

**PRENATAL VE POSTNATAL DÖNEMLERDE TAVUK (*Gallus Gallus
Domestica*) GİZZARD (MUSKULER MİDE)'İNDE SEROTONİN (5-HT)
SALGILAYAN HÜCRELERİN MUKOZAL LOKALİZASYONLARI**

Kenan ÇINAR*, Dilek YILMAZ

Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
32260, Isparta, Türkiye * e-mail: kcinar@fef.sdu.edu.tr
Alınış: 27 Eylül 2006, Kabul: 8 Aralık 2006

Özet: Serotonin immunoreaktif hücreler, inkübasyonun 12. gününde gizzard lamina epiteliyalis (I. epiteliyalis)'inde az sayıda gözlemlendi. İnkübasyonun 14, 15, 18, 19 ve 20. günlerinde I. epiteliyalis'te lokalize olan serotonin immunoreaktif hücre sayısında inkübasyonun diğer günlerine göre artış saptandı. Bezlerde ise serotonin immunoreaktif hücrelere ilk kez inkübasyonun 14. gününde az sayıda rastlandı. İnkübasyonun 16. gününde bezlerde bulunan immunoreaktif hücre sayısında azalma gözlenirken, inkübasyonun 17-21. günleri ile yeni doğarlarda bu hücreler tespit edilemedi. İnkübasyonun 21. gününde ve yumurtadan yeni çıkan civciv gizzard I. epiteliyalis'inde de bu hücrelere rastlanmadı. Bir haftalık civciv gizzard I. epiteliyalis ve bezlerinde bulunan immunoreaktif hücre sayısında artış belirlenirken, erişkin gizzard'ında bu hücreler gözlenmedi.

Anahtar kelimeler: Gizzard, serotonin, immunohistokimya, *Gallus gallus domestica*

MUCOSAL LOCALIZATIONS OF CELLS THAT SECRETE SEROTONIN (5-HT) IN GIZZARD (MUSCULAR STOMACH) IN CHICKEN (*GALLUS GALLUS DOMESTICA*) DURING THE PRENATAL AND POSTNATAL PERIODS

Abstract: A few serotonin immunoreactive cells were seen in Lamina epithelialis (I. epithelialis) of gizzard at 12th day of incubation. It was observed that the number of serotonin immunoreactive cells that localize in I. epithelialis at 14th, 15th, 18th, 19th and 20th days of incubation increased as compared to the other days of incubation. First serotonin immunoreactive cells were detected at few numbers in glands at 14th day of incubation. As the numbers of cells decreased in glands at 16th, these cells weren't observed at 17th day of incubation and newborn chick. These cells weren't seen in I. epithelialis of gizzard at 21th and newborn chick. The number of cells increased in I. epithelialis and glands of gizzard in a-week-old chick, while these cells weren't seen in adult gizzard.

Key words: Gizzard, serotonin, immunohistochemistry, *Gallus gallus domestica*

GİRİŞ

Mukozasında çok sayıda endokrin hücre bulunmasından dolayı sindirim kanalı vücudun

en büyük endokrin organı olarak nitelendirilmektedir (REHFELD 1998, TANYOLAÇ 1999).

Sindirim kanalı mukozasında yer alan endokrin hücreler organizmada yaygın olarak bulunan APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) hücrelerin bir bölümünü oluşturmaktadırlar ve bu kavram son yıllarda yerini DNES'e (Diffuse Neuro Endocrine System) bırakmıştır (ANDREW vd. 1983, JUNQEIRA vd. 1992, TANYOLAÇ 1999, PAN vd. 2000, YOUSON vd. 2001, KARAÖZ 2002, NARUSE vd. 2005). Bu hücrelerin oluşturduğu sistemler gastroenteropankreatik (GEP) sistem (PAN vd. 2000, YOUSON vd. 2001) ya da gastroenteropankreatik-nöroendokrin sistem (ABAD vd. 1987) olarak da adlandırılmaktadır (JUNQEIRA vd. 1992, RODRIGUES vd. 1992, PAN vd. 2000).

Kuşlarda prenatal ve postnatal dönemlerde yapılan çalışmalarda sindirim kanalında yer alan ve içlerinde bu çalışmada lokalizasyonu belirlenmesi amaçlanan serotonin de bulunduğu somatostatin, pankreatik polipeptit (PP), polipeptit YY, glukagon, avian pankreatik polipeptit, vazoaaktif intestinal polipeptid (VIP), gastrin, kolesistokinin, nörotensin, bombesin, substance-P, met-enkephalin, motilin salgılayan çok sayıda endokrin hücre saptanmıştır (RAWDON & ANDREW 1981, EL-SALHY vd. 1982, D'ESTE vd. 1984, YAMAGUCHI vd. 1986, ALISON 1989, SALVI & RENDA 1989, ALISON 1990, BEZEUIDENHOUT & VAN ASWEGEN 1990, MARTINEZ vd. 1993, YAMADA vd. 1993, ATOJI vd. 1994).

Sindirim kanalı peptitleri endokrin, nörokrin ve parakrin etkileri ile gastrointestinal motiliteyi düzenlemeleri, sindirim ve emilimi kolaylaştırmaları ve büyümeye yardımcı etkilerinden dolayı regülatör peptitler olarak da isimlendirilmektedirler (TELATAR & ŞİMŞEK 1993).

Bu çalışmada *Gallus gallus domestica* gizzard'ında prenatal ve postnatal dönemlerde serotonin salgılayan hücrelerin mukozal lokalizasyonlarının belirlenmesi amaçlandı.

MATERYAL VE METOT

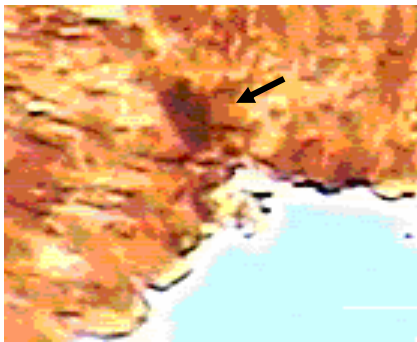
Çalışmada, inkübasyonun 12. gününden itibaren inkübasyon sonuna kadar her gün, inkübasyondan sonra yeni doğan, 1 haftalık ve erişkin dönemlerden beşer adet olmak üzere toplam 65 adet *Gallus gallus domestica*'ya ait gizzard bölgesinden alınan örnekler materyal olarak kullanıldı. Örnekler Bouin solüsyonunda 24 saat süreyle tespit edildi. Rutin histolojik doku takibinden geçirilen örnekler, parafinde bloklandı. 6-7 mikrometre kalınlığında alınmış olan kesitlerin bir kısmına histolojik yapının belirlenmesi amacıyla Masson'un Trikrom yöntemi uygulandı (BANCROFT vd. 1996). Diğer kesitlere ise serotonin salgılayan hücrelerin belirlenmesi için PAP (Peroxidase antiPeroxidase) yöntemi (STERNBERGER 1986) uygulandı. Bu yöntemle göre kesitler ksilol ve alkol serilerinden geçirildikten sonra %3'lük H₂O₂ solüsyonunda 20 dakika bekletildi. %0.2 Triton X-100 ve %0.1 Bovine serum albumine (Sigma A-7284) içeren 0.01M PBS (pH 7.4)' de yıkandı. Normal goat serum (Novocastra 703404) solüsyonunda 20-30 dakika bekletilen kesitler antiserotoninde (Zymed 18-0077- 1/200) +4 ° C' de bir gece tutuldu. Süre sonunda kesitler TBS ile yıkandıktan sonra önce Goat anti rabbit IgG (Sigma G-5268-1/50) (20-30 dakika) daha sonra PAP (Sigma P1291-1/100) uygulandı. Kesitlere

en son aşamada 1.5 ml H₂O₂ içeren DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; Zymed 00-2020) solusyonu ile boyama işlemi yapıldı.

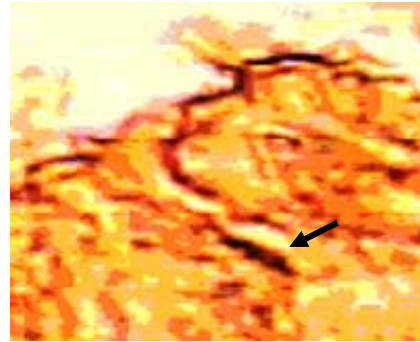
Alkol ve ksilol serilerinden geçirilen kesitler entellan ile kapatıldı. İnkübasyonun 12. gününden itibaren her döneme ait dörder preparatta toplam ortalama 15.000 pilika ventrikulares (başlangıçta ortalama enleri 30µm, boyları 55 µm; ilerleyen dönemlerde ortalama enleri 10 µm, boyları 125 µm)'daki immunoreaktif hücreler sayıldı. Ayrıca aynı dönemlerde yaklaşık 14-15 mm² lik alandaki bezlerde immunoreaktif hücre sayımı da yapıldı. Daha sonra her bir alandaki immunoreaktif hücre yoğunluğu One-Way ANOVA metoduyla hesaplandı.

BULGULAR

One-Way ANOVA metoduyla belirlenen serotonin immunoreaktif hücrelerin gizzard'daki yoğunluk ve dağılımları tablo 1'de verilmiştir. İnkübasyonun 12. gününde I. epitelyalis'de (Şekil 1) az sayıda serotonin immunoreaktif hücreye rastlanırken bez epitelyinde bu hücreler gözlenmedi. İnkübasyonun 13. gününde immunoreaktivite bakımından önemli bir fark saptanmadı. İnkübasyonun 14. gününde I. epitelyalis'de önceki döneme göre immunoreaktif hücre sayısında artış gözlenirken bezlerde ise az sayıda immunoreaktif hücre ilk olarak bu dönemde tespit edildi. İnkübasyonun 16 (Şekil 2) gününde I. epitelyalis'de bulunan serotonin immunoreaktif hücre sayısında azalma gözlenirken 17, 18, 19 (Şekil 3) ve 20. günlerde artış olduğu belirlendi. İnkübasyonun 16. gününde bezlerde bulunan hücre sayısında azalma tespit edildi. İnkübasyonun 17. gününden 1 haftalık döneme kadar bezlerde immunoreaktif hücreye rastlanmadı. İnkübasyonun 21. gününde I. epitelyalis'inde serotonin salgılayan immunoreaktif hücreler gözlenmedi. Yeni doğan civciv gizzard'ında serotonin immunoreaktif hücrelerin lokalize olmadığı gözlemlendi. Kuluçkadan sonraki 1 haftalık civcivlere ait gizzard'ın hem I. epitelyalis'inde hem de bezlerinde (Şekil 4) serotonin immunoreaktif hücrelerin çok sayıda olduğu gözlemlendi. Erişkin dönemde ise gizzard'da serotonin salgılayan immunoreaktif hücrelere rastlanmadı.



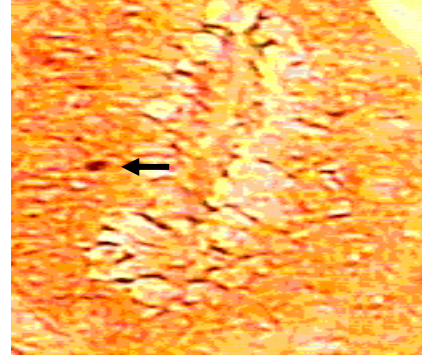
Şekil 1. İnkübasyonun 12. günü, I. epitelyalis, serotonin immunoreaktif hücre, PAP, 600x



Şekil 2. İnkübasyonun 16. günü, I. epitelyalis, serotonin immunoreaktif hücre, PAP, 600x



Şekil 3. İnkübasyonun 19. günü, L. epiteliyalis, serotonin immunoreaktif hücre, PAP, 650x



Şekil 4. 1 haftalık dönem, bez epiteli, serotonin immunoreaktif hücre, PAP, 450x

Tablo 1. *Gallus gallus domestica* gizzard'ında bulunan serotonin immunoreaktif hücrelerin yoğunluk ve dağılımları

Prenatal Dönem (İnkübasyon Günleri)	L. epiteliyalis	Bez epiteli
12	2,000±0,000	0
13	2,000±0,816	0
14	4,000±0,816	2,000±0,000
15	4,000±0,816	2,000±0,000
16	1,000±0,000	1,000±0,000
17	2,000±0,816	0
18	4,000±0,816	0
19	4,000±0,816	0
20	4,000±0,816	0
21	0	0
Postnatal Dönem		
Yeni doğan civciv	0	0
1 haftalık	6,000±1,154	6,250±0,957
Erişkin	0	0
Anova (F)	32,667	175,657
Sig.	0	0

TARTIŞMA VE SONUÇ

CASTALDO & LUCINI (1994) yeşilbaşlı ördek gizzard bez epitelinde serotonin immunoreaktif hücrelerin ilk kez inkübasyonun 23. gününde gözlendiğini, 25. günden yumurtadan çıkma zamanına kadar sayıca arttıklarını göstermişlerdir. CASTALDO & LUCINI (1994) yeni doğan ördeğin gizzard bez epitelinde serotonin immunoreaktif hücrelerin az sayıda olduklarını bildirmelerine karşın, bu çalışmada yeni doğan civciv bez epitelinde bu hücrelerin lokalize olmadığı saptandı.

YAMAGUCHI vd. (1987) bıldırcın gizzard'ında serotonin immunoreaktif hücrelerin ilk kez inkübasyonun 12. gününde bez epitelinde gözlendiğini ve yumurtadan çıkma zamanına kadar nadiren bulduklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise inkübasyonun 12. gününde bezlerde immunoreaktif hücrelere rastlanmadı. Yeni doğan civcivde bölge belirtilmeksizin midede az sayıda serotonin immunoreaktif hücrenin bulunduğu belirtilmesine karşın (RAWDON & ANDREW 1994), bu çalışmada yeni doğan civciv gizzard'ında bu hücreler gözlenmedi.

1 haftalık bıldırcın gizzard bez epitelinde serotonin immunoreaktif hücrelerin nadiren buldukları bildirilmiştir (YAMAGUCHI vd. 1987). Aynı araştırmacılar (YAMAGUCHI vd. 1987) 2 ve 3 haftalık dönemlerde bu hücrelerin gözlenmediğini erişkin dönemde ise nadir olduklarını belirtirlerken bu çalışmada ise 1 haftalık dönemde bez epitelinde çok sayıda serotonin immunoreaktif hücreye rastlandı.

HASHIMOTO vd. (1993) üç farklı erişkin bal kuşu (*Meliphaga virescens*, *Acanthogenys rufogularis*, *Lichmera indistincta*) gizzard'ı üzerine yaptıkları çalışmada serotonin immunoreaktif hücrelerin bez epitelinde lokalize olduklarını ve kahverengi bal kuşu gizzard'ında diğer bal kuşlarına göre daha fazla sayıda bulduklarını tespit etmişlerdir.

RICHARDSON vd. (1988) ise erişkin bal kuşu (*Phylidonyris novaehollandiae*) gizzard bez epitelinde az sayıda serotonin immunoreaktif hücrenin bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise erişkin dönemdeki bireylerin gizzard bez epitelinde bu hücrelere rastlanmadı. Öte yandan erişkin tavuk (YAMANAKA vd. 1989), yeşil başlı ördek (CASTALDO & LUCINI 1991) ve güvercin (SAITO vd. 1989) gizzard'ının l. epitelyalis'inde de serotonin immunoreaktif hücrelerin lokalize olmadığını bildirmişlerdir. Bu araştırmada da benzer bulgular elde edildi.

Sonuç olarak, embriyonal periyotta gizzard serotonin immunoreaktif hücrelerinin ortaya çıkma dönemlerinde gözlenen farklılığın türlerin kuluçka süreleriyle, erişkin dönemde ise bu hücre yoğunluklarının kuş türlerinin beslenme alışkanlıklarıyla ilişkili olabileceği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

ABAD ME, BINKHORST FM, ELBAL MT, ROMBOUT JH, 1987. A comparative immunocytochemical study of the gastro-entero-pancreatic (GEP) endocrine system in a stomachless and a stomach-containing teleost. *General and Comparative Endocrinology*, 66, 123-136.

- ALISON BC, 1989. The distribution and ontogeny of gastrin/CCK-, somatostatin- and neurotensin-immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of the chicken. *Histology and Histopathology*, 4, 55-62.
- ALISON BC, 1990. The ontogeny and distribution of glucagon- and pancreatic polypeptide- immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of the chicken. *Anatomy and Embryology*, 182, 605-610.
- ANDREW A, KRAMER B, RAWDON BB, 1983. Gut and pancreatic amine precursor uptake and decarboxylation cells are not neural crest derivatives. *Gastroenterology*, 84, 429-430.
- ATOJI Y, WATANABE H, NIMAMOTO N, SUGIYAMA M, YAMAMOTO Y, SUZUKI Y, 1994. Neurotensin immunoreactive cells in the gastrointestinal epithelium of the chicken, pigeon and japanese quail. *European Journal of Histochemistry*, 38, 65-72.
- BANCROFT JD, STEVEN A, TURNER DR, 1996. *Theory and practice of histological techniques*. Churchill Livingstone, New York, London, Edinburg, Madrid, Melbourne, San Francisco, Tokyo, pp. 129.
- BEZUIDENHOUT AJ, VAN ASWEGEN G, 1990. A Light microscopic and immunocytochemical study of the gastrointestinal tract of the ostrich (*Struthio camelus* L.). *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 57, 37-48.
- CASTALDO L, LUCINI C, 1991. An immunohistochemical study on the endocrine cells in the gastrointestinal tract of the domestic duck. *European Journal of Basic and Applied Histochemistry*, 35, 131-143.
- CASTALDO L, LUCINI C, 1994. Ontogenesis of some endocrine cells in the duck gastrointestinal tract. *European Journal of Histochemistry*, 38, 319-26.
- D'ESTE L, CAMPO S, SALVI E, RENDA T, 1984. Ontogenesis of bombesin-like immunoreactive cells in the chicken proventriculus. *Basic and Applied Histochemistry*, 28, 143-150.
- EL-SALHY M, WILANDER E, ABU-SINNA G, SHABAKA H., LUNDBERG JM, TATEMOTO K, 1982. Ontogeny of polypeptide YY (PYY) cells in the gut of chicken. An immunocytochemical study. *Biomedical Research*, 3, 680-682.
- HASHIMOTO N, YAMADA J, RICHARDSON KC, KITAMURA N, YAMASHITA T, 1993. An immunohistochemical study on the gastrointestinal endocrine cells of three honeyeaters: singing honeyeater (*Meliphaga virescens*), spiny-cheeked honeyeater (*Acanthogenys rufogularis*) and brown honeyeater (*Lichmera indistincta*). *European Journal of Basic and Applied Histochemistry*, 37, 233-240.
- JUNQUERIA LC, CARNERIO J, KELLEY RD, 1992. *Basic histology*. Appleton and Lange, USA, pp. 600.
- KARAÖZ E, 2002. *Özel histoloji*. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları No:29, Isparta, pp. 253.
- MARTINEZ A, LÓPEZ J, SESMA P, 1993. Development of the diffuse endocrine system in the chicken proventriculus. *Cell and Tissue Research*, 271, 107-113.
- NARUSE H, GOMI T, KIMURA A, ADRIAENSEN D, TIMMERMANS J-P, 2005. Structure of the respiratory tract of the red-bellied newt *Cynops pyrrhogaster*, with reference to serotonin-positive neuroepithelial endocrine cells. *Anatomical Science International*, 80, 97-104.

- PAN QS, FANG ZP, ZHAO YX, 2000. Immunocytochemical identification and localization of APUD cells in the gut of seven stomachless teleost fishes. *World Journal of Gastroenterology*, 6, 96-101.
- RAWDON BB, ANDREW A, 1981. An immunohistochemical survey of endocrine cells in the gastrointestinal tract of chicks at hatching. *Cell and Tissue Research*, 220, 279-292.
- RAWDON BB, ANDREW A, 1994. Distribution of serotonin- immunoreactive gut endocrine cells in chicks at hatching. Examination of possible colocalisation with peptides reveals unexpected cross-reactivity of substance P antiserum with serotonin. *Histochemistry*, 102, 93-100.
- REHFELD JF, 1998. The new biology of gastrointestinal hormones. *Physiological Reviews*, 78, 1087-1108.
- RICHARDSON KC, YAMADA J, WOOLLER RD, 1988. An immunohistochemical study of the New Holland honeyeater, *Phylidonyris novaehollandiae*. *Australian Journal of Zoology*, 36, 483-496.
- RODRIGUES A, PENA L, FLORES JM, GONZALES M, CASTANO M, 1992. Immunocytochemical study of diffuse neuroendocrine system cells in *Equine lungs*. *Anatomia Histologia Embryologia*, 21, 138-145.
- SAITO T, YAMADA J, KITAMURA N, YAMASHITA T, 1989. An immunohistochemical study on the distribution of endocrine cells in the gastrointestinal tract of domestic pigeon, (*Columba livia var domestica*). *Zeitschrift Für Mikroskopisch - Anatomische Forsch*, 103, 237-246.
- SALVI E, RENDA T, 1989. Ontogenesis of endocrine cells in the chicken intestine: An immunohistochemical study. *Cellular and Molecular Biology*, 35(1), 17-26.
- STERNBERGER LA, 1986. *Immunocytochemistry*. John Wiley and Sons, New York.
- TANYOLAÇ A, 1999. *Özel histoloji*. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara, pp. 92.
- TELATAR H, ŞİMŞEK H, 1993. *Gastroenteroloji*. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıklar A.B.D. Gastroenteroloji Ünitesi, Hekimler Yayın Birliği, Ankara, pp. 551.
- YAMADA J, MITSUYOSHI A, KITAMURA N, YAMASHITA T, YANAIHARA N, RICHARDSON KC, 1993. Heterogeneity of motilin-immunoreactive cells in the duodenum and pyloric region of several avian species. *Archives of Histology and Cytology*, 56, 261-267.
- YAMAGUCHI S, YAMADA J, KITAMURA N, YAMASHITA T, 1986. Ontogeny of the endocrine cells in the quail proventriculus. *Zeitschrift Für Mikroskopisch - Anatomische Forsch*, 100, 981-989.
- YAMAGUCHI S, YAMADA J, KITAMURA N, YAMASHITA T, 1987. Histological and immunohistochemical study on ontogeny of the endocrine cells in the quail gizzard. *Gegenbaurs Morphologisches Jahrbuch*, 133, 71-78.
- YAMANAKA Y, YAMADA J, KITAMURA N, YAMASHITA T, 1989. An immunohistochemical study on the distribution of endocrine cells in the chicken gastrointestinal tract. *Zeitschrift Für Mikroskopisch - Anatomische Forsch*, 103, 437-446.
- YOUSON JH, AL-HAHROUKI AA, NAUMOVSKI D, CONLON JM, 2001. The endocrine cells in the gastroenteropancreatic system of the bowfin, *Amia calva* L: An immunohistochemical, ultrastructural and immunohistochemical analysis. *Journal of Morphology*, 250, 208-224.