

GEBE RATLARDA VİTAMİN D₃'ÜN TİROİD PARAFOLLİKÜLER (C) HÜCRELERİ, KALSİYUM, İNORGANİK FOSFOR VE ALKALEN FOSFATAZ KONSANTRASYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ

The effect of Vitamin D₃ administration on parafollicular C cells, calcium, inorganic phosphorus and alkaline phosphatase concentrations in pregnant rats.

Mustafa KAYMAZ*

Ayhan BAŞTAN*

Aysin BAŞSATAN**

Summary:

The relationship between vitamin D₃ and thyroid parafollicular C cells, calcium, inorganic phosphorus and alkaline phosphatase concentrations was investigated in pregnant rats. 24 female Wistar albino rats, 11-13 weeks of age, were used in this study. Pregnant rats were determined by the presence of sperm in the vaginal smear. Group 1, group 2 and group 3 consisted of nonpregnant rats (n=8), 13 days pregnant rats (n=8) and 18 days pregnant rats (n=8) respectively. 20.000 IU/kg vitamin D₃ was administered by a single intramuscular injection to the all rats in experiment groups. Blood samples were collected at 24 and 72 hours after injection and serum calcium, inorganic phosphorus and alkaline phosphatase (ALP) levels have been determined. At 72 hours following the injection, thyroidectomy has been performed and thyroid glands were sent to the laboratory.

Ionised calcium concentration was found to be higher in group 2 than assessed in group 3. Despite the marked increase in serum Ca and iP levels at 24 hours following the injection of vit D₃, there was a decline at 72 hours (p<0.05, p<0.001). However, when three groups were compared with each other with regard to calcium and inorganic phosphorus levels, it has been found that ionised calcium and inorganic phosphorus levels were higher in group 2 and 3 than in control group. Besides, there was a rise in ALP concentrations. No change in concentration and size of thyroid parafollicular C cells was observed in rats not injected with vit.D₃. However, we found that intramuscular administration of vit D₃ induced hyperplasia of parafollicular C cells and its concentration at 24 hours after injection. These changes were obviously different at 72 hours compared with 24 hours.

Key words : Parafollicular C cells, Vitamin D₃, rat.

Özet :

Bu çalışmanın materyalini 11-13 haftalık 24 adet Wistar albino dişi rat oluşturdu. Gebe hayvanlar vaginal smear'de spermatozoon bulunması ile belirlendi. Gebe olmayan ratlar (n=8) Grup 1'i, gebeliklerinin 13. gününde bulunanlar (n=8) Grup 2'yi ve 18 günlük gebe ratlar ise (n=8) Grup 3'ü oluşturdu. Her gruptaki hayvanlar kontrol (n=4) ve uygulama (n=4) alt gruplarına ayrıldı. Uygulama gruplarındaki tüm ratlara tek uygulama şeklinde 20.000 IU/kg Vit-D₃ kas içi yolla enjekte edildi. Kan örnekleri, enjeksiyon sonrası 24. ve 72. saatlerde alındı ve serumları çıkarılarak iyonize kalsiyum (Ca), inorganik fosfor (iP) ve alkaline fosfataz (ALP) değerleri saptandı. 72. Saatten sonra ratların tiroid bezleri çıkarılarak laboratuvara gönderildi. Grup 2'de iyonize kalsiyum seviyesi Grup 3'de belirlenen düzeyden daha yüksek bulundu. Vitamin D₃ uygulamasını takiben her 3 grupta da serum Ca ve iP düzeylerinde uygulama sonrası 24. saatte belirgin bir artış saptanırken 72. saatte ise düşme saptandı (p<0.05, p<0.001). Bununla birlikte 13 günlük ve 18 günlük gebe ve gebe olmayan ratlar iyonize kalsiyum ve inorganik fosfor seviyeleri yönünden karşılaştırıldığında her iki dönem

gebelik grubunda saptanan iyonize kalsiyum ve inorganik fosfor düzeyleri kontrol gruplarından yüksek bulundu. Bu sonuçların yanında serum ALP düzeyinde artış saptandı.

Vitamin D₃ uygulanmayan ratların tiroid parafoliküler C hücrelerinde hiperplaziye rastlanmadı. Buna karşın, vitamin D₃ uygulanan ratlarda enjeksiyon sonrası 24. saatte tiroid parafoliküler hücrelerde hiperplazi gözlenirken 72. saatte hiperplazi daha da belirgin hale geldi.

Anahtar kelimeler : Parafoliküler C hücreleri, vitamin D₃, rat.

Giriş: Vücut sıvılarındaki kalsiyum, fosfor ve magnezyum homeostazisi Paratiroid hormon (PTH), 1,25-dihidroksivitamin D [1,25-(OH)₂D] ve kalsitonin (CT) hormonunun karşılıklı etkileşimi ile sürdürülmekte (3, 5, 8, 14, 15, 19) ve bu mekanizmada gebelik sırasında farklılıklar görülmektedir (3, 19).

Gebe olmayan hayvanlarda serum kalsiyum düzeyi PTH'nin etkisiyle, barsak ve renal tubullerden geri emilim ve kemikten kalsiyum mobilizasyonu sağlanarak dengelenmekte iken, fosfor seviyesinin normal fizyolojik değerlerinin üstüne çıkması ise PTH'nin renal tubullerden fosfor atımını artırması ile engellenmektedir (3, 14). Bazı araştırmacılar (3,7,12) serum kalsiyum (iyonize kalsiyum hariç) düzeyinin serum albumin miktarındaki azalmaya paralel olarak düştüğünü bildirmektedirler.

Kalsitonin, plazma kalsiyumunda meydana gelen küçük artışa bağlı olarak tiroid parafoliküler hücrelerinden (C hücreleri) salınan polipeptid yapıları bir hormondur (3,12). C hücreleri tiroid bezindeki tiroksin ve triiyodotironin salgılayan folliküler hücrelerden farklıdır ve bu hücreler folliküler hücrelerle küçük bir grubu oluşturan tiroid follikülleri arasındaki folliküler duvarda bulunurlar. C hücreleri folliküler kolloid ile hiçbir zaman sınır oluşturmazlar (4). Kalsitonin salgılayan parafoliküler hücre toplulukları embriyolojik bakımdan ultimobranşiyal dokunun tiroid içine penetrasyonu sonucu oluşur. Kalsitonin birçok moleküler formda C hücrelerinde ve plazmada bulunur (3). Kalsitonin hormonu, PTH'nin fizyolojik antagonisti olup iyonize serum

kalsiyum düzeyinin düşmesine neden olmakta (3,4,6,13) ve gebelik sırasında salgılanması ise maternal kemiklerde kalsiyum depolanması amacıyla kısmen artmaktadır (19).

Kalsiyum (Ca) ve inorganik fosfor (iP) miktarlarındaki değişiklikler sonucu alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi artmakta (18) ve bu durumun osteoblastik aktivitenin kompenzasyonuna bağlı olduğu belirtilmektedir (4, 5).

Okada ve Won (15,19), uzun süreli Vitamin D uygulamalarının koyun, inek, köpek ve ratlarda tiroid parafoliküler C hücrelerinde hiperplazi ve hipertrofilere neden olduğunu bildirmektedir.

Doğum sonrası parezisin önlenmesi için ineklerde farklı birçok alternatif tedavi metodları geliştirilmiş (1,6,7,8), bu çalışmalarda öncelikli amaç intestinal kalsiyum absorpsiyonunun artırılması olmuştur. Bu amaçla ineklere doğum öncesi dönemde PTH ve Vitamin D₃ uygulamaları önerilmiştir. Bu araştırmalarda vitamin D₃ ve metabolitlerinin uygulama zamanının çok önemli olduğuna dikkat çekilmekte, doğum öncesi 1 ve 4. günlerde uygulandığında doğum öncesi parezisin önlenmesinde oldukça etkili olduğunu bildirilmektedir (1,6,7,8).

Araştırmada gebe ratlarda vitamin D₃ uygulamalarının, tiroid parafoliküler hücrelerde yaptığı değişikliklerle birlikte, serum iyonize kalsiyum, inorganik fosfor ve alkalen fosfataz seviyeleri üzerine etkisini araştırmak ve bu maddelerin yetmezliğine bağlı olarak ineklerde oluşabilecek metabolizma hastalıklarından korunmada

vitamin D₃'ün etkinliğini ortaya koymak amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmanın materyalini Gazi Üniversitesi Deneysel Hayvanları Ünitesi'nden temin edilen 11-13 haftalık 24 adet Wistar albino dişi rat (sıçan) oluşturdu. Hayvanlar 12:12 saatlik ışık periyodu ve 22-24 °C ortalama ısı ortamında ticari rat yemi ve sınırsız su ile beslendi.

Ratlar kafeslere 3 dişi ve bir erkek olacak şekilde konuldu. Dişi ratlar günlük olarak vaginal smear işlemine tabi tutuldu ve gebelikleri, yapılan vaginal smearlerinde spermatozoit bulunması ile belirlendi. Gebelikler, çiftleşme sonrası 12. günde meme gelişmesine bakılarak teyid edildi. Gebe olmayan ratlar (n=8) Grup 1'i, gebeliklerinin 13. gününde bulunanlar (n=8) Grup 2'yi ve 18 günlük gebe ratlar ise (n=8) Grup 3'ü oluşturdu. Her üç gruptaki ratlar uygulama (n=4) ve kontrol (n=4) alt gruplarına ayrıldı.

Uygulama gruplarındaki tüm ratlara 20.000 IU/kg Vit-D₃ I.M. yolla enjekte edildi.

Kan örnekleri, ketalar anestezisi altındaki ratlardan enjeksiyon sonrası 24. ve 72.saatlerde, intrakardiyak punksiyon ile alındı. Son kan alındıktan sonra ratlar, servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildikten sonra tiroid bezleri çıkarıldı. Alınan tiroid bezleri Bouin's solusyonunda 24-48 saat bekletildi. Her tiroid'den 1 blok yapıldı ve blokların başı, ortası ve sonundan 4'er µm'lik 5'er kesit alındı ve daha sonra Roger'in Gümüşleme Metodu'na göre boyandı (9).

Serum Ca tayini Glyoxal- bis yöntemine göre (2), serum ALP konsantrasyonu (11) SIGMA (Katolog no. 104) ve iP düzeyi ise (17) Eagle Diagnostics hazır kitleri (Katolog no. P-10) ile yapıldı.

İstatistiksel analizler t-test yöntemiyle değerlendirildi (16).

Bulgular

Grup 1;

Bu gruptaki Vitamin D₃ uygulanan ratlarda Ca düzeyi uygulama sonrası 24. ve 72. saatte sırasıyla 5.99 ± 0.7 , 4.02 ± 0.06 mg/dl olarak , kontrol alt grubunda ise 24. saatte 5.09 ± 0.4 mg/dl, 72. saatte 5.07 ± 0.3 mg/dl olarak saptandı.

İnorganik fosfor (iP) düzeyleri kontrol alt grubunda 24.saatte 5.36 ± 0.2 mg/dl, 72. saatte 5.92 ± 0.1 mg/dl bulunurken, Vit-D₃ grubunda ise sırasıyla 8.12 ± 0.7 , 6.72 ± 0.2 mg/dl tespit edildi.

Alkaleen fosfataz değerleri kontrol grubunda 24. saatte 105.13 ± 2.0 ve 72. saatte 107.43 ± 1.96 u/l iken Vit-D₃ grubunda sırasıyla 136.16 ± 1.1 ve 111.84 ± 1.87 u/l olarak saptandı.

Grup 2 ;

Gebeliklerinin 13. gününde bulunan ratlarda kontrol grubunda serum Ca seviyesi uygulamaların başlama saatini takip eden 24. saatte 8.03 ± 0.9 mg/dl ve 72. saatte 8.45 ± 0.8 mg/dl saptanırken, Vit-D₃ uygulaması yapılan grupta serum Ca seviyesi sırasıyla 5.82 ± 0.4 ve 9.46 ± 0.9 mg/dl bulundu ($p < 0.001$).

İnorganik fosfor konsantrasyonu kontrol grubunda 24. saatte 7.21 ± 0.1 mg/dl ve 72. saatte 7.15 ± 0.4 mg/dl olarak, Vit-D₃ grubunda ise sırasıyla 8.34 ± 0.4 ve 6.26 ± 0.1 mg/dl tespit edildi ($p < 0.05$).

Serum ALP değerleri kontrol grubunda 24. saatte 71.01 ± 3.47 u/l iken 72. saatte 71.17 ± 7.86 u/l, bu değerler Vit-D₃ uygulaması yapılan hayvanlarda 24. saatte 141.62 ± 8.1 u/l ve 72. saatte 128.1 ± 10.4 u/l ($p < 0.05$) ve her iki grubun 24 ve 72. saatlerindeki serum ALP değerleri arasında istatistiksel olarak önemli fark ($p < 0.001$) bulundu.

Grup 3;

Gebeliklerinin 18. gününde bulunan ratlarda kontrol grubunda serum Ca seviyesi 24. saatte 10.72 ± 0.3 mg/dl, 72. saatte $9.66 \pm$

0.8 mg/dl saptandı ($p>0.001$). Serum Ca seviyesi Vit-D₃ uygulanan ratlarda 24. saatte 12.98 ± 0.1 mg/dl ve 72. saatte 8.33 ± 0.3 mg/dl saptandı. Her iki grubun 72. saatlerinde bulunan değerler arasında istatistiksel olarak önemli fark saptandı ($p<0.05$).

Serum iP değerleri kontrol grubunda 24. saatte 7.40 ± 0.2 mg/dl, 72. saatte 7.41 ± 0.8 mg/dl bulunurken ($p>0.001$), Vit-D₃ grubunda sırasıyla 9.13 ± 0.6 ve 7.27 ± 0.1 mg/dl olarak saptandı ($p<0.001$).

Serum ALP değerleri kontrol grubunda 24. saatte 52.00 ± 3.11 u/l, 72. saatte 52.16 ± 5.43 u/l saptanırken, Vit-D₃ grubunda bu değerler sırasıyla 74.22 ± 4.43 ve 67.85 ± 6.74 u/l saptandı.

Bu sonuçlara göre; Vit-D₃ uygulamasını takiben her 3 grupta da serum Ca ve iP seviyelerinde 24. saatte belirgin bir artış saptanırken 72. saatte ise düşme saptandı ($p<0.05$, $p<0.001$). Bununla birlikte ileri gebe,

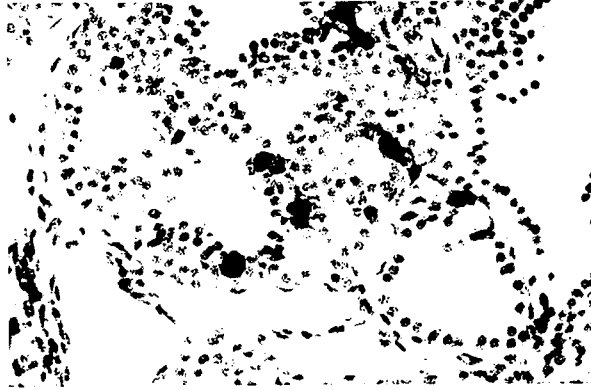
orta dönem gebe ve gebe olmayan ratlar iyonize kalsiyum ve inorganik fosfor seviyeleri yönünden karşılaştırıldığında her iki dönem gebelik grubunda saptanan iyonize kalsiyum ve inorganik fosfor düzeyleri kontrol gruplarından yüksek bulundu. Grup 2'de saptanan iyonize kalsiyum seviyesi Grup 3'de belirlenen seviyeden daha yüksek bulundu.

Yapılan histolojik incelemeler sonucunda vitamin D₃ uygulanmayan ratların parafoliküler hücre sayılarında herhangi bir değişikliğe rastlanmadı (Şekil 1). Bununla birlikte, vitamin D₃ uygulanan ratlarda enjeksiyon sonrası 24. saatte hiperplaziye rastlanırken (Şekil 2) 72. saatte ise hücre sayılarındaki artış 24. saat bulgularına göre daha belirgin olarak gözlemlendi (Şekil 3). Enjeksiyonu izleyen 24-72. saatlerde vitamin D₃ uygulanan gruplarda tiroid parafoliküler hücrelerinde gözlenen hiperplazi kontrol alt gruplarında gözlenmiyordu.



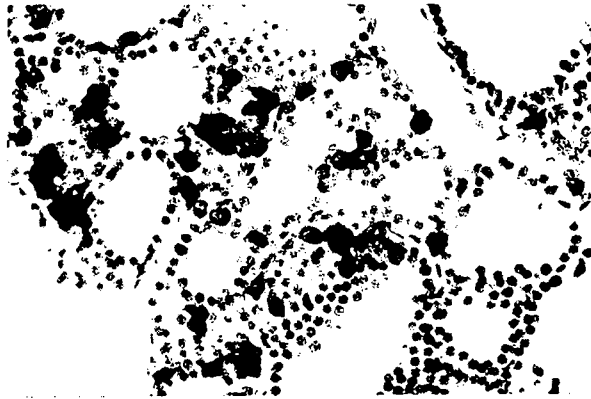
Şekil 1. Vitamin D₃ uygulanmayan ratlarda tiroid bezinin histolojik görünümü.

Figure 1. Histologic appearance of thyroid gland in rats in which non-injected vitamin-D.



Şekil 2. Gebe ratlarda vitamin D₃ uygulamasını takip eden 24.saatte tiroid parafolliküler hücrelerinde hiperplazi.

Figure 2. Hyperplasia in troid parafollicular cells at 24th hours of vitamin D₃ application in pregnant rats.



Şekil 3. Gebe ratlarda vitamin D₃ uygulamasını takip eden 72.saatte tiroid parafolliküler hücrelerinde hiperplazi.

Figure 3. Hyperplasia in troid parafollicular cells at 72nd hours of vitamin D₃ application in pregnant rats.

Tablo 1. Gebeliklerinin farklı dönemlerinde ve gebe olmayan ratlarda vitamin D₃ uygulaması sonrası 3. günde serum kalsiyum, inorganik fosfor ve alkaleen fosfataz konsantrasyonları.

Table 1. Concentrations of calcium, inorganic phosphorus and alkaline phosphatase in the serum at 3 days after vitamin D₃ injection in pregnant and non-pregnant rats.

	GRUP 1 (Gebe olmayan hayvanlar)				GRUP 2 (Gebeliğin 13.gunu)				GRUP 3 (Gebeliğin 18.gunu)			
	Kontrol		Vitamin D ₃		Kontrol		Vitamin D ₃		Kontrol		Vitamin D ₃	
	24 saat	72 saat	24 saat	72 saat	24 saat	72 saat	24 saat	72 saat	24 saat	72 saat	24 saat	72 saat
Ca	5.09±0.4 ^a	5.07±0.3 ^a	5.99±0.7 ^a	4.02±0.06 ^{ba}	8.03±0.9 ^a	8.45±0.8 ^a	15.82±0.4 ^a	9.46±0.9 ^b	10.72±0.3 ^b	9.66±0.8 ^{bc}	12.98±0.1 ^{bc}	8.33±0.3 ^{cd}
İP	5.36±0.2 ^{1c}	5.92±0.1 ^{2c}	8.12±0.7 ^{3d}	6.72±0.2 ^{4d}	7.21±0.1 ^{5e}	7.15±0.4 ^{6e}	8.34±0.4 ^{7e}	6.26±0.1 ^{8e}	7.40±0.2 ^{9c}	7.41±0.8 ^{8e}	9.13±0.6 ^e	7.27±0.1 ^{7e}
ALP	105.13±12.0	107.43±1.96	138.16±1.1 ^e	111.84±1.87 ^e	71.01±3.47	71.17±7.86	141.62±8.1 ^e	128.1±10.4 ^b	52.00±3.11	52.16±5.43	74.22±4.43 ^e	67.85±6.74 ^e

Aynı satırda farklı harflerle işaretlenmiş değerler arasında istatistiksel olarak önem vardır (p<0.05, p<0.01).

Tartışma ve Sonuç

Vitamin D₃ uygulaması sonucu oluşan hiperkalsemiyi kompanze etmek için kalsitonin hormonu salınımı artmakta ve bunun sonucunda da serum iyonize kalsiyum düzeyi düşmeye başlamaktadır (12,19). Özellikle Vitamin D₃ uygulamasını izleyen ilk 24 saatte serum iyonize kalsiyum düzeyi en yüksek düzeye çıkmakta ve enjeksiyon sonrası 72. saatte tekrar düşmektedir (19).

Sunulan araştırmada uygulama gruplarında enjeksiyonu izleyen ilk 24 saatte kan iyonize kalsiyum düzeylerinde hızlı bir yükselme görülmüş ($p<0.01$), 72. saatte tekrar normal düzeylerine dönmüştür. İnorganik fosfor'da da aynı durum saptanmıştır ($p<0.01$). Bu artış Vitamin D₃'ün barsaklardan kalsiyum emilimini artırması ve kemiklerden kalsiyumun mobilizasyonunu uyarması sonucunda oluşmuştur. Uygulamayı izleyen ilk 24 saatte iyonize kalsiyum seviyesinin oranında artması, 72. saatte tekrar eski seviyesine düşmesi araştırmacıların bulgularına benzerlik göstermektedir.

Vitamin D₃ uygulamasından sonra kan iyonize kalsiyum seviyesindeki artış barsaklardaki kalsiyum absorpsiyonunun artmasından ve kemiklerdeki kalsiyum mobilizasyonunun hızlanmasından kaynaklanmakta ve bununla birlikte kemiklerde osteoklastik aktivitenin artmasına bağlı olarak ALP düzeyi artmaktadır. Bu durum, araştırmacının (12) açıkladığı şekildedir.

Cappen (4) C hücrelerinin bir miktar kalsitonin hormonunu membranla sınırlı sekretorik granülleri içinde saklı tuttuğunu ve hiperkalsemi durumunda saklı halde bulunan bu hormonun C hücrelerinden interfolliküler kapillar damarlara süratle salındığını ve C hücrelerinde meydana gelen hiperplazinin uzun süreli hiperkalsemi durumlarında meydana geldiğini bildirmektedir.

Tiroid parafoliküler hücrelerinde gözlenen hiperplazi, Okada'nın (15) ineklerde yaptığı çalışmada elde ettiği bulgularla paralellik göstermektedir. Yapılan

incelemelerde nükleuslu C hücreleri vitamin D₃ uygulanan gruplarda farklı bölgelerde rahatlıkla seçilebiliyordu. Tiroid parafoliküler hücrelerinde artan kan kalsiyum seviyesini kompanze etmek üzere hiperplazinin görüldüğü belirtilmekte, özellikle 48. saatten sonra C hücre yoğunluğunda önemli artışlar saptandığı bildirilmektedir (10,15,19). Vitamin D₃ uygulaması yapılan gruplarda C hücrelerinin bulunduğu bölgelerdeki yoğunluk artışı kalsitoninin salınım ve sentezini düşündürmektedir. Bu doğrultuda Vitamin D₃ uygulaması sonrası 72. saatte görülen C hücre yoğunluğundaki artış ve aynı süre sonunda serum iyonize kalsiyum konsantrasyonundaki düşüş araştırmacıların (1,7,13,15,19) bulguları ile benzerlik göstermekte ve bu durumun kalsiyum homeostazisini sağlamak üzere meydana geldiği düşünülmektedir.

Gebeliklerinin orta ve ileri dönemlerinde bulunan guruplarda serum iyonize kalsiyum seviyeleri açısından karşılaştırıldığında ileri dönem gebe olan ratlarda kalsiyum seviyesi daha düşük bulunmuştur. Bu durum ileri dönem gebelikte hem fütüsteki kalsifikasyonun artmasından hem de laktasyona hazırlık için kalsiyuma duyulan ihtiyaçtan kaynaklanmış olabilir.

Sonuç olarak, ratlarda vitamin D₃ uygulamaları sonrasında özellikle tiroid parafoliküler C hücre topluluklarında meydana gelen morfolojik değişiklikler ve bunun yanında serum kalsiyum, inorganik fosfor ve alkalin fosfataz seviyelerindeki değişiklikler ışığı altında, ineklerde hipokalsemiden korunmak amacıyla Vitamin D₃ uygulamasının etkili olabileceği ve uygulamaların doğumdan 1-4 gün önce yapılmasının en uygun süre olacağı kanısına varıldı.

Teşekkür

Histolojik incelemelerdeki yardımlarından dolayı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embryoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Dr.Figen KAYMAZ'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. **Allsop, T.F., Pauli, J.V.** (1985). Failure of 25-hydroxycholecalciferol to prevent milk fever in dairy cows. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, **13**, 19-22.
2. **Anonima** (1968). Calcium in serum Mikroliter. System Eppendorf Photometrische Methoden. *Medizin AV*. 300 MV., 1-3, Eppendorf- Feratenbau. Netheler + Hinz GmbH.
3. **Arnaud, C.D., Kolb, O.F.** (1991). Interrelationship of Calcium and the Calcitropic Hormones. 247-323. In: F.S. Greenspan (Ed.): *Basic and Clinical Endocrinology*. Appleton and Lange. California.
4. **Capen, C.C., Rosol, T.J.** (1989). Calcitonin. 690.694. In: Kaneko, J.J. (Ed.): *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press San Diego.
5. **Feldman, E.C., Nelson, R.W.** (1987). Differential Diagnosis of Hypocalcemia. 366-370. In: D.Pedersen (Ed.): *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. W.B.Saunders Company.Philadelphia.
6. **Goff, J.P., Horst, R.L.** (1989). Periparturient hypocalcemia in cows: Prevention using intramuscular parathyroid hormone. *J. Dairy Sci.*, **72**, 1182-1187.
7. **Goff, J.P., Horst, R.L.** (1990). Effect of subcutaneously released 24F-1,25-Dihydroxyvitamin D₃ on incidence of parturient paresis in dairy cows. *J.Dairy Sci.*, **73**, 406-412.
8. **Goff, P.J., Reinhardt, A.T., Horst, R.L.** (1991). Enzymes and factors controlling vitamin D metabolism and action in normal and milk fever cows. *J.Dairy Sci.*, **74**, 4022-4032.
9. **Gridley, M.F.** (1954). Hususi Boyama Teknikleri. 166-167. In:O.N.Aker (Ed.). *Laboratuvar El Kitabı. GATA Patolojik Anatomi Enst.Yay., Örnek Matbaası, Ankara.*
10. **Hiruma, M., Ogawa, K., Taniguchi, K.** (1992). Immunocytochemical and morphometric studies on the effects of dehydration on vasopressin-secreting cells in the hypothalamus of the Mongolian Gerbils. *J.Vet.Med.Sci.*, **54(5)**: 881-889.
11. **Kay, H.D.** (1930). Plasma phosphatase. I. Method of determination. Some properties of the enzyme. *J.Biol.Chem.*, **89**:235.
12. **Kayaalp, O.** (1983). Paratiroid Hormonu, Kalsitonin ve D Vitamini. 2071-2099. In: Kayaalp, O. (Ed.): *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. İkinci baskı. Cilt 3. Nüve Matbaası, Ankara.
13. **Kehrli, E.M., Goff, J.P.** (1989). Periparturient hypocalcemia in cows: Effects on peripheral blood neutrophil and lymphocyte function. *J. Dairy Sci.*, **72**, 1188-1196.
14. **Kocabağlı, N., Riond, J.L., Spichiger, U.E.** (1995). Parathyroid hormone-related protein and calcium homeostasis during the periparturient period of dairy cows. *Am.J.Vet.Res.*, **56(3)**:380-385.
15. **Okada, H., Toyota, N., Harimaya, Y., Matsukawa, K.** (1991). Immunohistochemical alterations of C cells in sheep treated with vitamin D. *J.Comp.Path.* **105**, 263-270.
16. **Sümbüloğlu, K., Sümbüloğlu, V.** (1994). Student t-test. 59-67. In: Sümbüloğlu, K. (Ed.). *Biyoistatistik*. Beşinci baskı. Özdemir Yayıncılık. Ankara.
17. **Tietz, N.W.** (1976). Fundamentals of Clinical Chemistry. 903. In: Tietz, N.W. (Ed.). W.B.Saunders Co., Philadelphia.
18. **Turgut, K.** (1997). Alkalen Fosfataz. 142-144. In: Turgut, K. (Ed.): *Veteriner Klinik Laboratuvar Teşhis*. İstanbul.
19. **Won, J.H., Taniguchi, K., Sato, R., Naito, Y.** (1996). Effects of Vitamin D₃ injection on activity of Thyroid parafollicular cells in pregnant rats. *J.Vet.Med.Sci.*, **58(1)**:75-76.