

## Koyun (*Ovis aries*) Trakea Mukozasındaki Bazı Peptidlerin İmmunohistokimyasal Lokalizasyonları

Ruaa Hussein NADA<sup>1</sup>, Kenan ÇINAR<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 32260, Isparta

(Alınış / Received: 21.03.2017, Kabul / Accepted: 18.10.2017, Online Yayınlanma / Published Online: 12.12.2017)

### Anahtar Kelimeler

Trakea,  
Mukoza,  
İmmunohistokimya,  
Galanin,  
Peptide Histidin İzolösün,  
Leu-Enkefalin

**Özet:** Bu çalışmada, koyun (*Ovis aries*), (alt ve üst) trake mukozasında GAL (Galanin), PHI (Peptit Histidin İzolösün) ve Leu-Enk (Leu-Enkefalin) peptitlerinin immunohistokimyasal lokalizasyonlarının belirlenmesi amaçlandı. Üst trake lamina epitelyalisindeki GAL, PHI ve Leu-ENK immunoreaktif hücrelerin yoğunluğunun alt trakeye göre daha fazla olduğu saptandı. PHI immunoreaktif hücrelerin ise üst trake lamina epitelyalisinde diğer peptidlere göre daha fazla sayıda bulunduğu belirlendi. GAL, PHI ve Leu-ENK immunoreaktivitesine aynı zamanda düz kas, serömuköz bez hücreleri, bu bezler ile kan damarları çevresinde ve gangliyon hücrelerinde de rastlandı. Sonuç olarak GAL, Leu-ENK ve PHI'nın geniş mukozal dağılımının, memeli solunum sistemindeki vasküler ve sekretuar fonksiyonların düzenlenmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Solunum yolu epitellerinde bulunan GAL, PHI ve ENK peptidleri, düzenleyici peptid hormonların ya da nörotransmitterlerin lokal olarak harekete geçirilmesinde de etkili olabilirler.

## The Immunohistochemical Localization of Some Peptides in Sheep (*Ovis aries*) Tracheal Mucosa

### Keywords

Rachea,  
Mucosa,  
Immunohistochemistry,  
Galanin,  
Peptide Histidin Isoleucine,  
Leu-Enkephalin,

**Abstract:** This study aimed to determine immunohistochemical localization of the peptides Galanin (GAL), Peptide Histidin Isoleucine (PHI) and Leu-Enkephalin (Leu-ENK) in tracheal mucosa (upper and lower) of sheep (*Ovis aries*). It was observed that GAL, PHI and Leu-ENK immunoreactive cells were more numerous in the upper part of trachea than in its lower part. It was found that PHI-immunoreactive cells were more than other peptides in lamina epithelialis in upper trachea. GAL, PHI and Leu-ENK immunoreactivity was detected in smooth muscles, seromucous gland cells, around blood vessels and in ganglion cells. In conclusion, it is thought that wide-ranging mucosal distribution of GAL, Leu-ENK and PHI may have effective in regulating the vascular and secretory functions in mammalian respiratory system. Existence of the peptides GAL, PHI and Leu-ENK in the airway epithelium suggests that they may also be effective in acting as regulatory peptides, local hormones or neurotransmitters.

### 1. Giriş

Nöronlarla bazı ortak düzenleyici faktörlere (nörotransmitter) sahip oldukları için nörosekretör özellikler taşıyan pulmonar nöroendokrin hücreler zengin bir innervasyona sahiptirler [1]. Solunum-benzeri sistemlerdeki nöroendokrin hücreler amfibi, sürüngen, kuş ve memeli türlerinde ve hatta balıkların solungaçlarında tespit edilmiştir [2]. Ayrıca solunum yollarının lümenine doğru çıkıntı yapan yüzeylerindeki kinosilyuların yanı sıra trakeal ve bronşiyal dallanmalar ve bronkoalveolar kavşaklarda NEC'lerin (nöroendokrin hücre) ve NEB'lerin

(nöroendokrin cisim) baskın olarak bulunması solunan gaz kompozisyonuna duyarlı olan kimyasal reseptörler olarak iş gördüklerine işaret etmektedir [3]. Galanin, embriyoda en erken gözlenen nöropeptidlerden birisi olup [4] beslenme, ruhsal durumun düzenlenmesi ve kan basıncının ayarlanması gibi farklı birçok biyolojik işlev yapmaktadır. Aynı zamanda gelişimde önemli roller oynar ve trofik bir faktör olarak iş görebilir. Epilepsi, depresyon ve beslenme bozuklukları gibi birçok hastalıkla bağlantılıdır [5]. Bazı kanıtlar Galaninin bazal ön-beyin kolinerjik aktivitenin inhibitör modülasyonu sayesinde hafıza ve dikkat gibi bilişsel

işlemlerde kritik bir rol oynayabildiği göstermektedir. Ayrıca Galanın içeren fibriller Alzheimer hastalığında kalan bazal ön beyindeki kolinerjik nöronları aşırı derecede inerve eder [6]. Galanın pozitif sinir fibrillerinin domuz, kobay, rat ve köpekte [7] solunum sisteminin bazı kısımlarındaki kan damarları etrafında, bezlerde ve düz kaslarda lokalize olduğu gözlenmiştir.

PHI solunum sisteminde düz kas aktivitesi de dahil olmak üzere bir çok düzenleme işlevine sahiptir [8,9]. Solunum sisteminde VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) ile birlikte yer alırlar ve uyarıya yanıt olarak birlikte salgılanırlar [10,11,12]. PHI immünoreaktif sinirler solunum yollarındaki düz kasları, bronş ve pulmonar damarları, submukozal bezleri ve solunum yollarındaki gangliyonları desteklemektedir [13].

PHI immünoreaktivite düzeyi solunum kanalındaki VIP immünoreaktivitesine büyük benzerlik göstermektedir [14]. VIP'in yanı sıra PHI'nın da solunum kanalındaki adrenerjik ve kolinerjik olmayan inhibitör nöronların bir nörotransmitteri olduğu düşünülmektedir [15]. PHI, VIP'e göre pulmonar genişletici olarak ciddi ölçüde daha az etkindir ve VIP gibi endotel hücrelerinden bağımsız olarak etkilerini göstermektedir [16]. VIP [17] ve PHI [18] solunum yollarındaki parasempatik perivasküler sinirlerde birlikte bulunmaktadır [13].

Met-Enk (methionine-enkephalin) ve Leu-Enk (Leucine Enkephalin) morfin benzeri ağrı kesici etkilerinden dolayı opioid reseptörler olarak bilinmektedirler. Mide, dalak deri ve sinir sistemi haricindeki dokulara benzer şekilde opioid sistemin bazı bileşenleri akciğerlerde de gösterilmiştir [19,20]. Leu-enkefalin immünoreaktivitesi, periferik hava yolları epitelindeki dağılım gösteren sadece birkaç tekli hücrede tespit edilmiştir [21]. Diğer taraftan *Discoglossus pictus* türünde [22] fibro-musküler tabaka boyunca leu-enkefalin pozitif sinir fibrilleri saptanmış ve kıkırdak ile larinks silli epitelin arasında ağlar oluşturduğu gözlenmiştir. Aynı çalışmada *Rana esculenta* akciğerinde Leu-5-enkefalin immun-boyanması primer septumu örten siliomüköz epitelin submukozal tabakasındaki sinir uçlarında gözlenmiştir.

Önemli fizyolojik rollere sahip bu üç peptitin koyun trakeasındaki dağılımına yönelik çalışmanın bulunmaması konunun önemini arttırmaktadır.

Bu çalışmada koyun (*Ovis aries*) trake (alt ve üst) mukozasında Galanin (GAL), Leucine-enkephalin (Leu-Enk) ve Peptide Histidine İsoleucine (PHI)'nin yerleşimlerinin immünohistokimyasal olarak belirlenmesi amaçlandı.

## 2. Materyal ve Metot

Çalışmada 10 adet koyun (*Ovis aries*) trakesinin üst ve alt kısımlarından alınan doku örnekleri materyal

olarak kullanıldı. Dokular Bouin solüsyonunda 18-24 saat süreyle tespit edildi. Daha sonra alkol serisinden (%50, %70, %80, %90, %100(I), %100(II), %100(III) alkol) geçirilerek dehidre edildi. Örnekler ksilolde şeffaflaştırılarak parafine gömüldü ve bloklandı. Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında alınan kesitlere immunoreaktivitenin belirlenmesi amacıyla PAP (Peroxidase anti-Peroxidase) yöntemi [23] uygulandı. Bu yöntemde göre kesitler ksilol ve alkol serilerinden geçirildikten sonra %0,3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) solüsyonunda 20 dakika bekletildi. 0,01M PBS (pH 7.4)'de yıkandı. Normal goat serum (703404, Novocastra) solüsyonunda 30 dakika inkübe edildi. Galanin (1:200, AB223, Millipore), Leu-Enkephalin (1:200, AB5024, Millipore) ve Peptide Histidine İsoleucine (1:200, ab22662, Abcam) primer antikorları ile +4 C'de bir gece inkübe edildi. Süre sonunda kesitlere önce Goat anti-rabbit IgG (1:50, G-5268, Sigma) (30 dakika) daha sonra PAP (1:100; P1291, Sigma) uygulandı. İmmunoreaktivitenin görünür hale getirilmesi için kesitler DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) ile inkübe edildi. Alkol ve ksilol serilerinden geçirilen kesitler entellan ile kapatıldı.

Pozitif kontrollerde, çalışılan peptidleri bünyesinde bulunduran rat trake dokusu kullanıldı. İmmunohistokimyasal boyama ise aynı şekilde uygulandı.

Negatif kontrolde ise, primer antikorun uygulandığı aşamada, kontrol dokularının yer aldığı preparatlar goat serum ile inkübe edildi. Bu aşama dışında immunohistokimya uygulaması aynı şekilde uygulandı.

Hazırlanan preparatlar Olympus CX 41 tipi ışık mikroskobu ile incelendi ve ilgili kısımlardan fotoğraf çekimi yapıldı.

## 3. Bulgular

Uygulanan immunohistokimyasal boyama yöntemi sonucunda GAL, Leu-Enk ve PHI immünoreaktivitelerinin trake lamina epitelyalis, lamina propria ve submukoza bağ doku hücreleri ile tunika muskularisdeki düz kas hücrelerinde dağılım gösterdiği saptandı.

Üst trakea lamina epitelyalisinde Galanin, Leu-enkephalin ve Peptide Histidine İsoleucine immünoreaktif hücre sayısının daha fazla yoğunlukta olduğu gözlemlendi. İmmünoreaktif hücrelerin çalışılan bölgelerde küme oluşturmayıp tek tek dağılım gösterdiği ve alt trake lamina epitelyalisinde immünoreaktif hücre sayısının azaldığı tespit edildi.

### Galanin (GAL) İmmünoreaktivitesi:

Alt ve üst trakea mukozasındaki lamina epitelyalisinde gözlenen GAL immünoreaktivitesine aynı zamanda alt ve üst trakeanın lamina propria ve submukoza tabakalarındaki bazı hücreler ile tunika

muskularis ve adventisya bölgesinde de rastlandı. Submukoza, GAL immunoreaktif sinir lifleri subepitelyal bölgede tespit edilirken, alt ve üst trakedeki bazı goblet hücrelerinde zayıf GAL immunoreaktivitesi saptandı. Ayrıca kinosilyumların yüzeyinde de bu reaksiyon zayıf biçimde gözlemlendi. (Şekil 1).

Lamina propriyadaki düz kas demetlerinde, kan damarları çevresindeki sinir fibrillerinde, arteriyol endotel hücreleri ve mediya tabakasında GAL immunoreaktivitesine rastlandı. Alt trake submukoza bezlerindeki az sayıda korpus glandula hücrelerinde GAL immunoreaktivitesi gözlemlendi. Bu sayının üst trake submukozasındaki korpus glandulalarda daha fazla olduğu belirlendi. Aynı zamanda serömüköz korpus glandulaların çevresindeki sinir fibrillerinde GAL-immunoreaktivitesi de saptandı (Şekil 2).

Alt trake tunika adventisya bölgesinde ganglion hücrelerinde ve sinir fibrillerinde gözlenen GAL-immunoreaktivitesine aynı zamanda kondrositler, kondroblastlar ve perikondriumda da rastlandı.

#### **Peptide Histidine İsoleucine (PHI) İmmunoreaktivitesi:**

PHI immunoreaktif hücrelere alt ve üst trakea bölgesine ait lamina epitelyalislerde ve goblet hücrelerinde rastlandı. Bunun yanı sıra lamina epitelyalis hücrelerine ait kinosilyum yüzeyinde de PHI immunoreaktivitesi gözlemlendi (Şekil 3).

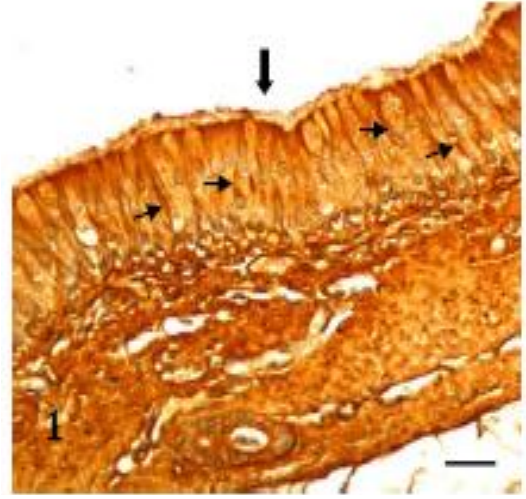
Mukozanın subepitelyal arteriollerinin endotel ve mediya tabakalarının dışında kapillar endotelinde de PHI immunoreaktivitesi gözlemlendi. Üst trakede daha fazla olmak üzere trake submukoza bezlerine ait korpus glandula hücrelerinde bu reaksiyon saptandı. Ayrıca alt ve üst trakede korpus glandulaların çevresindeki sinir fibrillerinde bu reaksiyona rastlandı. Aynı zamanda alt ve üst trakede düz kas dokularında (Şekil 4), perikondriumda, kondrositlerde ve kondroblastlarda PHI immunoreaktivitesi tespit edildi.

Üst ve alt trake adventisya bölgesindeki ganglion hücresi ve arteriyol mediyasında PHI immunoreaktivitesi saptandı.

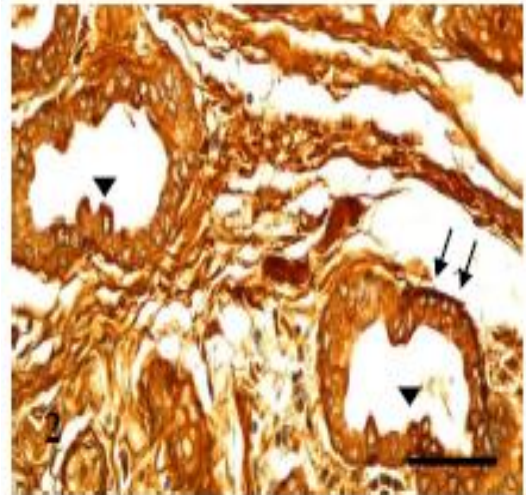
#### **Leucine-enkephalin (Leu-Enk) İmmunoreaktivitesi:**

Alt ve üst trake lamina epitelyalisleri ve kinosilyum yüzeyinde Leu-Enk immunoreaktivitesi saptandı. Aynı zamanda goblet hücrelerinde orta yoğunlukta Leu-Enk immunoreaktivitesi tespit edildi. Submukoza bölgesindeki arteriyol endotelinde ve mediya ile kapillar endotelinde immunoreaktivite saptandı. Lamina propriyadaki düz kas demetlerinde immunoreaktivite gözlenirken, az sayıda korpus glandula çevresindeki sinir fibrillerinde de pozitif reaksiyon saptandı. Ayrıca alt ve üst trake seröz korpus glandulalarında az sayıda hücrede ve kan damarları çevresindeki sinir fibrillerinde Leu-Enk

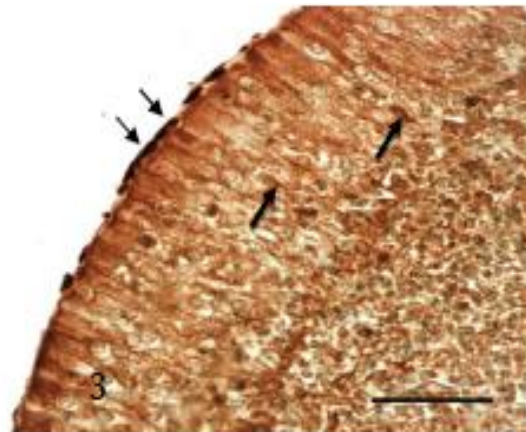
immunoreaktivitesine rastlandı. Tunika adventisya bölgesindeki ganglionlardaki sinir fibrilleri ve ganglion hücresinde (Şekil 5), kondrosit, kondroblastlar ve perikondriumunda (Şekil 6) Leu-Enk immunoreaktivitesi saptandı.



**Şekil 1.** Alt Trake. Lamina epitelyalis hücrelerinde (ince oklar) ve kinosilyum yüzeyinde (kalın ok) GAL immunoreaktivitesi. PAP. Bar: 50 µm.

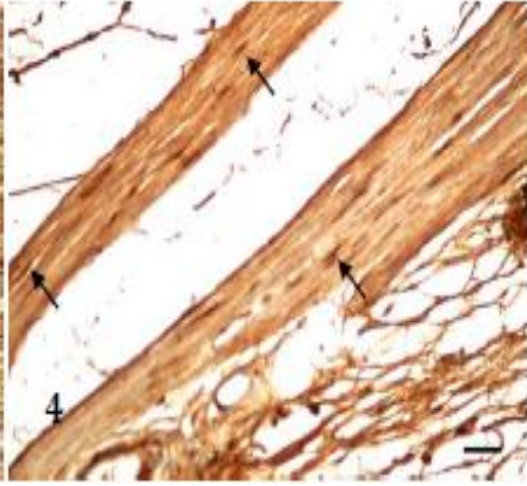


**Şekil 2.** Üst Trake. Korpus glandular çevresindeki sinir fibrillerinde (ince oklar) ve korpus glandula hücresinde (ok başları) GAL immunoreaktivitesi. PAP. Bar: 50 µm.

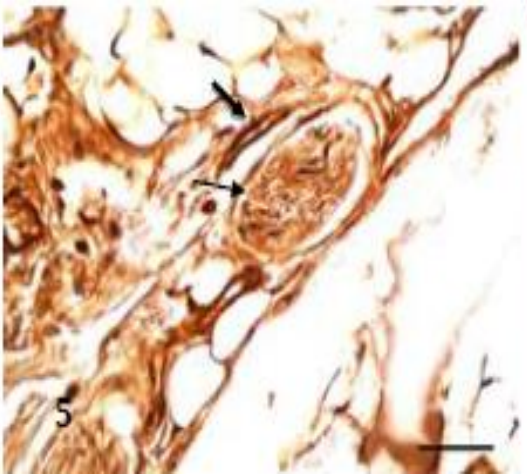


**Şekil 3.** Üst Trake. Lamina epitelyaliste hücrelerde (kalın ok) ve kinosilyumların yüzeyinde PHI immunoreaktivitesi (ince oklar). PAP. Bar: 50 µm.

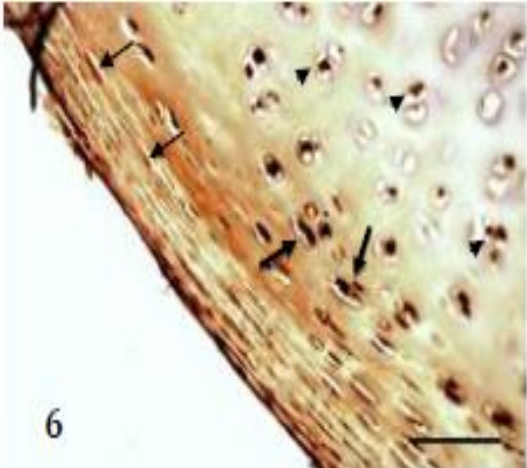




**Şekil 4.** Alt Trake. Düz kas hücrelerinde PHI immunoreaktivitesi (oklar). PAP. Bar: 50 µm.



**Şekil 5.** Üst Trake. Ganglion hücresinde(ince ok)ve sinir fibrillerinde(kalın ok) Leu-Enk immunoreaktivitesi PAP. Bar: 50 µ.



**Şekil 6.** Alt Trake. Perikondriyum (ince oklar) kondrositler (ok başları) ve kondroblastlarda (kalın oklar) Leu-Enk immunoreaktivitesi PAP. Bar: 50 µm.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

##### Galanin (GAL)

Sinir sisteminde yaygın olarak dağılım gösteren Galanin 29 amino asitlik bir nöropeptidtir ve üç tane

G protein-bağlı reseptöre (GalR1, GalR2 ve GalR3) bağlanarak etki gösterir [24]. Cheung ve ark., (1985) [7] tarafından yapılan bir çalışmada domuz trakesinde ve bronşlarında gözlenen galanin immunoreaktivitesinin en belirgin olduğu yerin solunum yolu düz kasları olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde erişkin kedilerin [25] ve yarasaların [7] (Büyük uçan tilki, *Pteropus vampyrus*) [26] trakea düz kaslarında Galanin pozitivitesi tespit edilmiştir. Kaslarda gözlenen bu immunoreaktivitenin aynı zamanda *Macaca fascicularis* [27] kasların çevresinde yerleşim gösteren sinir fibrillerinde de tespit edildiği belirtilmiştir. Bu fibriller aynı zamanda düz kas demetleri arasında da tespit edilmiştir [28]. Bu çalışmada da benzer şekilde düz kasların çevresinde galanin immunoreaktivitesi gösteren fibrillere rastlandı. Ayrıca kas hücrelerinde de reaksiyon saptandı. Bu çalışmadaki bulgularla uyumlu olarak köpek trakesinde [7] ganglion hücrelerinde ve yarasaların (*Pteropus vampyrus*) [26] ganglionlardaki az sayıda galanin-pozitif sinir fibrilinin bulunduğu bildirilmiştir. Domuz [7] alt trakesindeki bazı küçük immunoreaktif ganglionlar ile köpek [29] paratrekeal ganglionlarında da benzer reaksiyon tespit edilmiştir. Öte yandan rat [7] solunum yollarında galanin pozitif fibril tespit edilmediği belirtilmiştir. Domuz, köpek [7], Dağ gelinciği [30] ve *Sinomolgus maymununun* (*Macaca fascicularis*) [27] trake submukozasındaki serömüköz bezlerin asinuslarının çevrelerinde yerleşim gösterdikleri bildirilen Gal immunoreaktif sinir fibrilleri bu çalışmada da gözlemlendi. Yine bu çalışmadaki bulgularla uyumlu olarak Domuz, köpek [7] ve Dağ gelinciği [30] trake submukozal kan damarları çevresinde de Gal immunoreaktif sinir fibrillerinin lokalize olduğu bildirilmiştir.

##### Peptide Histidine Isoleucine (PHI):

N-terminal histidin ve C-terminal İsoleucine amid (PHI) taşıyan peptid VIP ile belirgin yapısal benzerlikler gösteren 27 amino asitten oluşan bir peptid olup, PHI'nın birkaç türünün rat, domuz, kedi, kobay ve insan solunum yollarında VIP'a benzer bir dağılıma sahip olduğunu göstermektedir [13,27]. [25] PHI içeren sinirlerin serömüköz bezler, trake ve ana bronşlardaki düz kaslar ile yakından ilişkisinden bahsederken, [31] solunum yollarında PHI pozitif materyalin bulunmasının izole edilen kobay trake düz kasları üzerinde gevşetici etkisi göstermesinin ve klasik nörotransmitter bloke edici ajanlardan etkilenmemesinin ilginç olduğunu bildirmektedirler. Bu konuda yapılan çalışmalarda [13], yetişkin rat, kobay, kedi ve domuzlarda [14], kobay, rat ve kedide [32] insan, yetişkin fare, rat, kobay ve kedide VIP ve PHI-pozitif fibrillerin solunum kanalında trake düz kas tabakası içinde ve çevresinde görüldüğünü bildirmişlerdir. Bu çalışmada da benzer bulgu elde edildi. Yine araştırmacıların [14, 32, 33] bulgularına benzer şekilde bu çalışmada da serö-müköz bezlerin asinuslarının çevresinde PHI immunoreaktif sinir fibrilleri saptandı. Ayrıca çalışmamızda kan

damarlarının çevresindeki fibrillerde saptanan benzer reaksiyon [14] tarafından kobay, rat ve kedide de bildirilmiştir.

### Leucine-enkephalin (Leu-Enk)

Leucine-enkephalin nöropeptidi, yüksek moleküler ağırlıklı öncül pro-enkefalinden köken alan iki endojen enkefalinden birisidir [34]. *Podarcis hispanica* [35] kertenkele türünün trake epitelindeki bazı hücrelerde bu immunoreaktivitenin gözlenmesi bu çalışmada elde edilen bulgularla benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda gangliyonlarda gözlenen Leu-Enk immunoreaktivitesine ise *Podarcis hispanica* türünde rastlanmadığı bildirilmiştir [35]. Köpek [29] ve kobay [36] trakeal düz kaslarına ait sinir fibrillerinde gözlemlendiği bildirilen Leu-Enk immunoreaktivitesi bu çalışmada da saptandı. Yine aynı araştırmacıların [29,36] bulgularına benzer şekilde arteriol ve bez asinuslarının çevrelerinde de Leu-Enk immunoreaktivitesine rastlandı.

Sonuç olarak GAL, Leu-Enk ve PHI peptitlerinin erişkin koyun (*Ovis aries*) trakesinin (alt ve üst) nöroendokrin hücreleri ve diğer mukozal elemanlarında geniş bir yayılım gösterdikleri tespit edildi. Bu peptitlerin hem normal solunum yollarında hem de patogeneze önemli bir düzenleyici rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bundan dolayı hastalıklarla ilişkili peptid değişimlerinin belirlenebilmesi için normal solunum sisteminin genelinde çeşitli peptidlerin dağılımının bilinmesi son derece önemlidir. Bu peptitlerin mukozal lokalizasyonlarının ve bölgesel yerleşimlerinin belirlenmesine yönelik olarak yapılmış olan bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre düz kaslar üzerine kontraktif ve vazodilatör etkisi göz önüne alındığında kan damarlarının etrafında ve trakea düz kaslarındaki GAL, Leu-Enk ve PHI immunoreaktif fibrillerin dağılımının ilginç olabileceği ve muhtemelen bu peptidlerin trakedeki bez salgılamasının yanı sıra düz kas tonusunun ve lokal kan akışının ayarlanmasında önemli bir fizyolojik role sahip olabileceğini göstermektedir. Solunum yolu epitellerinde bulunan GAL, PHI ve ENK, düzenleyici peptid hormonların ya da nörotransmitterlerin lokal olarak harekete geçirilmesinde de etkili olabilirler.

### Teşekkür

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No 4696-YL1-16) tarafından desteklenmiştir. Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne teşekkür ederiz.

### Kaynakça

[1] Lauweryns, J.M., Van Lommel, A.T., Dom, R.J. 1985. Innervation of Rabbit Intrapulmonary Neuroepithelial Bodies. Quantitative and Qualitative Ultrastructural Study after

Vagotomy. Journal of the Neurological Sciences, 67, 81-92.

- [2] Van Lommel, A., Bolle, T., Fannes, W. Lauweryns, J.M., 1999. The Pulmonary Neuroendocrine System: the Past Decade. Archives of Histology and Cytology, 62(1), 1-16.
- [3] Van Lommel, A., 2001. Pulmonary Neuroendocrine Cells (PNEC) and Neuroepithelial Bodies (NEB): Chemoreceptors and Regulators of Lung Development. Paediatric Respiratory Reviews, 2(2), 171-176.
- [4] Salvi, E.P., Vaccaro, R., 2001. Ontogeny of Galanin-Immunoreactive Elements in Chicken Embryo Autonomic Nervous System. Anatomical Record, 262(3), 266-278.
- [5] Mitsukawa, K., Lu, X., 2008. Galanin, Galanin Receptors and Drug Targets. Cellular and Molecular Life Sciences, 65(12), 1796-1805.
- [6] Counts, S.E., Perez S.E., Kahl, U., Bartfai, T., Bowser, R.P., Deecher, D.C., Mash, D.C., Crawley, J.N., Mufson, E.J., 2001. Galanin: Neurobiologic Mechanisms and Therapeutic Potential for Alzheimer's Disease. CNS Drug Reviews, 7, 445-470.
- [7] Cheung, A., Polak, J.M., Bauer, F.E., Cadieux, A., Christofides, N.D., Springall, D.R., Bloom, S.R., 1985. Distribution of Galanin Immunoreactivity in the Respiratory Tract of Pig, Guinea Pig, Rat, and Dog. Thorax, 40(12), 889-896.
- [8] Palle, C., Ottesen, B., Jorgensen, J., Fahrenkrug, J., 1989. Peptide Histidine Methionine and Vasoactive Intestinal Peptide: Occurrence and Relaxant Effect in the Human Female Reproductive Tract. Biology of Reproduction, 41, 1103-1111.
- [9] Bailey, C.J., Wilkes, L.C., Conlon, J.M., Armstrong, P.H., Buchanan, K.D., 1990. Effects of Gastric Inhibitory Polypeptide, Vasoactive Intestinal Polypeptide and Peptide Histidine Isoleucine on the Secretion of Hormones by Isolated Mouse Pancreatic Islets. The Journal of Endocrinology, 125, 375-379.
- [10] Mikkelsen, J.D., Fahrenkrug, J., 1994. Concentrations and Distribution of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP), Peptide Histidine Isoleucine (PHI) and Peptide Histidine Valine (PHV) in the Cerebral Cortex and the Suprachiasmatic Nucleus of the Mouse. Brain Research, 656, 95-107.
- [11] Skakkeboek, M.L., Georg, B., Mikkelsen, J.D., Ottesen, B., Fahrenkrug, J. 1995. All Prepro-VIP-Derived Peptides, except PHI/PHV, Are Expressed in the Female Rat Anterior Pituitary and Increased by Estrogen. Peptides 7, 1287-1294.
- [12] Buhl, T., Nilsson, C., Ekblad, E., Johnsen, A.H., Fahrenkrug, J., 1996. Expression of Prepro-VIP

Derived Peptides in the Gastrointestinal Tract of Normal, Hypothyroid and Hyperthyroid Rats. *Neuropeptides*, 30, 237-247.

- [13] Lundberg, J. M., Fahrenkrug, J., Hökfelt, T., Martling, C. R., Larsson, O., Tatemoto, K., Anggård, A., 1984. Co-existence of Peptide HI (PHI) and VIP in Nerves Regulating Blood Flow and Bronchial Smooth Muscle Tone in Various Mammals Including Man. *Peptides*, 5(3), 593-606.
- [14] Christofides, N.D., Yiangou, Y., Piper, P.J., Ghatei, M.A., Sheppard, M.N., Tatemoto, K., Bloom, S.R., 1984. Distribution of Peptide Histidine Isoleucine in the Mammalian Respiratory Tract and Some Aspects of Its Pharmacology. *Endocrinology*, 115(5), 1958-1963.
- [15] Ishizuka, T., Kurosawa, M., 1990. Basic Study of Peptide Histidine Isoleucine (PHI) Immunoreactivity in the Rat Respiratory Tract. *Arerugi*, 39(7), 577-586.
- [16] Greenberg, B., Rhoden, K., Barnes, P.J., 1987. Vasoactive Intestinal Peptide Causes Non-Endothelial Dependent Relaxation in Human and Bovine Pulmonary Arteries. *Blood Vessels*, 24, 45-50.
- [17] Said, S.I., 1982. Vasoactive Peptides in the Lung, with Special Reference to Vasoactive Intestinal Peptide. *Experimental Lung Research*, 3(3-4), 343-348.
- [18] Tatemoto, K., Mutt, V., 1981. Isolation and Characterization of the Intestinal Peptide Porcine PHI (PHI-27), A New Member of the Glucagon-Secretin Family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(11), 6603-6607.
- [19] Roth, K.A., Barchas, J.D., 1986. Small Cell Carcinoma Cell Lines Contain Opioid Peptides and receptors. *Cancer*, 57(4), 769-773.
- [20] Maneckjee, R., Minna, J.D., 1990. Opioid and Nicotine Receptors Affect Growth Regulation of Human Lung Cancer Cell Lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(9), 3294-3298.
- [21] Cutz, E., Chan, W., Track, N.S., 1981. Bombesin, Calcitonin and Leu-enkephalin Immunoreactivity in Endocrine Cells of Human Lung. *Experientia*, 37(7), 765-767.
- [22] Zaccone, G., Mauceri, A., Cascio, P.L., Minniti, F., Parrino, V., Fasulo, S., 2004. Immunohistochemical Study of the Innervation of Pulmonary Vessels and Smooth Muscles in the Respiratory Tract of Two Frog Species. *Acta Histochemica*, 106(3), 179-193.
- [23] Sternberger, L.A., 1989. *Immunocytochemistry*. John Wiley and Sons, 524p. New York.
- [24] Porzionato, A., Macchi, V., Barzon, L., Masi, G., Belloni, A., Parenti, A., Palù, G., De Caro, R., 2010. Expression and Distribution of Galanin Receptor Subtypes in the Rat Carotid Body. *Molecular Medicine Reports*, 3(1), 37-41.
- [25] Dey, R.D., Zhu, W., 1993. Origin of Galanin in Nerves of Cat Airways and Colocalization with Vasoactive Intestinal Peptide. *Cell and Tissue Research*, 273(1), 193-200.
- [26] Kusindarta, D.L., Wijayanto, H., Atoji, Y., 2003. Intrinsic Innervation in the Tracheal Smooth Muscle of the Large Flying Fox (*Pteropus vampyrus*): An Immunohistochemical Study. *European Journal of Morphology*, 41(3/4), 111-116.
- [27] Ghatei, M.A., Springall, D.R., Richards, I.M., Oostveen, J.A., Griffin, R.L., Cadieux, A., Bloom, S.R., 1987. Regulatory Peptides in the Respiratory Tract of *Macaca fascicularis*. *Thorax*, 42(6), 431-439.
- [28] Luts, A., Uddman, R., Sundler, F., 1989. Neuronal Galanin is Widely Distributed in the Chicken Respiratory Tract and Coexists with Multiple Neuropeptides. *Cell and Tissue Research*, 256, 95-103.
- [29] Yamamoto, Y., Ootsuka, T., Atoji, Y., Suzuki, Y., 2000. Tyrosine Hydroxylase-and Neuropeptides-Immunoreactive Nerves in Canine Trachea. *American Journal of Veterinary Research*, 61(11), 1380-1383.
- [30] Luts, A., Sundler, F., 1989. Peptide-Containing Nerve Fibers in the Respiratory Tract of the Ferret. *Cell and Tissue Research*, 258, 259-267.
- [31] Polak, J.M., Bloom, S.R., 1984. Regulatory Peptides—the Distribution of Two Newly Discovered Peptides: PHI and NPY. *Peptides*, 5, 79-89.
- [32] Uddman, R., Luts, A., Sundler, F., 1985. Nerve Fibres Containing Peptide Histidine Isoleucine (PHI) in the Respiratory Tract. *Archives of Otorhinolaryngology*, 242(2), 189-193.
- [33] Martling, C.R., Matran, R., Alving, K., Hökfelt, T., & Lundberg, J. M., 1990. Innervation of lower airways and neuropeptide effects on bronchial and vascular tone in the pig. *Cell and tissue research*, 260(2), 223-233.
- [34] Corbett, A.D., Paterson, S.J., Kosterlitz, H.W., 1993. Selectivity of Ligands for Opioid Receptors. In Herz, A., Akil, H., Simon, E.J. (Ed.), *Opioids (645-679)*, Springer, 815p. Berlin Heidelberg.
- [35] Beorlegui, C., Sesma, P., Martínez, A., 1994. An Immunocytochemical Study of the Respiratory System of *Podarcis hispanica* (Reptilia). *General and Comparative Endocrinology*, 96(3), 327-338.
- [36] Shimosegawa, T., Foda, H.D., Said, S.I., 1989. Immunohistochemical Demonstration of Enkephalin-Containing Nerve Fibers in Guinea Pig and Rat Lungs. *The American Review of Respiratory Disease*, 140(426), 441-448.