

KOBAYLARIN SİNDİRİM KANALI ORGANLARI VE PANKREASLARI İLE TİROİD, PARATİROİD, HİPOFİZ VE ADRENAL MEDULLALARI VE BÖBREKLERİNDE CALBİNDİN DAĞILIMININ İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLE BELİRLENMESİ

Berrin Gençer Tarakçı¹

Sema Timurkaan^{®1}

Immunohistochemical Determination of Calbindin Distribution in Gastrointestinal Tract Organs and Pancreas, and in Hypophysis, Adrenal Medulla and Kidneys of Guinea Pigs

Özet: Tavuk duodenumundaki calbindin-D 28 k' ya karşı hazırlanmış olan antiserum kullanılarak, immunohistokimyasal yöntemlerle calbindinin kobayların bazı endokrin bezleri (tiroid, paratiroid, hipofiz, adren) ve sindirim kanalı epiteli ile pankreasların ve böbreklerdeki dağılımları incelendi. Paratiroid, adren, ileum ve kolonda spesifik immunoreaktiviteye rastlanmadı. Bununla beraber, immunoreaktiviteye böbrek tubuluslarında, pankreasın endokrin hücrelerinde, tiroidde, hipofizde, mide ve duodenum mukozasında rastlandı. Bu dağılım tarzı dikkate alınarak calbindinin, intrasellüler ve ekstrasellüler ortamlardaki kalsiyum homeostazisinde veya endokrin hücre uyarılmasını düzenleyen kalsiyum mekanizmasında rol aldığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Calbindin, endokrin bez, endokrin hücre

Summary: The distribution of calbindin in thyroid, parathyroid, pituitary and adrenals, and in gastrointestinal tract epithelium, pancreas and in the kidney has been investigated immunohistochemically using an antiserum raised against the 28k Da calbindin from chicken duodenum. Epithelial cells of parathyroid, adren, ileum and colon failed to react with the antibodies, although immunoreactivity was found in kidney tubules, pancreatic endocrine cells, thyroid, pituitary and in the epithelial cells of stomach and duodenal mucosa. This localization 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, endocrine gland, endocrine cell

Giriş

Intrasellüler kalsiyum, hücresel uyarı iletiminde anahtar rol oynar ve etkinliği intrasellüler kalsiyum bağlayan proteinler ile düzenlenir (Christakos ve ark., 1989; Darwin, 1991).

Calbindin-D 28k, kalsiyum bağlayıcı proteinlerden biridir (Christakos ve ark., 1989) ve ilk kez tavukların bağırsak mukozasında izole edilmiştir (Wasserman ve Taylor, 1966).

Kanatlı bağırsağındaki epitelyal lokalizasyonuna ilaveten, calbindin-D 28k memelilerin ve kuşların periferik ve sentral sinir sisteminde de bulunmuştur (Baimbridge ve ark., 1982; Christakos ve ark., 1989; Buchan, 1991; Houghton, 1992). Calbindin-D 28k' nın beyinde "intrasellüler Ca⁺² tamponu" benzeri bir fonksiyon gördüğüne inanılmaktadır (Christakos ve ark., 1989; Sloviter, 1989; Darwin, 1991; Mattson ve ark., 1991). Bu

tampon etkisiyle de aşırı, uyarıma bağlı olarak intrasellüler ortamda artan kalsiyumun nörotoksik etkisinden hücreleri koruduğu düşünülmektedir.

Sinir sistemindeki lokalizasyonuna ilaveten, calbindin-D 28k' ya bazı kanatlı ve memeli türlerinin bazı endokrin bezlerinde, mide, bağırsak ve pankreaslarındaki diffüz nöroendokrin sistem hücrelerinde de rastlanmıştır (McIntosh ve ark., 1986; Pochet ve ark., 1987; Pochet ve ark., 1989; Inpanbutr ve Taylor, 1989; Zabel ve Schafer, 1989; Rhoten ve Christakos, 1990; Bindels ve ark., 1991; Shamley ve ark., 1992; Johnson ve ark., 1994; Wang ve Christakos, 1995; Bourlon ve ark., 1996; Van Baal ve ark., 1996).

Bu çalışmada calbindin-D 28k' nın, kobayların tiroid, paratiroid, hipofiz, pankreas ve adren gibi endokrin sistem organlarından alınan doku örneklerinde, mide ve bağırsak epitel hücrelerinde ve

böbreklerdeki dağılımı incelendi. Bu proteinin lokalizasyonu hakkında elde edilecek olan bilgiler kalsiyum metabolizması ile yakından ilgili olduğundan, bu çalışmada calbindinin nöronlarda olduğu gibi endokrin sistem hücrelerinde de "intraselüler Ca^{+2} tamponu" benzeri fonksiyon görüp görmediği araştırıldı.

Materyal ve Metot

Araştırmada, deney hayvanı olarak 2'si erkek, 2'si dişi dört adet ergin kobay kullanıldı. Genel anestezi altında kobaylardan alınan doku örnekleri (tiroid, paratiroid, hipofiz, böbrek, pankreas, mide ve bağırsaklar), fosfat tamponu ile hazırlanan %10'luk formol (pH 7,2) ile tespit edilerek yıkama işlemine tabi tutuldu. Dehidrasyon ve bloklama işlemlerinden sonra bloklardan 5 μ m kalınlığında alınan kesitler, önceden krom alüm-jelatinle muamele edilen lamalara alındı.

Immunohistokimyasal Boyama "Immunoperoksidaz Metot" ile yapıldı. Calbindinin immunohistokimyasal yolla demonstrasyonu, avidin-biotin horserodish peroksidase (ABC- HRP)) tekniği kullanılarak gerçekleştirildi.

Kesitler deparafinize ve dehidre edildikten sonra 0,1M fosfat buffer salin (PBS), pH 7.2 içinde 10 dakika bekletildi. Takiben endojen peroksidazı bloke etmek için metanolde hazırlanan %0.3'lük H_2O_2 kullanıldı (30 dk). Kesitler PBS ile iki kez yı-

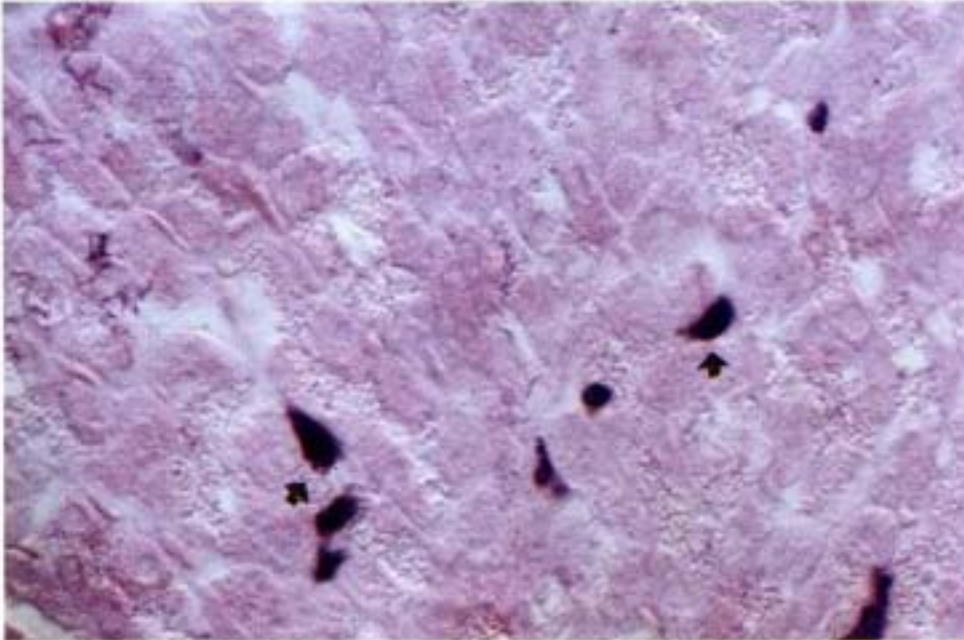
kandıktan sonra primer antiserum, mouse anti-Calbindin-D 28k (Sigma) ile 16-20 saat süreyle 4°C de inkube edildi. Primer antiserum %2.5'lük sıgır serum albumini ve %0.25 sodyum azid içeren PBS ile 1:1000 oranında sulandırıldı. Kesitler daha sonra biyotinli keçi anti-mouse IgG (Sigma) ile ve bunu takiben streptavidin-biyotinli horseradish peroksidaz kompleksi (Dako) ile oda sıcaklığında 1 saat süre ile inkube edildi. Her ikisi de PBS ile 1:50 oranında sulandırıldı. Kesitler her inkübasyon öncesi 30 dakika süre ile PBS solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra kesitler, glukoz-oksidaz diaminobenzen (GDN) (Shu ve ark., 1988) substratına daldırılıp su ile yıkandı ve eozin ile boyanıp ışık mikroskobu ile incelendi. Fotoğraflama işlemleri Nikon marka araştırma mikroskobu yardımıyla yapıldı.

Bulgular

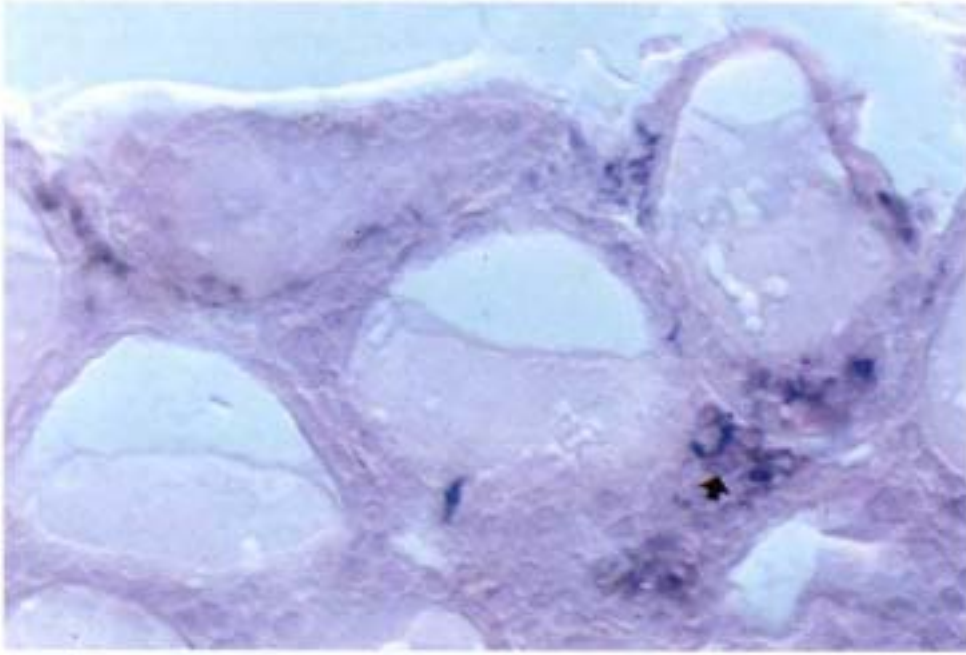
Immunohistokimyasal boyama sonucunda anti-calbindin ile spesifik olarak reaksiyona giren immunoreaktif hücrelere, tiroid, pankreas, hipofiz, mide, duodenum ve böbrekte rastlandı.

Midenin kardiya ve pilorus bölgelerinde calbindin immunoreaktif hücreleri çok sayıdaydı. Duodenumda ise az sayıda rastlandı (Şekil 1). İleum ve kolonda immunoreaktif hücreler gözlenmedi.

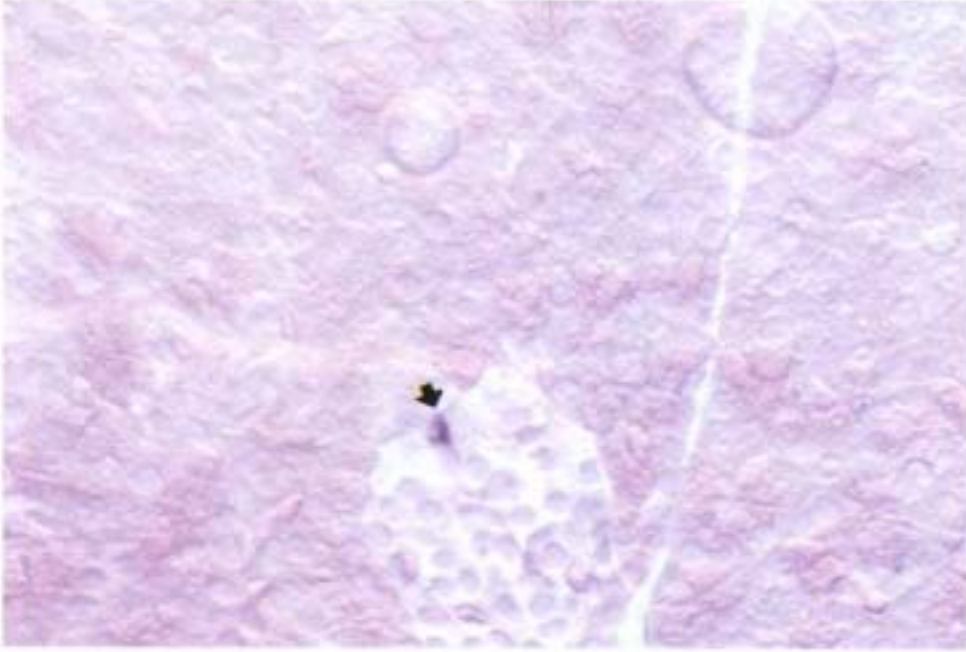
Calbindin-D 28k pozitifitesi tiroidin parafoliküller hücrelerinde oldukça güçlüydü (Şekil 2). Calbindin pozitifitesi sitoplazmada ve zayıf olarak ta çekirdekte gözlemlendi. Paratiroid bezinde immunoreaktif



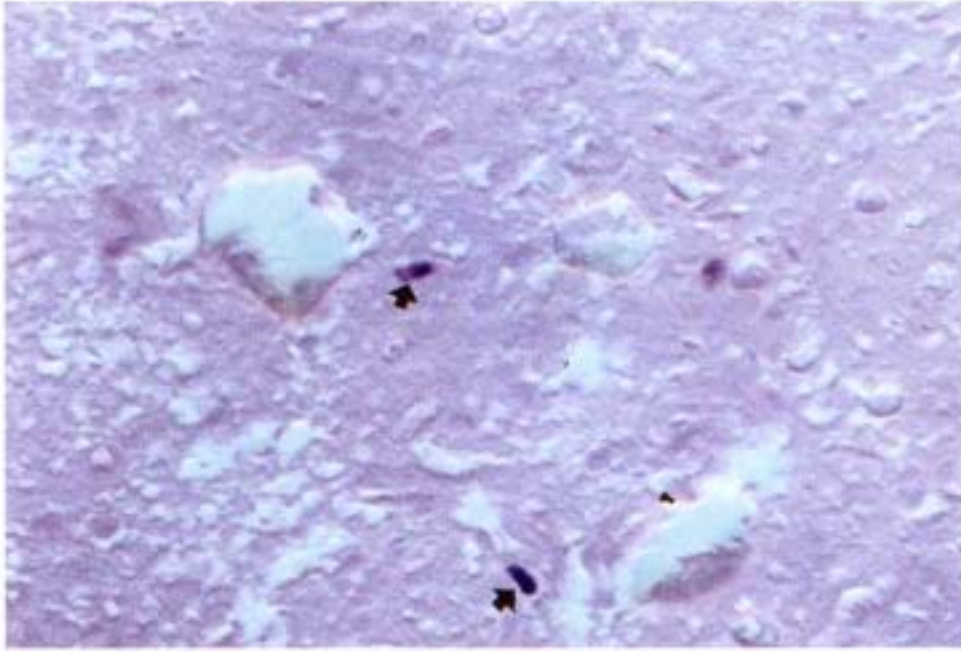
Şekil 1. Kobay midesinde Calbindin-D 28k immunoreaktivites (oklar). Immunohistokimyasal boyama, X 400.



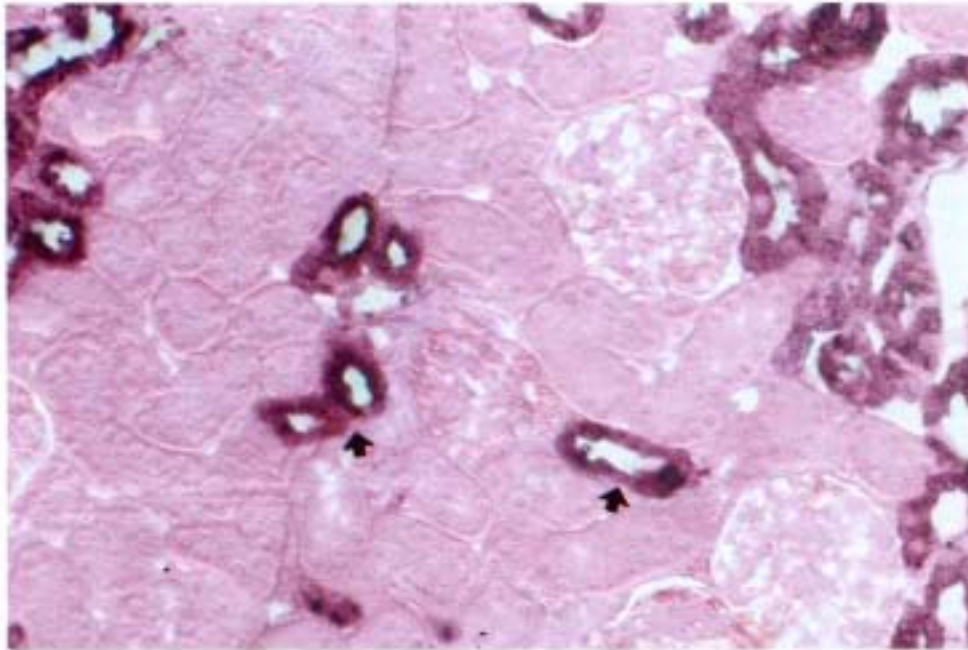
Şekil 2. Tiroidin parafoliküller hücrelerinde Calbindin-D 28k immunoreaktivitesi (oklar). İmmunohistokimyasal boyama, X 400.



Şekil 3. Pankreasın endokrin bölümünde Calbindin-D 28k immunoreaktivitesi (ok). İmmunohistokimyasal boyama, X 400.



Şekil 4. Hipofizin adenohipofiz kısmında Calbindin-D 28k immunoreaktivitesi (oklar). İmmunohistokimyasal boyama, X 400.



Şekil 5. Böbreklerin tubulus distalislerinde Calbindin immunoreaktivitesi (oklar). İmmunohistokimyasal boyama, X 400.

hücelere rastlanmadı. Pankreasın endokrin bölümünü oluşturan Langerhans adacıklarında az sayıda ve zayıf calbindin immunoreaktivitesi gösteren hücelere rastlandı (Şekil 3).

Hipofizin adenohipofiz bölümünde de az sayıda calbindin pozitivitesi gösteren hücre tespit edildi (Şekil 4).

Adrende calbindin immunoreaktivitesine sahip hücreler görülmemekle birlikte; böbreklerin tubulus distalislerinde zayıfta olsa immunoreaktiviteye rastlandı (Şekil 5).

Tartışma ve Sonuç

Birçok hormon direkt veya indirekt yolla kalsiyum metabolizmasını etkilemektedir. Bu hormona parathormon ve kalsitonin (Copp, 1964), sekretin, (Isenberg ve ark., 1973; Windeck ve ark., 1978), tiroid uyarıcı hormon (TSH) / tiroid hormonları (Sar ve ark.,1980), gastrin ve kolesistokinin (Care ve ark.,1971; Cooper ve ark., 1972), glukagon (Birge ve Avioli, 1969), ka-teşolaminler (Fischer ve ark., 1973) ve histamin (Kaplan ve ark., 1976) dahildir. Bunun yanısıra, bu hormonların bazılarını üreten endokrin hücreler, örneğin; paratiroid hormonu, tiroksin, TSH, nöradrenalin ve gastrin, seçici olarak kalsiyum düzenleyici hormon $1,25(OH)_2 D$ tarafından tutulmaktadır (Dencker ve Tjalve, 1973; Stumpf ve ark., 1979; Clark ve ark., 1980).

Calbindin'in normal sentezi için kan kalsiyum düzeyini düzenleyici hormonuna ihtiyaç vardır. Bu protein, calmodulin protein ailesinin bir üyesi olup hayvansal dokularda yaygındır. Fakat bu protein sadece bazı türlerin spesifik hücrelerinde bulunur. Bu sebeptendir ki, kemiricilerin retinasında bulunmadığı halde, karnivorların retinası calbindin immunoreaktivitesi içerir (Verstappen ve ark., 1986) ve aynı zamanda beyindeki spesifik kortikal nöronlarda da calbindinin varlığına rastlanmıştır (Jande ve ark., 1981a; Roth ve ark., 1981). Bazı dokularda örneğin tavuk bağırsağında ve rat böbreğinde $1,25(OH)_2 D$ calbindin sentezini düzenler. Pankreas ve tavuk böbreğinde ise $1,25(OH)_2 D$ yokluğunda bile calbindin sentezi gerçekleşir. Beyinde ise bu proteinin sentezi için $1,25(OH)_2 D'$ ye ihtiyaç yoktur.

Calbindin, bağırsak ve böbrek epitel hücrelerinde kalsiyum iletiminin gerçekleşmesi için gereklidir (Wasserman ve ark., 1978). Pankreastaki B hücrelerinde, kalsiyumun etkisiyle insülin salgılanmasına yol açtığı (Roth ve ark., 1982), nöronlarda ise intrasellüler kalsiyum tamponu olarak etki gösterdiği ileri sürülmüştür (Jande ve ark.,

1981a; Jande ve ark., 1981b).

İnsanlarda ve bir çok hayvan türlerinde olduğu gibi bu çalışmada da Calbindin-D 28k immunoreaktivitesine, kobayların tiroid ve hipofizleri gibi bazı endokrin bezlerinde, mide ve pankreaslarındaki endokrin hücrelerinde ve böbreklerinde rastlandı. Bu bulgulara dayanılarak calbindinin, kalsiyum metabolizması üzerine etki eden bazı endokrin bez epitel hücrelerinde kalsiyum homeostasisinin düzenlenmesi üzerine etkisinin olabileceğini veya nöronlarda olduğu gibi endokrin hücrelerde de intrasellüler kalsiyum tamponu benzeri bir görev yaptığı sonucuna varıldı. Bununla beraber bu endokrin bez epitel hücrelerinde (tiroide C hücreleri, midede ECL hücreleri, pakreasta alfa ve beta hücreleri, hipofizde TSH hücreleri) salgılanan ve kalsiyum metabolizmasında etkili olan hormonlar ile Calbindin-D 28k'nın aynı anda ve aynı hücrelerde immunohistokimyasal yöntemlerle belirlenmesinin bu görüşü destekleyeceği kanısındayız.

Kaynaklar

- Baimbridge, K.G., Miller, J.J., Parkers, C.O. (1982). Calcium-binding protein distribution in the rat brain. *Brain. Res.*, 239, 519-525.
- Birge, S.J., Avioli, L.V. (1969). Glukagon-induced hypocalcemia in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 29, 213-218.
- Bindels, R.J., Hartog, A., Timmermans, J.A., van Os, CH. (1991). Immunocytochemical localization of calbindin-D28 calbindin-d9k and parvalbumin in rat kidney. *Contrib. Nephrol.*, 91, 7-13.
- 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 the secretion of insulin and glucagon: influence of vitamin D3 deficiency and $1,25$ -dihydroxyvitamin D3. *J. Endocrinol.*, 148, 223-232.
- Buchan, A.M.J. (1991). Neurofilament M and Calbindin-D 28k are present in mutually exclusive subpopulations of enteric neurons in the rat submucous plexus. *Brain. Res.*, 538, 171- 175.
- Care, A.D., Bruce, JB., Bodkins, J., Kenny, AD., Conaway, H., Anast, C.S. (1971). Role of pancreatic cholecystokinin and structurally related compounds as calcitonin secretagogues. *Endocrinol.*, 89,262-27.
- Christakos, S., Gabrielides, C., Rhoten, W.B. (1989). Vitamin D- dependent calcium binding proteins: chemistry, distribution, functional consideration and molecular biology. *Endoc. Rev.*, 10, 3-26.
- Clark, S.A., Stumpf, W.E., Sar, M., de Luca, H.F., Tanaka, Y.(1980). Target cells for $1,25$ - dihydroxyvitamine D3 in the pancreas. *Cell Tiss. Res.*, 209, 515 -520.
- Cooper, C.W., Schwesinger, W.H., Ontjes, D.A., Mahgoup, A.M., Munson, P.L. (1972). Stimulation of secretion of pig thyrocalcitonin by gastrin and related hormonal

- peptides. *Endocrinol.*, 91, 1079-1089.
- Copp, D.H. (1964). Parathyroid, calcitonin and control of plasma calcium. *Recent Prog. Horm. Res.*, 20, 59-88.
- Darwin, L.C. (1991). Ca²⁺ binding proteins as neuronal markers. *Neurosci. Facts.*, 2, 1-4.
- Dencker, L., Tjalve, H. (1973). Distribution of vitamin D₃: evidence of accumulation in renal proximal tubuli and thyroid parafollicular cells. *Experientia*, 29, 719-722.
- Fischer, J.A., Blum, J.N., Binswanger, U. (1973). Parathyroid hormone response to epinephrine: in vivo. *J. Clin. Invest.*, 52, 2434-2440.
- Houghton, P.E., Buchan, A.M.J., Challis, R.G. (1992). Ontogeny of the distribution and colocalization of Calbindin-D 28k within neural and endocrine cells of the gastrointestinal tract of fetal and neonatal sheep. *Regul. Pept.*, 37, 73-83.
- Inpanbutr, N., Taylor, A.N. (1989). Calbindin-D immunolocalization in developing chicken thyroid: a light and electron microscopic study. *J. Histochem. Cytochem.*, 37, 487-492.
- Iserberg, J.I., Brickman, A.S., Moore, E.W. (1973). The effect of secretin on serum calcium in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 37, 30-33.
- Jande, S.S., Maler, L., Lawson, D.E.M. (1981a). Immunohistochemical mapping of vitamin D-dependent calcium-binding protein in brain. *Nature*, 294, 765-767.
- Jande, S.S., Tolnai, S., Lawson, D.E.M. (1981b). Immunohistochemical localization of vitamin D-dependent calcium-binding protein in duodenum, kidney, uterus and cerebellum of chickens. *Histochemistry*, 71, 99-116.
- Johnson, J.A., Grande, J.P., Roche, P.C., Kumar, R. (1994). Immunohistochemical localization of the 1,25(OH)₂D₃ receptor and Calbindin-D 28k in human and rat pancreas. *Am. J. Physiol.*, 267, 356-360.
- Kaplan, E.L., Norberg, H.P., Schulak, J.A., Hill, B.J. (1976). The importance of the stomach in mediating histamine-induced hypocalcaemia in the rat. *Metabolism*, 25, 1151-1156.
- Mattson, M.P., Rychlik, B., Cho, C., Christakos, S. (1991). Evidence for calcium-reducing and excitoprotective roles for the calcium-binding protein Calbindin-D 28k in cultured hippocampal neurons. *Neuron*, 6, 41-51.
- McIntosh, J.E., Bourdeau, J.E., Taylor, A.N. (1986). Immunohistochemical localization of calbindin-D28k during the development of the rat nephron. *Anat. Rec.*, 215, 383-389.
- Pochet, R., Pipeleers, D.G., Malaise, W.J. (1987). Calbindin D-27 kDa: preferential localization in non-B cells of the rat pancreas. *Biol. Cell.*, 61, 155-161.
- Pochet, R., Blachier, F., Malaisse, W., Parmentier, M., Pasteels, B., Pohl, V., Resibois, A., Rogers, J., Roman, A. (1989). Calbindin D 28 in mammalian brain, retina and endocrine pancreas: immunohistochemical comparison with calcitonin. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 255, 435-443.
- Rhoten, W.B., Christakos, S. (1990). Cellular gene expression for calbindin-D28K in mouse kidney. *Anat. Rec.*, 227, 145-151.
- Roth, J., Baetens, D., Norman, A.W., Garcia-segura, L.M. (1981). Specific neurons in chick central nervous system stain with an antibody against chick intestinal vitamin D-dependent calcium binding protein. *Brain Res.*, 222, 452-457.
- 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, 2216-2218.
- Sar, M., Stumpf, W.E., de Luca, H.F. (1980). Thyrotropes in the pituitary are target cells for 1,25-dihydroxy vitamin D₃. *Cell. Tiss. Res.*, 209, 161-166.
- Sloviter, R.S. (1989). Calcium-binding protein (Calbindin-D 28k) and parvalbumin immunohistochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J. Comp. Neurol.*, 282, 183-196.
- Shamley, D.R., Opperman, L.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.
- Shu, S., Ju, G., Fan, L. (1988). The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci. Lett.*, 85, 169-171.
- Stumpf, W.E., Sar, M., Reid, F.A. (1979). Target cells for 1,25-dihydroxy vitamin D₃ in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary and parathyroid. *Science*, 206, 1188-1190.
- Van, Baal, J., Yu, A., Hartog, A., Fransen, J.A., Willems, P.H., Lytton, J., Bindels, R.J. (1996). Localization and regulation by vitamin D of calcium transport proteins in rabbit cortical collecting system. *Am. J. Physiol.*, 271, 985-993.
- Verstappen, A., Parmentier, M., Chirioaga, M., Lawson, D.E.M., Pasteels, J.L., Pochet, R. (1986). Calcium binding protein immunoreactivity in human retina. *Ophthalmic Res.*, 18, 209-214.
- Wang, Y.Z., Christakos, S. (1995). Retinoic acid regulates the expression of the calcium binding protein, calbindin-D28K. *Mol. Endocrinol.*, 9, 1510-1521.
- Wasserman, R.H., Taylor, A.N. (1996). Vitamin D₃ induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa. *Science*, 152, 791-793.
- Wasserman, R.H., Fullimer, C.S., Taylor, A.N. (1978). Vitamin D dependent calcium binding proteins. In: Lawson DEM (ed) *Vitamin D*. Academic Press, London, 133-166.
- Windeck, R., Brown, E.M., Gardner, D.G., Aurbach, G.D. (1978). Effect of gastrointestinal hormones on isolated bovine parathyroid cells. *Endocrinology*, 103, 2020-2026.
- Zabel, M., Schafer, H. (1989). Immunocytochemical localization of vitamin D-dependent calcium-binding protein (calbindin) in thyroid parafollicular cells of guinea pig. *Bone Miner.*, 7, 107-112.