

Sudak Balığı (*Stizostedion lucioperca* L., 1758) Gastrointestinal Kanalı Mukozasındaki Bazı Peptitlerin İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu*

Kenan ÇINAR

Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Isparta - TÜRKİYE

Abdullah DİLER, Fuat BİLGİN

Süleyman Demirel Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Isparta - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 22.02.2000

Özet : Bu çalışmada Gastrin, Serotonin (5 HT), ve Cholecystokinin (CCK) antiserumlarına karşı spesifik immunreaktivite'lerin sudak balığı (*Stizostedion lucioperca*) sindirim kanalının bazı bölümlerindeki dağılımlarının belirlenmesi amaçlandı.

Mide, bağırsak ve pilorik keselerden alınan materyale Avidin-Biotin-Immuno-peroksidaz yöntemi uygulaması sonucunda tüm antiserumlara karşı immunreaktivite'ler (IR) yoğun biçimde bezlerde ve daha az olmak üzere lamina epitelyalis'teki hücrelerde gözlemlendi.

İmmunreaktif hücrelerin en yoğun olduğu bölgelerin ise fundus, pilorus, anterior bağırsak ve pilorik keseler olduğu saptandı. Belirtilen bölgelerdeki hücrelerin dışında daha az ve daha zayıf olmak üzere bazı antiserumlara karşı miyenterik plexus ve kas dokusuna ait sinir telleri ve gangliyon hücrelerinde de immunreaktivite belirlendi

Anahtar Sözcükler: Sudak balığı, Gastrointestinal kanal, Endokrin hücre, Peptit, İmmunohistokimya

Immunohistochemical Localization of some Peptides in the Gastrointestinal Tract Mucosa of Pike-perch (*Stizostedion lucioperca* L., 1758)

Abstract : In this study, our aim was to determine the distribution of specific immunoreactivities in some regions of the digestive tract of the pike-perch (*Stizostedion lucioperca*) against the antisera Gastrin, Serotonin (5 HT), and Cholecystokinin (CCK).

The samples were taken from the stomach, intestine and pyloric caeca and the Avidin-Biotin-Immuno-peroxidase method was applied. At the end of this application the immunoreactivities against all antisera were observed as intensively in the cells of the gland and less in the cells of Lamina epithelialis.

The most intensive regions of immunoreactive cells were determined as the fundus, pylorus, anterior intestine and pyloric caeca. Immunoreactivity was determined in the nerves belonging to the myenteric plexus and muscle tissue and also ganglion cells against some antisera to be less and poorer except cells in the mentioned regions.

Key Words: Pike-perch, Gastrointestinal tract, Endocrine cell, Peptide, Immunohistochemistry

Giriş

Diğer vertebralılarda olduğu gibi balıklarda da sindirim sisteminin fizyolojik aktiviteleri önemli ölçüde enterik nevröz sistem tarafından gerçekleştirilmektedir (1). Fizyolojik aktivitelerin oluşumunda aynı zamanda endokrin hücrelerin salgıları da etkili olmaktadır (2,3,4,5). Bu salgıları oluşturan hücrelerin (APUD hücre) çoğu amin öncülerini biriktirme ve aminoasitleri

dekarboksile edebilme yeteneğine sahiptirler (6,7). Aynı zamanda bu hücrelerin sinir ve ganglion hücreleri ile benzer salgılara sahip olmalarından ötürü embriyonal kökenlerinin Krista nöralis'e bağlı olabileceği ileri sürülmüştür (8,9). APUD karakter gösteren hücreler organizmada yaygın olarak bulunmaları nedeniyle DNES (Diffuse Neuro Endocrine Systems) adı verilen sisteme dahil edilmektedirler (10,11)

* Bu araştırma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (VHAG-1301).

DNES hücrelerinde ve diğer mukozal elemanlarda farklı yöntemlerle tespit edilen bazı peptitlerin dışında diğerlerinin memeli peptit zincirlerinin aksine uzun olduğu ve yüksek yapılı vertebralılarda bazı spesifik anti serumların uygulanması sonucunda yaklaşık olarak ilişkili bir peptit dahi olsa belirlenmelerinin zor olacağı bildirilmiştir (12). Ayrıca bu tür çalışmalarda başta fiksasyon olmak üzere antiserum dilüsyonu, heterojenitesi ve spesifitesi ile çalışılan türlerin dikkatli biçimde göz önüne alınmasının gerekliliği vurgulanarak (13), memeli ve reptil dokuları ile yapılan absorpsiyon kontrollerinin balıklardaki peptitlerin farklılığını gösterdiği ileri sürülmektedir (2). Buna rağmen balıklardan elde edilen pozitif sonuçların memelilere ait sonuçlarla yapısal bir ilişkiyi vurguladığı (14), peptit aminoasit dizilimlerinin az yada çok farklılıklar göstermesine karşılık benzerliklerin de bulunduğu belirtilmektedir (15). Bu durum antiserumun, peptidin NH₂ ya da COOH terminaliyle olan reaksiyonuyla (14) farklılık gösterebileceği gibi, bir hücrede birden fazla peptidin bulunabileceği (1,2) ya da evrimsel gelişim açısından aynı hücrede ortak kökene sahip peptitlerin yer alabileceği (15,16) tarzında yorumlanmaktadır. Diğer taraftan bir antiserumun antikör için orjinal bir haptene ile identik olmayan bir peptiti tanıyabilmesinden dolayı antikör ile tanıma sonuçlarının genelde bir maddeye özgü "immünoaktivite"den çok farklı bir ilişkiyi ortaya çıkardığı öne sürülmektedir. "İmmünoaktivite benzeri" olarak tanımlanan bu durumun sindirim kanalının değişik bölgelerinde bazı peptitlerin ortaya çıkardıkları farklı etkilerle fizyolojik olarak kendini gösterdiği bildirilmiştir (5). Böylece farklı türlere ait sindirim kanalı bölgelerinde bazı antiserumların etkili olmadıkları ancak antiseruma spesifik peptidin balığa uygulanmasında beklenen innervasyonların olduğu bildirilmiştir (12). Öte yandan balıklarda tespit edilen bazı peptitlerin etkilerinin başka bir organizmada farklı etkiler oluşturduğu bildirilmiştir (5,16).

Bu çalışma ile embriyonal kökenlerinin dışında endokrin ve parakrin fonksiyonlardaki etkileri konusunda belirsizliklerin bulunduğu sindirim kanalı peptitlerinden Gastrin, Serotonin (5 HT), ve Cholecystokin (CCK) in sudak balığının (*Stizostedion lucioperca*) mide, pilorik kese ve bağırsaklarındaki lokalizasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Yapılan çalışmada 40 adet sudak balığına (*Stizostedion lucioperca*) ait mide, pilorik kese ve bağırsak materyal olarak kullanıldı. Midenin özofagus ve bağırsağa komşu kısımları (kardia ve pilorus), fundus bölgesi ile bağırsakların anterior ve posteriorundan ve pilorik kör keselerinden alınan örnekler Bouin solusyonunda 12 saat süreyle tespit edildi. Rutin histolojik doku takibinden geçirilen örnekler parafinde bloklandı. Parafin bloklardan 6-7 mikron kalınlığında alınan kesitlere Hsu ve ark., (17) tarafından modifiye edilen Avidin-Biotin-Immunoperoxidase metodu uygulandı. Bu metoda göre ksilol ve alkollerden geçirilen kesitler suda yıkandıktan sonra hidrojen peroksit (H₂O₂) solusyonuna (%30'luk H₂O₂ 5 ml/ 300 ml Metanol) alındı. %0.9 NaCl ve %5 Normal Sheep Serum (S-3772 Sigma) içeren Tris buffer solusyonundan (0.05 M, pH:7.6) geçirilen kesitlere daha sonra Normal Sheep Serumu uygulandı. Kesitler ayrı ayrı Tablo 1'de isim ve dilüsyonları verilen antiserumlarda +4°C'de 18-24 saat süreyle tutuldu. Sonraki aşamalarda sırasıyla Biotin Conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (B-8895 Sigma-1/500), Avidin-Peroxidase Kompleksi (A-3151 Sigma-1/2500) uygulandı. Hanker-Yates (80 µl H₂O₂ ilave edilmiş 5 ml Tris buffer'da 7.5 mg Hanker-Yates) boyasına tabi tutulan kesitler tris buffer'da yıkanarak alkol ve ksilollerden geçirilip entellan ile kapatıldı.

Bulgular

Antiserum uygulamalarında genel olarak yoğun bir şekilde bezlerde ve Lamina epitelyalis'teki hücrelerde

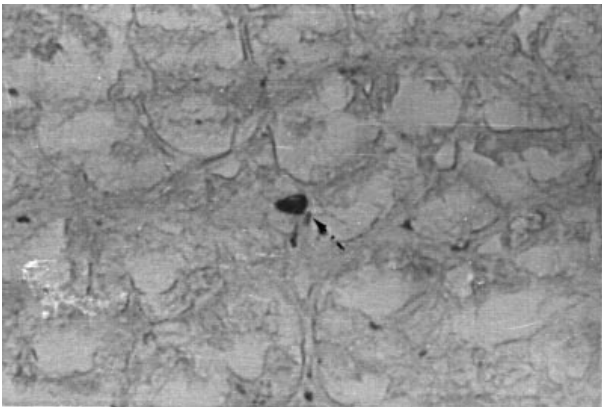
Uygulanan Antiserumlar	Ürün No.	Çalışma Dilüsyonu
Rabbit Anti-Gastrin	G-0785(Sigma)	1:500
Rabbit Anti-Cholecystokin (26-33) (CCK8)	C-2581 (Sigma)	1:500
Rabbit Anti-Serotonin (5HT)	S-5545(Sigma)	1:200

Tablo 1. Uygulanan antiserumlar ve dilüsyonları.

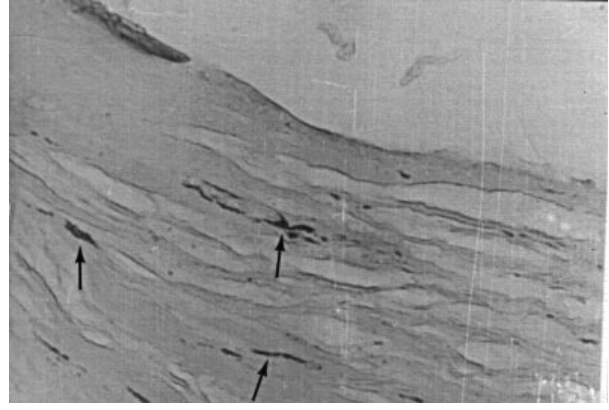
gözlenen immunreaktivite (IR)'ler aynı zamanda plexus miyenterikus sinir telleri, gangliyon hücreleri, bazı bağ dokusu hücreleri ve düz kas dokularında da tespit edildi. Genelde Tunika muskularis'e yakın bezlerde Lamina epiteliyalis'tekilere göre daha yoğun olarak buldukları belirlenen farklı immunreaktif hücrelerin yine farklı sayı ve dağılıma sahip oldukları saptandı. Bazı bölgelerdeki Lamina epiteliyalis'lerde apikale doğru daralan tarzda görünüme sahip olan farklı immunreaktif hücrelere rastlanmasına karşılık bu hücrelerin lumenle ilişkisi kesin olarak tespit edilemedi. Ancak, bu hücrelerin lumenle ilişkili "açık tip hücre" olabileceği düşünüldü.

Cholecystokin (CCK) İmmunreaktivitesi

Fundus bezlerinde yoğun bir dağılım gösterdiği saptanan CCK immunreaktif hücrelerin oval ya da düzensiz ve nadiren üçgen biçimli oldukları belirlendi (Şekil 1). CCK immunreaktif hücrelere fundus L. epiteliyalis'i ve pilorus bezlerinde az sayıda rastlanırken, pilorus L. epiteliyalis'indeki CCK immunreaktif hücre yoğunluğunun fundus'a göre çok daha az olduğu gözlemlendi. Buradaki bazı CCK immunreaktif hücrelerin apikale doğru daralarak uzandığı saptandı. Çoğunlukla oval, bazen de üçgenimsi yapıya sahip immunreaktif CCK hücreleri anterior bağırsağın bezlerinde yoğun bir popülasyon oluştururken, aynı bölge ile birlikte pilorik keselerin bez ve L. epiteliyalis'lerinde daha az sayıda oldukları gözlemlendi. Anterior bağırsak ve pilorik keselerin epitellerindeki hücrelerden farklı olarak CCK-IR'si gösteren hücrelerin pilorik keselerin bezlerinde düzensiz bir yapıda oldukları belirlendi. Anterior bağırsak miyenterik plexus sinir telleri ile düz kas dokusunda (Şekil 2) ve pilorik keselere ait submukoza'daki bazı bağ dokusu hücrelerinde de CCK-IR'sine rastlandı. Bu IR,



Şekil 1. Fundus.Bezde üçgen görünümlü CCK immunreaktif hücre (Ok).x600.

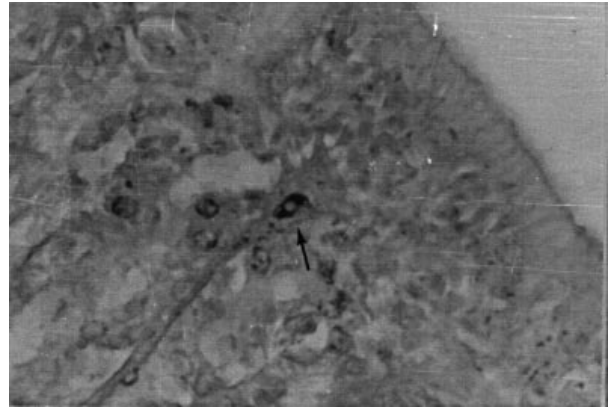


Şekil 2. Anterior bağırsak. Düz kas dokusunda CCK immunreaktivitesi (Oklar).x700.

kardia bölgesinde ve posterior bağırsaklarda tespit edilemedi.

Gastrin İmmunreaktivitesi

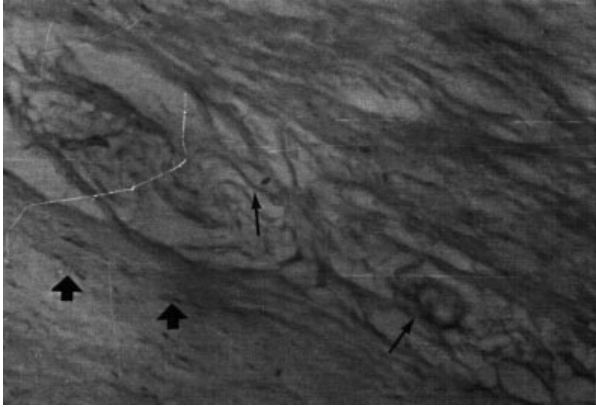
Posterior bağırsakta gözlenmeyen gastrin IR'si fundus'un L. epiteliyalis ve bezlerindeki çok sayıdaki hücrede belirlendi. Özellikle fundus bezlerinde daha yoğun olarak buldukları tespit edilen bu hücrelerin düzensiz biçimli (Şekil 3), oval ve bazen de üçgenimsi; L. epiteliyalis'te ise bu yapıya benzer olanların dışında şişe benzeri görünüme sahip oldukları saptandı. Kardia ve pilorus L. epiteliyalis'inde de fundus L. epiteliyalis'ine göre daha az sayıda rastlanan gastrin immunreaktif hücrelerin bu bölgedeki hücrelerle benzer morfolojik karaktere sahip oldukları belirlendi.



Şekil 3. Fundus.Bezde düzensiz şekilli gastrin immunreaktif hücre (Ok).x700.

Anterior bağırsak bezlerinde ve L.epiteliyalis'lerinde az sayıda gözlenen immunreaktif hücrelerin çoğunlukla oval

nadiren de üçgen görünümlü oldukları saptandı. Bu bölgede aynı zamanda düz kas dokusunda ve sinir tellerinde de zayıf gastrin IR'sine rastlandı (Şekil 4).



Şekil 4. Anterior bağırsak. Miyenterik pleksüs sinir tellerinde (ince oklar) ve düz kas dokusunda (kalın oklar) zayıf gastrin immunreaktivitesi.x700.

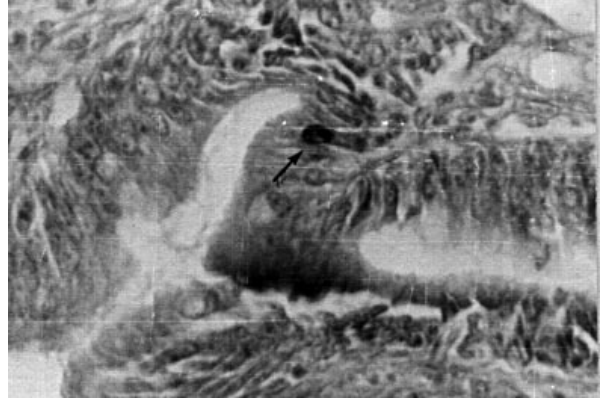
Pilorik keselerde ise diğer bölgelere göre az sayıda gastrin immunreaktif hücrelerine hem bez hem de L. epitelyalis'de rastlandı. Villusların arasındaki L. epitelyalis'teki gastrin immunreaktif hücre popülasyonunun yüzeye göre daha yoğun olduğu saptandı. Üçgen ya da oval yapılı bu hücrelerin dışında ayrıca bağ dokusuna ait az sayıda hücrede de gastrin IR'si belirlendi.

Serotonin (5-HT) İmmunreaktivitesi

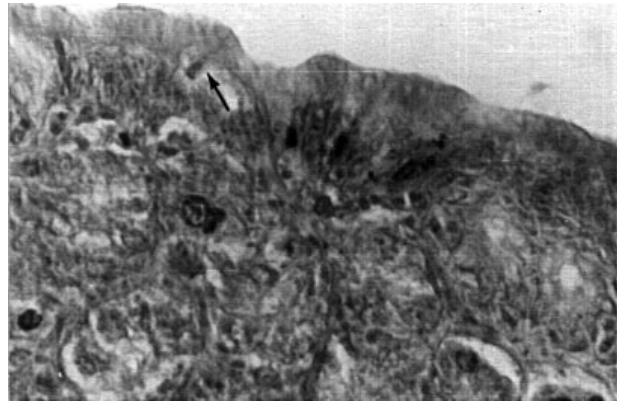
Bu IR'ye posterior bağırsaklar dışındaki bütün bölgelerde rastlandı. Fundus ve pilorus'un bez ve L. epitelyalis'i ile anterior bağırsakların bezlerinde diğer bölgelere göre daha yoğun bir 5-HT immunreaktif hücre popülasyonuna rastlandı. Kardia L. epitelyalis'inde ise diğer bölgelere göre çok az sayıda 5-HT immunreaktif hücrenin bulunduğu belirlendi. Morfolojik görünüm itibarıyla bu hücrelerin fundus bezlerinde ve L. epitelyalis'inde oval (Şekil 5) ve üçgenimsi (Şekil 6), bazen de L. epitelyalis'de bu tiplere ek olarak apikale doğru daraldıkları saptandı.

Pilorik keselerin bez ve L. epitelyalis'inde de geniş bir yayılım gösterdiği belirlenen 5-HT immunreaktif hücrelerin diğer bölgelerdeki hücrelerle benzer morfolojik yapıya sahip oldukları gözlemlendi.

Bu tip IR aynı zamanda fundus, pilorus ve pilorik keselerin miyenterik pleksüs sinir telleri ve gangliyon



Şekil 5. Fundus.Bezde oval görünümlü 5 HT immunreaktif hücre (Ok).x700.



Şekil 6. Fundus.L. epitelyalis'de üçgen görünümlü 5 HT immunreaktif hücre (Ok).x700.

hücreleri ile fundus ve pilorus'un kan damarları çevresinde de zayıf biçimde tespit edildi.

Tartışma ve Sonuç

Bazı peptitlerin farklı formları da dikkate alınmak suretiyle balık türlerinin sindirim kanalı mukozalarında çoğunlukla immunohistokimyasal (Peroxidase-Anti peroxidase ve Avidin Biotin Immunoperoxidase) yöntemlerinin (12,13,14,15) uygulanması sonucu yaklaşık 30 adet peptitin varlığı saptanmıştır.

İmmunohistokimyasal teknik uygulamalarında spesifik antiserumlara karşı IR gösteren mukozal elemanların sindirim kanalında yerleşimlerinin dışında, IR yoğunluklarının da bölgesel farklılık gösterdiği bildirilmiştir (12,13). Bu çalışmada uygulanan antiserumlara karşı IR gösteren hücrelerin genelde

bezlerde yer alıp yoğun bir IR özelliğine sahip oldukları, buna karşılık pleksuslardaki IR'nin daha zayıf olduğu ya da hiç bulunmadığı saptanmıştır.

Cholecystokin(CCK) İmmunreaktivitesi

Gastrinle benzer COOH-terminal penta peptit ve amino asit sıralanışına sahip olduğu bildirilen CCK'nın (2,15,18) aynı zamanda biyolojik ve immunolojik aktivite yönüyle de gastrine benzediği ve her iki peptitin sindirimin düzenlenmesinde anahtar rolünde olduğu belirtilmektedir (16). İki peptit arasındaki bu benzerlik ise ortak kökene sahip bir moleküle bağlanmaktadır (2).

Bu peptitin CCK-8 formuna özgü antiserumu ile *Oncorhynchus mykiss*'in pilorus bölgesinde (2), CCK-4 ve CCK-8 ile *Gadus morhua*'nın kardias ve pilorus'unda (19) ve *Salmo gairdneri*'nin fundus bölgesinde (16) saptandığı bildirilen CCK immunreaktif hücreler, bu çalışmada pilorus ve fundus'ta tespit edildi. Rajjo ve ark. (20) ise *Amia calva* ve *Lepomis macrochirus* midelerinde bu IR'yi gösteren hücrelerin bulunmadığını ileri sürmüşlerdir.

Bağırsakların anterior kısmında yoğun bir şekilde buldukları saptanan CCK immunreaktif hücrelerin, aynı zamanda *Amia calva* ve *Lepomis macrochirus* (20) ile *Oncorhynchus mykiss* (22), *Scyliorhinus stellaris* (23) ve *Sparus auratus* (14) türlerinin bağırsaklarında da bulunduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada bağırsakların sinir telleri ve kas dokularında tespit edilen CCK IR'sinin *Scyliorhinus stellaris*'te de gözleendiği belirtilmektedir (23).

Pilorik keselerde gözlenen CCK immunreaktif hücrelerin ise *Oncorhynchus mykiss* (24), *Lepomis macrochirus* (20) ve *Sparus auratus*'da da (14) saptandığı bildirilmiştir.

Gastrin İmmunreaktivitesi

Gastrik asit sekresyonu için güçlü bir uyarıcı peptit olan gastrin (25) bu çalışmada kullanılan gastrin 1 antiserumunun uygulanması sonucunda midenin bütün bölgelerindeki bez ve L. epitelyalis'lerinde gözleendi. Gastrin 3 formundaki antiserumun uygulandığı *Gadus morhua* türünde bu immunreaktif hücrelerin midenin kardias ve pilorus'unda (19), gastrin 17 ve 34 formlarının uygulandığı *Oncorhynchus mykiss*'in pilorus'unda (2) gözleendiği belirtilirken, gastrin 4 formu uygulamasında *Squalus acanthias* (26) ile gastrin 1 ve 34 uygulanan *Sparus auratus*'da (14) bölgesel fark belirtilmeksizin midenin tümünde gastrin immunreaktif hücrelerin

bulduğu belirtilmiştir. *Gadus morhua*'nın mide miyenterik pleksuslarında da gözleendiği bildirilen IR (18), bu çalışmada saptanamamıştır.

Farklı formlardaki gastrin antiserumu uygulamaları sonucunda çok sayıda araştırmacı bağırsakların belli bölgeleri ya da tamamında gastrin IR'si tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada sadece anterior bağırsak bezlerinde az sayıda gözlenen gastrin immunreaktif hücrelerin, *Sparus auratus* (14), *Oncorhynchus mykiss* (24) ve *Squalus acanthias* (26) bağırsaklarının tamamında yerleşim gösterdikleri belirtilmektedir. Öte yandan bu IR'yi gösteren hücrelerin *Gadus morhua*'da (18) bağırsakların başlangıcında, *Poecilia reticulata*'da ilk 2/3'ünde ve *Leuciscus idus melanatus*'da ilk ve son kısımlarında (1) yaygın olarak buldukları saptanmıştır. Bu çalışmada, aynı zamanda *Leuciscus idus melanatus* (1) ve *Squalus acanthias*'da (26) elde edilen bulgularla benzer şekilde anterior bağırsaklarda immunreaktif sinir tellerinin varlığı gösterilmiştir.

Pilorik keselerin epitel ve bezlerinde gözlenen gastrin immunreaktif hücrelerin, *Oncorhynchus mykiss*'te de (22) bulunduğu bildirilmektedir.

Serotonin (5 HT) İmmunreaktivitesi

Memelilerde olduğu gibi balıklarda da sindirim kanalı düz kaslarının kontraksiyonunu sağlamakla görevli olan serotonin'i (1,25,27,28) içeren bazı hücrelerin aynı zamanda lumenle ilişkili olup Sub P ve CCK 8 antiserumları ile de reaksiyon gösterdikleri belirtilmiştir (2). Öte yandan sindirim sisteminin tamamında 5 HT-immunreaktif hücrelerinin hiç bulunmaması ya da az sayıda oluşu, buna karşılık immunreaktif sinir hücresi ve tellerinin geniş bir yayılım göstermesi arasında ters bir ilişkinin bulunduğu bildirilmektedir (26,28,29). Bu ilişkiye bağlı olarak da 5-HT immunreaktif nöronların, 5-HT immunreaktif hücrelerin görevlerini üstlendiği ileri sürülmüştür (29).

5-HT immunreaktif hücrelerin *Oncorhynchus mykiss* midesinin pilorus ve fundus bölgelerinde bulunduğu belirtilirken (2) bu hücrelerin *Salmo gairdneri* (27,29), *Squalus acanthias* (26) ile *Rhombosolea tapirina* ve *Ammotretis rostrata* (30) türlerine ait midelerin bütün bölgelerinde dağılım gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada da 5-HT immunreaktif hücrelerin midenin tamamındaki L. epitelyalis ve bezlerde yerleştikleri saptanmıştır. *Squalus acanthias* (26) türünde belirtildiği gibi bu çalışmada da fundus ve pilorus mukozalarının kan damarları çevresinde

ve pleksus miyenterikus sinir telleri ve gangliyon hücrelerinde 5-HT-IR'si gözlemlendi.

Salmo gairdneri (31) bağırsağında bulunmadığı belirtilen 5-HT immunreaktif hücrelerin *Squalus acanthias* (26) türünün kalın bağırsağında ve *Oncorhynchus mykiss* (24) bağırsağının bütün bölümlerinde yayılım gösterdikleri belirtilmiştir. Bu çalışmada ise 5-HT immunreaktif hücrelerinin *Leuciscus idus melanatus* (1) türünde olduğu gibi sadece anterior bağırsakta bulunduğu saptanmıştır. Bağırsak pleksus miyenterikus'larında bu tür IR'nin bulunduğu bildirilmesine rağmen (1,26,29) bu çalışmada belirtilen bölgede IR gözlenmemiştir.

Oncorhynchus mykiss (22) türünden elde edilen bulgularla uyumlu olarak bu çalışmada da pilorik keselerdeki bezler ve L.epiteliyalis'deki hücreler ile pleksus miyenterikus sinir tellerinde 5-HT IR'si saptanmıştır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre: oluşan immunreaktivelerin, bu türün sindirim kanalının çalışılan tüm bölgelerinde yayılım gösterdiği ve bu immunreaktivelerin çoğunlukla ve daha yoğun olmak

üzere L.epiteliyalis ve bezlerdeki hücrelerde gerçekleştiği görülmektedir. Kullanılan 6 tip memeli antiserumun bir çok balık türünde olduğu gibi sudak balığı (*Stizostedion lucioperca*) sindirim kanalının bazı bölümlerindeki hücre ya da sinir teli ve gangliyon hücrelerinde de immunreaktivite sağlamalarından dolayı memeli-balık sindirim kanalı peptitlerinin benzer bir yapıya sahip olabileceğini göstermektedir. Ancak, spesifik antiserumların balıklardan elde edilmemiş olması, yine de evrimsel açıdan aşağı sınıf vertebralılar olan balıklardaki bu peptitlerin biyokimyasal yönleriyle memelilerdekinden farklı karakterde olabilecekleri kuşkusunu da doğurmaktadır. Ayrıca bu çalışmada Gastrin, CCK ve 5-HT içerdikleri saptanan immunreaktif hücrelerdeki ortak peptitlerin belirlenmesi yoluna gidilememiştir. Buna göre antiserum çeşidinin fazlaştırılması ve bunun da ötesinde belirli antiserumların farklı formlarının da kullanılacağı daha ileri çalışmalara gerek olduğu kanısına varıldı. Öte yandan bu tür çalışmalarda peptitlerin belirlenmesine yönelik farklı birkaç yöntemin birlikte uygulanması ve peptit demonstrasyonlarının absorpsiyon kontrollerinin de kesinlikle yapılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Kaynaklar

1. Holm, P.B., Holmgren, S.: A Comparative study of neuropeptides in the intestine of two stomachless teleost (PoeciliOa reticulata, *Leuciscus idus melanatus*) under conditions of feeding and starvation, *Cell Tissue Res.*1989; 255, 245-254.
2. Barrenechea, M.A., Lopez, J., Martinez, A.: Regulatory peptides in gastric endocrine cells of the Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: General distribution and co-localizations, *Tissue and Cell.*1994; 26 (3), 309-321.
3. Holstein, B.: Effect of Vasoactive Intestinal Polypeptide on gastric acid secretion and mucosal blood flow in the Atlantic cod, *Gadus morhua*, *Gen. Comp. Endocrinol.*1983; 52, 471-473.
4. Said, S. I.: Isolation, Localization and Characterization of Gastrointestinal Peptides, *Clinical Biochemistry.*1984; 17, 65-67.
5. Holmgren, S., Jönsson, A.C.: Occurrence and effect on motility of Vasoactive Intestinal Polypeptide in the digestive tract of a Holosteon and a Teleosteon fish, *Comp. Biochem. Physiol.*1989; 94 C(2), 411-418.
6. Vassalo, G., Solcia, E., Capella, C.: Light and electron microscopic identification of several types of endocrine cells in the gastrointestinal mucosa of the cat, *Z. Zellforsch.* 1969; 98, 333-356.
7. Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.D.: *Basic Histology*, 8th Ed., Appleton and Lange, USA, 1992; pp.600.
8. Pearse, A. G. E.: The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone producing cells of the APUD series and embryologic, physiologic and pathologic implication of the concept, *J. Histochem. Cytochem.* 1969; 17, 303.
9. Abrahamson, T., Holmgren, S., Nilsson, S., Peterson, K.: On the chromaffin system of the African Lungfish, *Protopterus aethiopicus*, *Acta Physiol. Scand.*1979; 107, 135-139 .
10. Fujita, T.: The gastroenteric endocrine cells and its paraneurotic nature. In: Coupland R E., Fujita T., Chromaffin, Enterochromaffin and Related cells, Elsevier, Amsterdam, 1976; pp:204-208.
11. Rodrigues, A., Pena, L., Flores, J M., Gonzales, M., Castano, M.: Immunocytochemical study of diffuse neuroendocrine system cells in Equine lungs, *Anat. Histol. Embryol.* 1992; 21,(2), 138-45.
12. Rajjo, I M., Vigna, S R., Crim, J W.: Immunocytochemical localization of Bombesin-Like Peptides in the digestive tract of the Bowfin, *Amia calva*, *Comp. Biochem. Physiol.*,(1989); 94 C, 405-9.
13. Larsson, L.I., Polak, J M., Buffa, R., Sundler, F., Solcia, E.: On the immunocytochemical localization of Vasoactive Intestinal Polypeptide, *J. of Histochem. And Cytochem.*1979; 27(5), 936-38.
14. Elbal, M. T., Agulleiro, B. A.: A histochemical and ultrastructural study of the gut of *Sparus auratus* (Teleostei), *Jour. Submicrosc. Cytol.*1986; 18(2), 335-47.

15. Larsson, L. I., Rehfeld, J. F.: Evidence for a common evolutionary origin of gastrin and cholecystokinin. *Nature*.1979; 269, 335-38.
16. Vigna, S.R.: Evolution of endocrine regulation of gastrointestinal function in lower Vertebrates, *Amer. Zool.*1983; 23, 729-38.
17. Hsu, S. M., Raine, L., Fanger, H.: Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: A comparison between ABC and Unlabeled Antibody (PAP) Procedures, *The J. of Histochem. And Cytochem.*1981;29(4),577-580.
18. Jönsson, A. C., Holmgren, S., Holstein, B.: Gastrin/CCK-like immunoreactivity in endocrine cells and nerves in the gastrointestinal tract of the cod, *Gadus morhua* and the effect of peptides of the Gastrin/CCK family on cod gastrointestinal smooth muscle, *Gen. Comp. Endocrinol.*1987; 66,190-202.
19. Jensen, J., Holmgren, S., Johnson, A.: Substance P-like immunoreactivity and the effects of tachykinins in the intestine of the Atlantic cod, *Gadus morhua*, *J. Auton. Nerv. Syst.*1987; 20, 25-30.
20. Rajjo, I. M., Vigna, S. R., Crim, J. W.: Cholecystokinin immunoreactivity in the digestive tract of bowfin (*Amia calva*), bluegill (*Lepomis macrochirus*) and bullfrog (*Rana catesbeiana*), *Gen. and Comp. Endocrinol.*1988; 70, 133-44.
21. Vigna, S. R., Fischer, B. L., Morgan, J. L. M., Rosenquist, G. L.: Distribution and molecular heterogeneity of cholecystokinin like immunoreactive peptides in the brain and gut of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, *Comp. Biochem. Physiol.*1985; 82 C, 143-46.
22. Boerlegui, C., Martinez, A., Sesma, P.: Endocrine cells and nerves in the pyloric caeca and intestine of *Oncorhynchus mykiss* (Teleostei): an immunocytochemical study, *Gen. Comp. Endocrinol.*1992a; 86, 483-95.
23. Cimini, V., Noorden, S., Nardini, V.: Peptides of the gastrointestinal tract of the dogfish (*Scyliorhinus stellaris*), 8th Int. Symp. on Morphological Sciences, Rome-Italy, 1989; pp:146-57.
24. Boerlegui, C., Martinez, A., Sesma, P.: Some peptide-like colocalizations in endocrine cells of pyloric caeca and the intestine of *Oncorhynchus mykiss* (Teleostei), *Cell Tissue Res.*1992b; 269, 353-57.
25. Holmgren, S., Jönsson, A. C., Holstein, B.: Gastrointestinal peptides in fish. In: Nilsson S., Holmgren S., (eds.) *Fish Physiology: Recent advances* Crom Helm, New Hampshire, 1986; pp: 119-39.
26. Holmgren, S., Nilsson, S.: Bombesin-gastrin/CCK-5-hydroxytryptamine-neurotensin-somatostatin and VIP-like immunoreactivity and catecholamine fluorescence in the gut of elasmobranch, *Squalus acanthias*, *Cell Tissue Res.*1983; 234, 595-618.
27. Holmgren, S.: The effects of putative non-adrenergic, non-cholinergic autonomic transmitters on isolated strips from the stomach of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, *Comp. Biochem. Physiol.*1983; 74,229-38, (1983)
28. Anderson, C.: Evidence for 5-HT-containing intrinsic neurons in the teleost intestine, *Cell Tissue Res.*1983; 230, 377-86.
29. Anderson, C., Campbell, G.: Immunohistochemical study of 5-HT containing neurons in the teleost intestine: relationship to the presence of enterochromaffin cells, *Cell Tissue Res.*1988; 254, 553-59.
30. Grove, D. J., Campbell, G.: The role of extrinsic and intrinsic nerves in the coordination of gut motility in the stomachless flat fish, *Rhombosolea tapirina* and *Ammotretis rostrata*, *Guenter. Comp. Biochem. Physiol.*1979; 63C, 143-159.
31. Holmgren, S., Grove, D. J., Nilsson, S.: Substance P acts by releasing 5-HT from enteric neurons in the stomach of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, *Neuroscience*, 1985a; 14, 683-93.