

Erişkin albino fare (*mus musculus*)'de bazı peptitlerin trakea, bronkus ve bronkulus mukozasındaki immunohistokimyasal lokalizasyonları

Kenan Çınar, Emel Demirbağ

Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Isparta

Özet

Bu çalışmada erişkin albino farelerde (*Mus musculus*) trakea, bronkus ve bronkulus (bronkulus verus ve respiratorius) mukozasında kalsitonin gen ilişkili peptit (Calcitonin Gene-Related peptide=CGRP), serotonin (5-HT) ve endotelin (Endothelin=ET) salgılayan hücrelerin lokalizasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. CGRP immunoreaktif hücrelerin trakea, bronkus ve bronkulus respiratoriuslarda ET ile 5-HT'ye göre en fazla olduğu, fakat bu hücrelerin bronkulus veruslarda ise eşit dağılım gösterdiği tespit edildi. Bu peptitler, endokrin hücreler dışında musculus transversus trachea ile trakea, bronkus ve bronkulus verus subepitelyal sinir fibrillerinde de tespit edildi. Aynı zamanda bu immunoreaktivitelere bazı kan damarları, bağ dokusu, alveolar parenşim ve trakeal ganglionlarda da rastlandı.

Anahtar Kelimeler: Trakea, bronkus, bronkulus, immunohistokimya, *Mus musculus*

Abstract

The immunohistochemical localizations of some peptides in mucosa of trachea, bronchus and bronchulus in adult albino mouse (*mus musculus*)

In this study, localizations of cells that secrete Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), Serotonin (5-HT) and Endothelin (ET) in mucosa of trachea, bronchus and bronchulus (bronchulus verus and respiratorius) were purposed in adult albino mouse (*Mus musculus*).

It was observed that intensity of CGRP-immunoreactive cells was more numerous than ET and 5-HT in trachea, bronchus, bronchulus respiratorius but these cells had similar distribution in bronchus verus. These peptides detected not only in the endocrine cells, but also in subepithelial nerve fibers of musculus transversus trachea, trachea, bronchus and bronchulus verus. Also these immunoreactivities were found in some blood vessels, connective tissue, alveolar parenchima and tracheal ganglions.

Key Words: Trachea, bronchus, bronchulus, immunohistochemistry, *Mus musculus*

Giriş

Diffüz nöroendokrin sistem (DNES) kapsamındaki (1) solunum sistemi endokrin hücrelerine yönelik olarak yapılan çalışmalarda çeşitli endokrin hücreler kemiriciler (2-9) dışında maymun (10), insan (11,12), kedi (4), koyun (13), domuz ve köpekte (5) de tespit edilmiştir.

Bu çalışmada immunohistokimyasal lokalizasyonu belirlenmesi amaçlanan peptitlerden serotonin, pulmonar arter düz kas hücrelerinin hipertrofisi ve proliferasyonunu indüklemekte ve pulmonar arter düz kas hücrelerinin göçünü stimüle etmektedir (14). CGRP erişkinlerin yanı sıra embriyolarda da pulmonar

gelişim süresince solunum yolu epitelyal hücrelerinin proliferasyonu ve göçünü düzenler (15). Pulmonar kan damarlarının vazodilatördür (16,17). Kültürde bazı vaskular düz kas hücrelerinin proliferasyonunu stimüle eder (18). Bu peptitlerden ET ise kalsiyumun hücre içi seviyesini artırarak vazokonstrüksiyona neden olur. Pulmonar kan damarlarındaki kan akımında bir artışa neden olurken, mezenterik ve serebral sirkülasyondaki kan akımını azaltır (19,20). Ayrıca pek çok pulmonar hücre tipi için mitojeniktir ve bu nedenle pulmonar gelişim süresince bir büyüme faktörü olarak rol oynamaktadır (15).

Belirtilen fizyolojik rolleri dikkate alınarak, bu çalışmada ET, 5-HT ve CGRP'nin trakea, bronkus ve bronkulus mukozasındaki immunohistokimyasal lokalizasyonlarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Yazma Adresi: Kenan ÇINAR
Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü \ ISPARTA
Email:kcinar@fef.sdu.edu.tr

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada, 25 adet erişkin erkek albino fare (**Mus musculus**)'ye ait trakea, bronkus ve bronkulus bölgelerinden alınan örnekler materyal olarak kullanıldı. Örnekler %10' luk Formaldehit solüsyonunda 24 saat süreyle tespit edildi. Rutin histolojik doku takibinden geçirilen örnekler, parafinde bloklandı. 5-6 mikrometre kalınlığında alınmış olan kesitlere PAP (Peroxidase antiPeroxidase) yöntemi (21) 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 (A-7284, Sigma) içeren 0.01M PBS (pH 7.4)'de yıkandı. Normal goat serum (703404, Novocastra) solüsyonunda 20-30 dakika bekletilen kesitler 1/200 oranında dilüe edilmiş rabbit anti-CGRP (Santa Cruz/H-48), rabbit anti-Endothelin (Sigma/E-1645) ve rabbit anti-Serotonin (Zymed/18-0077) antiserumlarında +4 ° C' de bir gece tutuldu. Süre sonunda kesitlere önce Goat anti rabbit IgG (1.50; G-5268, Sigma) (20-30 dakika) daha sonra PAP (1/100; P1291, Sigma) uygulandı. Kesitlere en son aşamada 1.5 ml H₂O₂ içeren DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; 00-2020, Zymed) solüsyonu ile boyama işlemi yapıldı. Alkol ve ksilol serilerinden geçirilen kesitler entellan ile kapatıldı. Belirlenen 5-HT, CGRP ve ET immunoreaktif endokrin hücreler trakea, bronkus, bronkulus verus ve bronkulus respiratoryusun tüm epitelleri boyunca sayıldı ve endokrin hücrelerin ortalama miktarı ANOVA kullanılarak bölgeler arasında karşılaştırıldı. Önem derecesi **P=0.05**'dir.

Bulgular

Anova (F) testine göre 5-HT, ET ve CGRP immunoreaktif hücrelerin bölgesel olarak (trakea, bronkus, bronkulus verus, bronkulus respiratoryus) yoğunlukları Tablo.1'de verilmiştir.

CGRP immunoreaktif hücrelerin trakea L. epitelyalis'inde ET ve 5-HT immunoreaktif hücelere göre daha yoğun olduğu belirlendi. Benzer şekilde bronkus L. epitelyalis'indeki CGRP immunoreaktif hücre yoğunluğunun ET ve 5-HT immunoreaktif hücelere göre fazla yoğunlukta oldukları tespit edildi. Bronkulus veruslardaki 5-HT, ET ve CGRP immunoreaktif hücre dağılımlarının ise yaklaşık olarak eşit yoğunlukta olduğu gözlemlendi. CGRP immunoreaktif hücrelerin bronkulus respiratoryus L. epitelyalis'inde diğer peptitlere göre biraz daha yoğun dağılım gösterdiği belirlendi.

Tablo.1: Endokrin hücrelerin çalışılan bölgelerdeki ortalama miktarı (ortalama ± standart sapma)

Bölge	CGRP	ET	5-HT	Anova (F)	P<0.05
Trakede IR hücre sayısı	5.50±3.334	1.50±0.563	2.33±0.667	1.125	>0.351
Bronkus IR hücre sayısı	3.00±0.730	2.67±0.333	2.50±0.619	0.189	>0.830
B. verus IR hücre sayısı	2.17±0.307	2.33±0.422	2.67±0.494	0.376	>0.693
B. resp IR hücre sayısı	2.67±0.333	2.50±0.428	3.17±0.792	0.392	>0.683

B. verus: Bronkulus verus; B. resp: Bronkulus respiratoryus; IR: Immunoreaktif; ±: Standart sapma

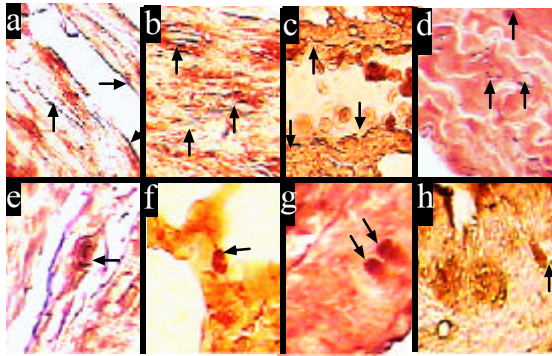
Uygulanan üç peptite karşı immunoreaktivite gösteren hücreler, çalışılan bölgelerde birbirine yakın bir dağılım göstermesine rağmen; bu hücrelerin trakeadaki dağılımı diğer bölgelere nazaran belirgin bir farklılık göstermektedir.

Çalışılan 5-HT, ET ve CGRP antiserumlarına karşı aynı ayrı immunoreaktivite gösteren hücrelerin trakea, bronkus, bronkulus verus ve bronkulus respiratoryusun epitel hücrelerinin arasında dağılım gösterdiği belirlendi. İmmunoreaktif hücrelerinin çoğunun solunum yolları lumenine açılmadığı ve bu hücrelerin çoğunlukla epitelde bazal konumlu olarak yerleştikleri gözlemlendi. Ancak az sayıdaki hücrenin solunum yolu lumeniyle ilişkide olduğu ve bu hücrelerin epitelde bazal konumlu olmadıkları tespit edildi.

5-HT, ET ve CGRP antiserumları uygulanan kesitlerde belirlenen hücrelerin dışında bu immunoreaktiviteler trakea kırıkdağını birbirine bağlayan Musculus transversus trachea içindeki (Şekil 1a,b) ve trakeanın subepitelyal bölgesindeki sinir fibrillerinde de gözlemlendi. Aynı zamanda bir miktar 5-HT, CGRP ve ET immunoreaktif sinir fibrilli bronkusların, bronkulus verusların subepitelyal bölgesi ile bronkuslara komşu arterlerin tunika intima, tunika media ve tunika adventisya tabakalarında (Şekil 1c,d) da tespit edildi. Ayrıca bronkulus respiratoryus bağ dokusu içinde, trakeal ganglionlarda (Şekil 1e) ve akciğer içinde arteriollerin intimasında az miktarda ET, CGRP ve 5-HT immunoreaktif sinir fibrillerinin yerleşim gösterdiği belirlendi. Aynı zamanda bu immunoreaktivitelere alveolar parenşimde (Şekil 1f) de rastlandı. 5-HT immunoreaktif hücreler bronkulus respiratoryusun bağ dokusu tabakasında ve bronkusa komşu arterlerin tunika adventisya ve tunika intima tabakası ile sinir fibrillerinde, ET immunoreaktif ve CGRP immunoreaktif hücrelerin akciğer arteriollerinde geniş bir yayılım göstermedikleri tespit edildi.

ET, CGRP ve 5-HT immunoreaktif hücrelerin çalışılan bütün bölgelerde küme oluşturmayıp tek tek dağılım gösterdiği tespit edildi. Bu immunoreaktif hücre nükleuslarının bazal konumlu olduğu ve hücrelerin lumene doğru giderek daralan bir yapıya sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 1g,h). Ayrıca trakeadan itibaren intrapulmonal solunum yollarına doğru immunoreaktif hücrelerin büyüklüklerinin azaldığı tespit edildi.

Şekil 1a: Musculus transversus trachea'da 5-HT immunoreaktif sinir fibrilleri (oklar) X400; b: Musculus transversus trachea'da ET immunoreaktif sinir fibrilleri (oklar) X400; c: Arter duvarında ET immunoreaktif sinir fibrilleri (oklar) X400; d: Arter duvarında 5-HT immunoreaktif sinir fibrilleri (oklar) X400; e: Trakeal ganglionda 5-HT immunoreaktif sinir fibrilleri (ok) X400; f: Alveolar parenşimde 5-HT immunoreaktif hücre (ok) X400; g: Trakea'da CGRP immunoreaktif hücre (oklar) X400; h: Bronkulus verus'ta ET immunoreaktif hücre (ok) X400



Şekil 1a: Musculus transversus trachea'da 5-HT immunoreaktif sinir fibrilleri (oklar) X400; b: Musculus transversus trachea'da ET immunoreaktif sinir fibrilleri (oklar) X400; c: Arter duvarında ET immunoreaktif sinir fibrilleri (oklar) X400; d: Arter duvarında 5-HT immunoreaktif sinir fibrilleri (oklar) X400; e: Trakeal ganglionda 5-HT immunoreaktif sinir fibrilleri (ok) X400; f: Alveolar parenşimde 5-HT immunoreaktif hücre (ok) X400; g: Trakea'da CGRP immunoreaktif hücre (oklar) X400; h: Bronkulus verus'ta ET immunoreaktif hücre (ok) X400

Tartışma ve Sonuç

Pulmonal nöroendokrin hücrelerin memeliler dışında sürüngen ve kuş türlerinin larinks, soluk borusu, primer ve sekonder bronkuslar ve bronkulus mukozasında yerleşim gösterdiği belirlenmiştir (3,13,22-25).

Keith ve Ekman (23) ile Verastegui vd. (26) CGRP immunoreaktivitesinin farelerde akciğerlerin bronkus ve bronkulustaki da içeren çeşitli bölgelerinde sinir sonlanmaları, nöroendokrin hücreler ve nöroepitelyal hücre kümelerinde geniş bir dağılıma sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca sinir sonlanmalarının Lamina

epitelyalis (L. epitelyalis), nöroendokrin hücreler ve düz kas tabakası ile sıkı bir ilişki içinde olduğunu ve bir miktar immunoreaktif sinir hücre kümesi ile ganglion hücrelerinin de bulunduğunu belirtmişlerdir. Luts vd. (27)'nin CGRP immunoreaktivitesine yönelik olarak insanlarda yaptıkları çalışmada CGRP immunoreaktivitesine sahip endokrin hücrelerin az sayıda olup L. epitelyalis altında, düz kas demetlerinin arasında, kan damarlarında, trake serömüköz bezlerinin çevresinde ve bronkuslarda dağılım gösterdiklerini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar (27) L.epitelyalis'te CGRP içeren sinir fibrillerinin bulunmadığını belirtirlerken, immunoreaktif fibrillerin lokal ganglionlarda orta miktarda ve pulmonar parenşimde kan damarları çevresinde ise az sayıda yerleşim gösterdiklerini belirtmişlerdir. Bu çalışmada da araştırmacıların (23,26,27) bulgularıyla uyumlu olarak CGRP immunoreaktivitesinin trakea, bronkus ve bronkulus lamina epitelyalisi, düz kas tabakası, akciğerlerin çeşitli bölgelerinde bulunan sinir sonlanmaları ve subepitelyal sinir fibrillerinde dağılım gösterdiği belirlendi.

Ancak araştırmacıların fare (26) ve hamster (23)'de CGRP immunoreaktif hücrelerin kümeler halinde bulduklarını bildirmelerine karşın bu çalışmada bu immunoreaktif hücrelerin kümeler oluşturmadığı belirlendi. Aynı zamanda Keith ve Ekman (23) CGRP immunoreaktif sinir fibrillerinin akciğerlerdeki arteriollerde bulunmadığını belirtirlerken, bu çalışmada belirtilen damarların intima tabakasında bu immunoreaktiviteyi gösteren fibrillerin bulunduğu saptandı. Ayrıca Luts vd. (27) trakea serömüköz bezlerinin çevresinde CGRP immunoreaktivitesi bulunduğunu bildirirlerken, bu çalışmada trakeal bezlerde CGRP immunoreaktivitesine rastlanmadı. Fu vd. (28) memelilerde (hamster, tavşan, fare, insan) yaptıkları çalışmada akciğerlerdeki nöroepitelyal hücre kümelerinde 5-HT immunoreaktivitesi tespit etmişlerdir. Verastegui vd. (13) 5-HT immunoreaktivitesi içeren endokrin hücreler ve nöroepitelyal hücre kümelerinin farelerde akciğer içinde geniş bir dağılım gösterdiklerini belirtmişlerdir. Buna karşın Keith ve Ekman (23) hamsterlarda trakeadan bronkus, bronkulus ve alveolar kanallara kadar olan tüm solunum yollarında 5-HT içeren hem tek haldeki nöroendokrin hücrelerin hem de nöroepitelyal hücre kümelerinin az sayıda yerleşim gösterdiklerini bildirmişlerdir. Lauweryns vd. (29) tavşan ve domuzlarda yaptıkları çalışmada 5-HT immunoreaktif hücrelerin intrapulmonal nöroepitelyal hücre kümelerinde yerleşim gösterdiğini

bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise Lauweryns vd. (29)'nin bulgularıyla benzer biçimde immunoreaktif hücrelerin tavşanda trakea, domuzda bronkus L. epitelyalis'inde tek hücrelerin çok sayıda olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca Keith ve Ekman (23)'in 5-HT immunoreaktif sinir fibrillerinin akciğerlerdeki damarlarda bulunmadığını bildirmelerine karşın, bu çalışmada akciğerdeki arteriollerin intima tabakasında 5-HT immunoreaktivitesine sahip sinir fibrilleri gözlemlendi.

Seldeslaugh ve Lauweryns (4) ile Kakui vd. (30) hamsterlarda yaptıkları çalışmada akciğerlerde ET immunoreaktivitesi tespit etmişlerdir. Araştırmacıların (4,30) bulgularıyla paralel olarak farelerde yapılan bu çalışmada da bronkuslar, intrapulmonal solunum yolları ve alveolar parenşimde ET immunoreaktivitesi bulundu.

Guembe ve Villaro (31) farelerde ET immunoreaktif hücrelerin solunum yolu L.epitelyalis'inde geniş bir dağılıma sahip olduğunu özellikle bronkus ve bronkulus L.epitelyalis'inde daha yoğun gözlemlenmelerini belirtmişlerdir. Bu çalışmada da benzer bulgular elde edildi. Araştırmacıların (31) bulgularıyla benzer şekilde aynı zamanda bazı akciğer parenşimal hücrelerinde de ET immunoreaktivitesi tespit edildi. Buna karşın Carr vd. (7) farelerde ET immunoreaktivitesinin bronkulus L.epitelyalis'inde trakea ve bronkus L.epitelyalis'indeki ET immunoreaktivitesine göre daha yoğun olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise trakea, bronkus ve bronkulustaki ET immunoreaktivitesinin hemen hemen aynı olduğu tespit edildi.

Goldie vd. (32) fare intrapulmonal solunum yolları submukozal bezlerinin ET immunoreaktivitesine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise intrapulmonal solunum yolları submukozal bezlerinde ET immunoreaktivitesine rastlanmadı.

Guembe ve Villaro (31) ve Goldie vd. (32) farelerde bronkus ve bronkulustaki düz kas tabakası, subepitelyal sinir fibrilleri, akciğer parenşimal hücreleri ve kan damarlarında ET immunoreaktivitesi tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da araştırmacıların (31,32) bulgularıyla uyumlu olarak belirtilen bölgelerin ET immunoreaktivitesine sahip oldukları belirlendi.

Sonuç olarak 5-HT, CGRP ve ET peptitlerinin erişkin albino fare (*Mus musculus*) solunum yolları (trakea, bronkus, bronkulus verus, bronkulus respiratoryus)'nın endokrin hücreleri dışında diğer mukozal elemanlarında da buldukları ve geniş bir yayılım gösterdikleri tespit edildi. Bu çalışma belirtilen

peptitlerin bölgesel ve mukozal lokalizasyonlarının belirlenmesine yönelik olarak yapılmıştır. Ancak çalışmanın farmakoloji ve fizyoloji gibi farklı bilim dallarını kapsayan, özellikle çeşitli ilaçlarla nöropeptitlerin karşılıklı etkileşiminin solunum sistemi üzerinde yapacağı etkilerle ilişkili daha ileri düzeyde yapılacak olan multidisipliner çalışmalara ışık tutacağına inanılmaktadır.

Kaynaklar

1. Karaöz E. Özel Histoloji. Isparta. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları 2002;No:29, 253
2. Keith IM, Pelto-Huikko M, Schalling M, Hokfelt T. Calcitonin gene-related peptide and its mRNA in pulmonary neuroendocrine cells and ganglia. *Histochemistry* 1991;(96):311-315
3. Luts A, Uddman R, Absood A, Hakanson R, Sundler F. Chemical coding of endocrine cells of the airways: Presence of helodermin-like peptides. *Cell Tissue Res* 1991;265(3):425-433
4. Seldeslaugh KH, Lauweryns JM. Endothelin in normal lung tissue of newborn mammals: Immunocytochemical distribution and co-localization with serotonin and calcitonin gene-related peptide. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1993; 41(10):1495-1502
5. Wang YY, Cutz E. Localization of cholecystokinin-like peptide in neuroendocrine cells of mammalian lungs: A light and electron microscopic immunohistochemical study. *Anat Rec* 1993;236:198-205
6. McDowell EM, Hoyt RF Jr, Sorokin SP. Ontogeny of endocrine cells in the respiratory system of Syrian golden hamsters. II. Intrapulmonary airways and alveoli. *Cell Tissue Res* 1994;275:157-167
7. Carr MJ, Spalding LJ, Goldie RG, Henry PJ. Distribution of immunoreactive endothelin in the lungs of mice during respiratory viral infection. *Eur Respir J* 1998;11:79-85
8. Kusindarta DL, Atoji Y, Yamamoto Y. Nerve plexuses in the trachea and extrapulmonary bronchi of the rat. *Arch Histol Cytol* 2004;67:41-55
9. Verastegui C, Fernandez-Viviero J, Prada A, Rodriguez F, Romero A, Gonzalez-Moreno M, de Castro JM. Presence and distribution of 5HT-, VIP-, NPY-, and SP- immunoreactive structures in adult mouse lung. *Histol Histopathol* 1997;12(4):909-918
10. Li K, Nagalla SR, Spindel ER. A rhesus monkey model to characterize the role of gastrinreleasing peptide (GRP) in lung development. Evidence for stimulation of airway growth. *J Clin Invest* 1994;94:1605-1615
11. Cutz E, Chan W, Track NS. Bombesin, calcitonin and leu-enkephalin immunoreactivity in endocrine cells of human lung. *Experientia* 1981;37:765-767
12. Tsutsumi Y. Immunohistochemical analysis of calcitonin

- and calcitonin gene-related peptide in human lung. *Hum Pathol* 1989;20:896-902
13. Balaguer L, Romano J, Ruiz-Pesini P. Localization of serotonin, cholecystokinin and somatostatin immunoreactivity in the lower respiratory tract of embryonic, foetal and postnatal sheep. *Histol Histopathol* 1992;7:703-708
 14. Day RM, Agyeman AS, Segel MJ, Chevere RD, Angelosanto JM, Suzuki YJ, Fanburg BL. Serotonin induces pulmonary artery smooth muscle cell migration. *Biochemical Pharmacology* 2006;71:386-397
 15. Montuenga LM, Guembe L, Burrell MA, Bodegas ME, Calvo A, Sola JJ, Sesma P, Villaro AC. The diffuse endocrine system: from embryogenesis to carcinogenesis. *Progr Histochem Cytochem* 2003;38(2):155-272
 16. De Vroomen M, Takahashi Y, Roman C, Heymann MA. Calcitonin gene-related peptide increases pulmonary blood flow in fetal sheep. *Am J Physiol* 1998;24:275-281.274,H277-H282
 17. Takahashi Y, De Vroomen M, Gournay V, Roman C, Rudolph AM, Heymann MA. Mechanisms of adrenomedullin-induced increase of pulmonary blood flow in fetal sheep. *Pediatr Res* 1999;45:276-281
 18. Connat J, Schnuriger V, Zanone R, Schaeffer C, Gaillard M, Faivre B, Rochette L. The neuropeptide calcitonin gene-related peptide differentially modulates proliferation and differentiation of smooth muscle cells in culture depending on the cell type. *Regul Pept* 2001;101:169-178
 19. Lerman A, Holmes DR, Malcolm R, Bell MBB, Garratt KN, Nishimura RA, Burnett JC. Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation* 1995;92:2426-2431
 20. Halcox JP, Nour KR, Zalos G, Quyyumi AA. Coronary vasodilation and improvement in endothelial dysfunction with endothelin ET(A) receptor blockade. *Circ Res* 2001;89:969-976
 21. Sternberger LA, 1986. *Immunocytochemistry*. 3rd edition, New York: John Wiley and Sons.
 22. Sheppard MN, Marangos PJ, Bloom SR, Polak JM. Neuron specific enolase: A marker for the early development of nerves and endocrine cells in the human lung. *Life Sci* 1984;34:265-271
 23. Keith IM, Ekman R. Calcitonin gene-related peptide in hamster lung and its coexistence with serotonin: A chemical and immunocytochemical study *Regul Pept* 1988;22(4):315-323
 24. Adriaensen D, Scheuermann DW, Gomi T, Kimura A, Timmermans J-P, De Groodt-Lasseel MHA. The pulmonary neuroepithelial endocrine system in the quail, *Coturnix coturnix*. Light- and electron-microscopical immunocytochemistry and morphology. *Anatomical Record* 1994;239:65-74
 25. Naruse H, Gomi T, Kimura A, Adriaensen D, Timmermans J-P. Structure of the respiratory tract of the red-bellied newt *Cynops pyrrhogaster*, with reference to serotonin-positive neuroepithelial endocrine cells. *Anatomical Science International* 2005;80(2):97
 26. Verastegui C, Prada Oliviera A, Fernandez-Viviero J, Romero A, de Castro J.M. Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in adult mouse lung. *Eur J Histochem* 1997;41(2):119-126
 27. Luts A, Uddman R, Alm P, Basterra J, Sundler F. Peptide-containing nerve fibers in human airways: distribution and coexistence pattern. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;101:52-60
 28. Fu XW, Wang D, Pan J, Farragher SM, Wong V, Cutz E. Neuroepithelial bodies in mammalian lung express functional serotonin type 3 receptor. *Am J Physiol* 2001;281:L931-L940
 29. Lauweryns JM, de Bock V, Verhofstad AA, Steinbuch HW. Immunohistochemical localization of serotonin in intrapulmonary neuroepithelial bodies. *Cell Tissue Res* 1982;226:215
 30. Kakui S, Mawatari K, Ohnishi T, Niwa Y, Tanoue N, Harada N, Takahashi A, Izumi K, Nakaya Y. Localization of the 31-amino-acid endothelin-1 in hamster tissue. *Life Sci* 2004;74(11):1435-1443
 31. Guembe L, Villaro AC. Immunohistochemical mapping of endothelin in the developing and adult mouse lung. *J Histochem Cytochem* 2001;49:1301-1309
 32. Goldie RG, Knott PG, Carr MJ, Hay DWP, Henry PJ. The endothelins in the pulmonary system. *Pulm Pharmacol* 1996;9:69-93