Resibois A, Rogers J, Roman A. (1989). Calbindin- D28 in Mammalian Brain, Retina and Endocrine Pancreas: Immunohistochemical Comparison with Calretinin. *Adv Exp Med Biol.* 255: 435-443.
76. Pochet R, Pipeleers D G, Malaisse W J. (1987). Calbindin D-27kDa: Preferential Localization in Non- B Islet Cells of the Rat Pancreas. *Biol Cell.* 61(3):155-161.
77. Prinz C, Loo D, Scott D, Kajimura M, Helander H, Sachs G. (1993). Histamine Secretion by Rat Enterochromaffin-Like Cells. *AGA.* 16-19.
78. Redecker P, Çetin Y. (1997). Rodent Pancreatic Islet Cells Contain the Calcium-Binding Proteins Calcineurin and Calretinin. *Histochem Cell Biol.* 108(2): 133-139.
79. Resibois A, Rypens F, Pochet R. (1988b). Epithelial and Neuronal Calbindin in Avian Intestine. An Immunohistochemical Study. *Cell Tissue Res.* 251(3):611-620.
80. Resibois A, Vienne G, Pochet R. (1988a). Calbindin D28k and the Peptidergic Neuroendocrine System in Rat Gut: An Immunohistochemical Study. *Biol Cell.* 63: 67-75.
81. Roth J, Bonner-Weir S, Norman A W, Orci L. (1982). Immunocytochemistry of Vitamin D-Dependent Calcium Binding Protein in Chick Pancreas: Exclusive Localization in B-Cells. *Endocrinology.* 110(6): 2216-2218.
82. Sar M, Stumpf W E, De Luca H F. (1980). Thyrotropes in the Pituitary are Target Cells for 1,25-Dihydroxy Vitamin D₃. *Cell Tissue Res.* 209(1): 161 -166.
83. Schulk J A, Kaplan E L. (1975). The Importance of the Stomach in Gastrin-Induced Hypocalcemia in the Rat. *Endocrinology.* 96(5): 1217-1220.
84. Shamley D R, Opperman I A, Buffenstein R, Ross F P. (1992). Ontogeny of Calbindin-D28k and Calbindin-D9k in the Mouse Kidney, Duodenum, Cerebellum and Placenta. *Development.* 116: 491-496.

85. Shimura F, Wasserman R H. (1984). Membrane Associated Vitamin D induced Calcium Binding Protein (CaBP): Quantification by a Radioimmunoassay and Evidence for a Specific CaBP in Purified Intestinal Brush Borders. *Endocrinology*. 115: 1964-1970.
86. Shu S, Ju G and Fan L. (1988). The Glucose Oxidase-DAB-Nickel Method in Peroxidase Histochemistry of the Nervous System. *Neurosci Lett*. 85(2): 169-171.
87. Sloviter R S. (1989). Calcium-Binding Protein (Calbindin D_{28k}) and Parvalbumin Immunocytochemistry: Localization in the Rat Hippocampus with Specific Reference to the Selective Vulnerability of Hippocampal Neurons to Seizure Activity. *J Comp Neurol*. 280(2): 183-196.
88. Solcia E, Capella C, Buffa R, Usellini L, Fiocca R, Sessa F. (1987). Endocrine Cells of the Digestive System. In: Johnson L R (ed). *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 2nd edn. Raven Press. New York, pp 111-130.
89. Solcia E, Capella C, Vassallo G, Buffa R. (1975). Endocrine Cells of the Gastric Mucosa. *Int Rev Cytol*. 42: 223-286.
90. Spencer R, Charman M, Wilson P W, Lawson D E. (1978). The Relationship between Vitamin D Stimulated Calcium Transport and Intestinal CaBP in the Chicken. *Biochem J*. 170(1): 93-101.
91. Sternberger L A. (1979). The Unlabelled Antibody Peroxidase- Antiperoxidase (PAP) Method. In: *Immunocytochemistry* (L. A. Stenberg, ed). Pp. 104-169. John Wiley and Sons. New York.
92. Sternberger L A. (1986). *Immunocytochemistry*, 3rd ed. Wiley, New York.
93. Stumpf W E, Sar M, Reid F A, Tanaka Y, De Luca H F. (1979). Target Cells for 1,25-Dihydroxyvitamine D₃ in Intestinal Tract, Stomach, Kidney, Skin, Pituitary and Parathyroid. *Science* 206(4423):1188-1190.
94. Tarakçı B G, Timurkaan S. (2001). Kobayların Sindirim Kanalı Organları ve Pankreasları ile Tiroid, Paratiroid, Hipofiz ve Adrenal Medullaları ve Böbreklerinde Calbindin Dağılımının İmmunohistokimyasal Yöntemle Belirlenmesi. *Vet Bil Derg*. 17(3): 117-122.
95. Tarakçı B. (1995). Chemical Coding of the Innervation of the Gastrointestinal Tract in the Rat. PhD Thesis. Department of Veterinary Preclinical Sciences University of Liverpool, U K.
96. Taylor A N, Gleason W A J, Lankford G L. (1984). Immunocytochemical Localization of Rat Intestinal Vitamin D-Dependent Calcium- Binding Protein. *J Histochem Cytochem*. 32(2): 153-158.
97. Taylor A N, Inpanbutr N, Deftos L J. (1987). Localization of Calbindin- D_{28k} in Calcitonin Containing Cells of Chick Ultimobranchial Glands. *Anat Rec*. 219 (1): 86-90.
98. Taylor A N, Inpanbutr N. (1988). Vitamin D Mediated Intestinal Calcium Transport: Ultrastructural Distribution of Calbindin-D_{28k} Following Calcitrol. In: Bronner F, Peterlik M

- (eds) *Cellular Calcium and Phosphate Transport in Health and Disease*. Alan R Liss Inc, New York, p 109-115.
99. Taylor A N. (1981). Immunocytochemical Localization of the Vitamin D-Induced Calcium Binding Protein: Relocation of Antigen During Frozen Section Processing. *J Histochem Cytochem.* 29(1): 65-73.
 100. Thomasset M, Parkes C O, Cuisinier- Gleizes P. (1982). Rat Calcium-Binding Proteins: Distribution, Development and Vitamin D Dependence. *Am J Physiol.* 243(6): E483-E488.
 101. Thorens B, Roth J, Norman A W, Perrelet A, Orci L. (1982). Immunocytochemical Localization of the Vitamin D Dependent Calcium Binding Protein in Chick Duodenum. *J Cell Biol.* 94(1): 115-122.
 102. Walters J R, Bishop A E, Facer P, Lawson E M, Rogers J H, Polak J M. (1993). Calretinin and Calbindin D28k Immunoreactivity in the Human Gastrointestinal Tract. *Gastroenterology.* 104(5): 1381-1389.
 103. Wasserman R H and Taylor A N. (1966). Vitamin D₃ Induced Calcium-Binding Protein in Chick Intestinal Mucosa. *Science* 152:791-793.
 104. Wasserman R H, Fullmer C S. (1983). Calcium Transport Proteins, Calcium Absorption and Vitamin D. *Annu Rev Physiol.* 45: 375-380.
 105. Wasserman R H, Fulmer C S, Taylor A N. (1978). Vitamin D Dependent Calcium Binding Proteins. In: Lawson DEM (ed) *Vitamin D*. Academic Press, London, pp 133-166.
 106. Winarto A, Miki T, Semo S, Iwanaga T. (2000). Immunohistochemical Localization of Normal and K_{ATP} Channel- Deficient Mice: Its Possible Role in the Prevention of Cell Damage to Islet Cells. *Biomed Res.* 21(5): 305-313.
 107. Yamakuni T, Araki K, Takahashi Y. (1985). The Developmental Changes of mRNA Levels for a Cerebellar Protein (Spot 35 Protein) in Rat Brains. *FEBS Lett* 188: 127-130.
 108. Yamakuni T, Kuwano S, Odani S, Miki N, Yamaguchi K, Takahashi Y. (1987). Molecular Cloning of cDNA to mRNA for a Cerebellar Spot 35 Protein. *J Neurochem.* 48: 1590-1596.
 109. Yamakuni T, Kuwano S, Odani N, Miki N, Yamaguchi K, Takahashi Y. (1986). Nucleotide Sequence of cDNA to mRNA for a Cerebellar Ca-Binding Protein, Spot 35 Protein. *Nucl Acids Res.* 14: 6768-6773.
 110. Yamamoto T, Carr P A, Baimbridge K G, Nagy J I. (1989). Parvalbumin and Calbindin D28k Immunoreactive Neurons in the Superficial Layers of the Spinal Cord Dorsal Horn of Rat. *Brain Res Bull.* 23:493-598.
 111. Zabel M, Schafer H, Surdyk J, Biela-Jacek I. (1988). Immunocytochemical Studies on Parafollicular Cells of Various Mammals. *Acta Anat.* 131(3): 222-226.

112. Zabel M, Biela-Jacek I, Surdyk J, Dietel M. (1987a). Studies on Localization of Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) in the Thyroid-Parathyroid Complex. *Virchows Arch. A Pathol Anat Histopathol* 411(6): 569-573.
113. Zabel M, Surdyk J, Biela-Jacek I. (1987b). Immunocytochemical Studies on Thyroid Parafollicular Cells in Postnatal Development of the Rat. *Acta Anat.* 130(3): 251-256.
114. Zabel M. (1983). Ultrastructural Localization of Calcitonin in Control and Stimulated Thyroid C Cells of the Rat Using Protein A-Gold Immunocytochemical Technique. *Histochemistry.* 77(2):269-273.
115. Zabel M. (1984). Ultrastructural Localization of Calcitonin, Somatostatin and Serotonin in Parafollicular Cells of Rat Thyroid. *Histochem J.* 16(12): 1265-1272.
116. Zabel M. (1985). Studies on in vitro Effect of Serotonin on Calcitonin Secretion by Rat Thyroid C Cells. *Histochemistry.* 83: 71-75.



8.ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi aynı ilde tamamladım.1990 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazandım ve 1995 yılında bu fakülteden mezun oldum. 1996 yılı bahar döneminde F.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim dalında araştırma görevlisi olarak doktora başladım. Halen aynı anabilim dalında araştırma görevlisi olarak görev yapmaktayım. Evli ve bir çocuk annesiyim.

