

KALKAN BALIĞI (*Psetta maxima*) DERİSİNDE MUKUS HÜCRELERİNİN DAĞILIMI VE HİSTOKİMYASAL YAPISI

M. Rüştü ÖZEN¹, Emel DEMİRBAĞ*², Kenan ÇINAR²

Makalenin alındığı tarih: 07, 2011

Kabul tarihi: 11, 2011

ÖZET

Bu çalışmada kalkan balığı (*Psetta maxima*) derisindeki bazı bölgelerde mukus salgılayan hücrelerin dağılımları ve histokimyasal karakterlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada beş adet erişkin kalkan balığının (*Psetta maxima*) vücutlarının hem dorsal hem de ventralinden olmak üzere başın gerisi, dorsal, ventral ve caudal yüzgeçlere komşu 8 bölgeden alınan deri örnekleri materyal olarak kullanıldı. Mukus içeren hücrelerin histokimyasal yapılarının belirlenmesi amacıyla kesitlere farklı histokimyasal boyama yöntemleri uygulandı. Çalışılan vücut kısımlarında Alcian Blue (AB) pH 0.5 (+) ve Aldehid Fuksin (AF) (+) hücrelere rastlanmadı. Hem dorsal hem de ventraldeki tüm bölgelerde AB pH 2.5 (+) ve Periodic acid-Schiff (PAS) (+), ventralde dorsal yüzgece komşu bölge dışında diğer bölgelerde AB pH 1.0 (+) hücreler saptandı. Uygulanan PAS/AB pH 2.5 yöntemi sonucunda tüm bölgelerdeki mukus hücrelerinde PAS reaksiyonunun daha yoğun olduğu, ayrıca PAS (+) ve AB pH 2.5 (+) glikokonjugatların birlikte bulunduğu çok sayıda hücre tespit edildi. Kalkan balığı (*Psetta maxima*) derisinde mukus salgılayan hücrelerin dağılım ve yoğunlukları ile histokimyasal karakterlerinin hem vücudun dorsal ve ventral tarafları hem de çalışılan vücut kısımları arasında farklılık gösterdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Deri, mukus, glikokonjugat, histokimya, *Psetta maxima*

* Tel: +90 2462114132 e-mail: edemirbag@gmail.com

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi Su Ürünleri Fak. Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Yetiştiricilik Anabilim Dalı, Eğirdir/ISPARTA

² Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü, ISPARTA
Bu çalışma 20. Ulusal Biyoloji Kongresi'nde poster bildiri olarak sunulmuştur.

ABSTRACT
THE DISTRIBUTION AND HISTOCHEMICAL STRUCTURE
OF MUCUS CELLS IN THE SKIN OF TURBOT
(*PSETTA MAXIMA*)

In this study it was aimed to determine the distribution and histochemical characterization of mucus-secreting cells in some skin areas of turbot (*Psetta maxima*). The skin samples received from the rest of the head, 8 regions neighboring dorsal, ventral and caudal fins in the both dorsal and ventral of five adult turbot (*Psetta maxima*). The different histochemical staining techniques were applied to samples to determine histochemical structures of cells containing mucus. There were no Alcian Blue (AB) pH 0.5 (+) and Aldehyd Fuksin (AF) (+) cells in studied body regions. There were AB pH 2.5 (+) and Periodic acid-Schiff (PAS) (+) cells in the all regions in both dorsal and ventral, and AB pH 1.0 (+) cells in all regions except from the region neighboring dorsal fin in the ventral. As a result of applied PAS/AB pH 2.5 staining method, PAS reaction was more dense in the mucus cells in the all regions and also a large number of cells the PAS (+) and AB pH 2.5 (+) glycoconjugates together were detected. It was detected that the distribution, density and histochemical characterization of mucus-secreting cells in the skin of turbot (*Psetta maxima*) showed differences in both the dorsal and ventral sides of the body and among the studied body regions.

Key words: Skin, mucus, glycoconjugate, histochemistry, *Psetta maxima*

GİRİŞ

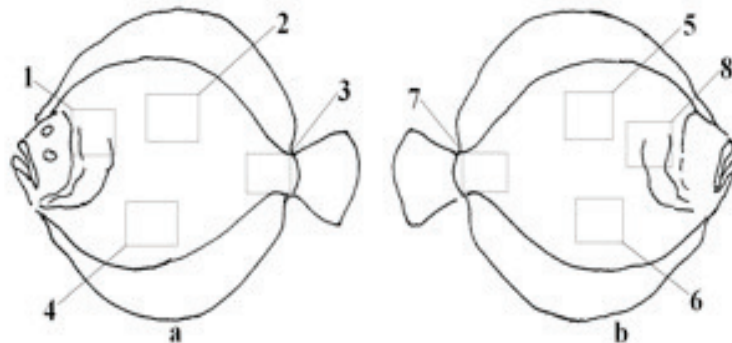
Kemikli balıklarda deri; epidermis, dermis ve hipodermis tabakalarından oluşur (Baran ve Timur, 1983). Epidermis çok katlı yassı epitelden oluşur. Yassı epitel hücreleri arasında çok sayıda mukus hücresi vardır (Timur, 2008). Bu hücreler geniş ovoid şekilli hücrelerdir. Nükleusları yassı olup, hücrenin tabanında yer almaktadır (Baran ve Timur, 1983). Mukus hücreleri bazal hücrelerden farklılaşır (Hibiya vd., 1997). Balığın epidermisindeki bu mukus hücreleri (goblet hücreleri) balığı kaygan bir tabaka halinde saran mukus salgırlar (Hibiya vd., 1997; Bat vd., 2008; Timur, 2008). Deniz balıklarında su içerisinde erimeyen bazı karbonatlar, mukus hücrelerinde

bikarbonat ve karbonata dönüştürülürler (Timur, 2006). Mukus, sülfat ve karboksil radikallerini içeren polisakkaritler bileşimidir (Hibiya vd., 1997). Vücut etrafında bir film oluşturarak su basıncının yüzme etkisini azaltır ve balığın suda kolay hareket etmesini sağlar. Bu film vücudun iç kısmını mikroorganizmalardan ve invazyondan korur (Hibiya vd., 1997; Bat vd., 2008). Deri ve solungaçları toprak ve partiküllerden korur ve osmoregülasyonda rol oynar (Hibiya vd., 1997).

Bu çalışmada kalkan balığının (*Psetta maxima*) bazı bölgelerine ait derilerde mukus salgılayan hücrelerin dağılımları ve histokimyasal karakterlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada Karadeniz'in Trabzon merkezden 1 mil açıklarından (35° 49' - 42° 35' Kuzey Enlemi ve 25° 02' - 44° 51' Doğu Boylamı) 25-30 m derinlikten Haziran ayında avlanan 5 adet erişkin kalkan balığının (*Psetta maxima*) vücutlarının hem dorsal hem de ventralinden (Şekil 1) başın gerisi (1, 8), dorsal (2, 5), ventral (4, 6) ve kaudal (3, 7) yüzgeçlere komşu 8 bölgeden alınan deri örnekleri materyal olarak kullanıldı. Alınan doku örnekleri %10'luk formaldehitte 24 saat tespit edildi. Yıkama işleminden sonra rutin histolojik doku takibi işleminden geçirilen örnekler parafinde bloklandı. Hazırlanan parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler alındı. Mukus içeren hücrelerin histokimyasal yapılarının belirlenmesi amacıyla doku kesitlerine Tablo 1'de belirtilen boyama yöntemleri uygulandı.



Şekil 1. Kalkan balığı (*Psetta maxima*)'nın materyal alınan dorsal (a) ve ventral (b) vücut bölgeleri. 1, 8: başın gerisi; 2, 5: dorsal yüzgeçlere komşu bölge; 3, 7: kaudal yüzgeçlere komşu bölge; 4, 6: ventral yüzgeçlere komşu bölge.

Tablo 1. Uygulanan boyama yöntemleri

Boyama Yöntemi	Spesifitesi
Alcian Blue (AB) pH 0.5	Güçlü sülfatlı glikokonjugatların tespiti
AB pH 1.0	O-sülfat esterli glikokonjugatların tespiti
AB pH 2.5	Karboksilatlı glikokonjugatların tespiti
Periyodik asit-Shiff (PAS)	Nötral glikokonjugatların tespiti
Aldehide Fuchsin (AF)	Sülfatlı glikokonjugatların tespiti
PAS/AB pH 2.5	Nötral ve güçlü asidik glikokonjugatların kıyaslanması
AF/AB pH 2.5	Sülfatlı ve karboksilatlı glikokonjugatların kıyaslanması

BULGULAR

Çalışılan bölgelere ait mukus hücre yoğunluğu ve bu hücrelerin uygulanan boyama yöntemlerine karşı gösterdikleri reaksiyon şiddetleri Tablo.2’de verilmiştir.

Tablo 2. Kalkan balığı (*Psetta maxima*) derisinde mukus hücrelerinin dağılımı ve boyanma özellikleri

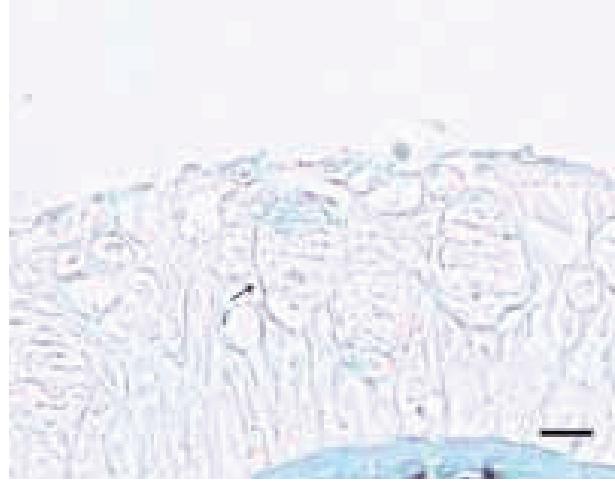
Bölgeler Uygulanan Yöntemler		1	2	3	4	5
		AB pH 0.5	HY	-	-	-
	BŞ	-	-	-	-	-
AB pH 1.0	HY	+	+	+	+	-
	BŞ	*	*	*	*	-
AB pH 2.5	HY	++	++	++	+++	++++
	BŞ	**	**	**	**	**
PAS	HY	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
	BŞ	****	****	*****	****	*****
AF	HY	-	-	-	-	-
	BŞ	-	-	-	-	-
AF/AB	HY	++	++	++	+++	++++
	BŞ	**	**	**	**	**
	MK	AB	AB	AB	AB	AB

M. Rüştü ÖZEN, Emel DEMİRBAĞ, Kenan ÇINAR

AB/PAS	HY	+++	+	++++	+	++++	+	++++	++	++++	+++	+++
	BŞ	***	***	***	***	****	* *	***	**	***	***	***
	MK	AB	K ^{EB}	PAS	K ^{AB}	PAS	AB	PAS	K ^{EB}	PAS	K ^{EB}	K ^{AB}

6	7					8				
-	-					-				
-	-					-				
+	+					+				
*	*					*				
++++	++++					++++				
**	**					**				
+++++	++++					+++				
****	***					**				
-	-					-				
-	-					-				
++++	++++					++++				
**	**					**				
AB	AB					AB				
++	++++	+++	+++	++	+	++++	+	++	+++	
***	***	***	***	***	**	****	* *	* *	* *	
A B	K ^{EB}	PAS	K ^{AB}	K ^{PAS}	K ^{BB}	PAS	A B	K ^{AB}	K ^{EB}	

Çalışılan bütün bölgelerde mukus hücrelerinin AB pH 0.5 ve AF boyama yöntemleri ile reaksiyon göstermedikleri belirlendi. Ventral vücut bölgelerinden dorsal yüzgece komşu bölgede AB pH 1.0 reaksiyonuna rastlanmadı. Belirtilen bölge dışında tüm bölgelerde çok zayıf AB pH 1.0 reaksiyonu gösteren mukus hücreleri tespit edildi. Çok az sayıda oldukları saptanan bu hücrelerin genellikle yüzeyde yerleşim gösterdikleri belirlendi (Şekil 2).



Şekil 2. 4. bölge. Zayıf AB pH 1.0 reaksiyonu gösteren mukus hücresi (ok). AB pH 1.0. Bar: 10 μ m

Uygulanan AB pH 2.5 yöntemi sonucunda dorsalde başın gerisi ile dorsal ve kaudal yüzgece komşu bölgelerde az sayıda pozitif reaksiyon gösteren hücre belirlenirken, reaksiyonun orta şiddette olduğu saptandı. Dorsalde ventral yüzgece komşu bölgede diğer dorsal vücut bölgelerine nazaran pozitif hücre yoğunluğunun artış gösterdiği tespit edildi. Ventral vücut bölgelerinde ise dorsal bölgelere oranla AB pH 2.5 (+) hücre yoğunluğunun daha fazla olduğu, bu reaksiyonun bazı hücrelerde güçlü, bazılarında orta ve bazılarında ise zayıf şiddette olduğu görüldü.

Dorsal vücut bölgelerinden başın gerisinde çok sayıda hücrede güçlü PAS reaksiyonu belirlendi. Dorsal yüzgece komşu bölgedeki PAS (+) hücre yoğunluğunun başın gerisine nazaran daha fazla olduğu, reaksiyon şiddetinde ise değişiklik olmadığı tespit edildi. Kaudal yüzgece komşu bölgede PAS reaksiyonu gösteren hücre yoğunluğunun dorsal yüzgece komşu bölge ile aynı olduğu fakat reaksiyon şiddetinin arttığı saptandı. PAS uygulamasına karşı reaksiyonun dorsalde ventral yüzgece komşu bölgede diğer dorsal vücut bölgelerine göre daha güçlü olduğu ve pozitif hücre yoğunluğunun arttığı belirlendi. PAS (+) hücre yoğunluğunun ve bu hücrelerdeki reaksiyonun ventralde dorsal yüzgece komşu bölgede diğer vücut bölgelerine nazaran daha fazla olduğu görüldü. Ventralde ventral yüzgece komşu bölgedeki PAS (+) hücre yoğunluğunun dorsal yüzgece komşu bölge ile aynı olduğu, fakat

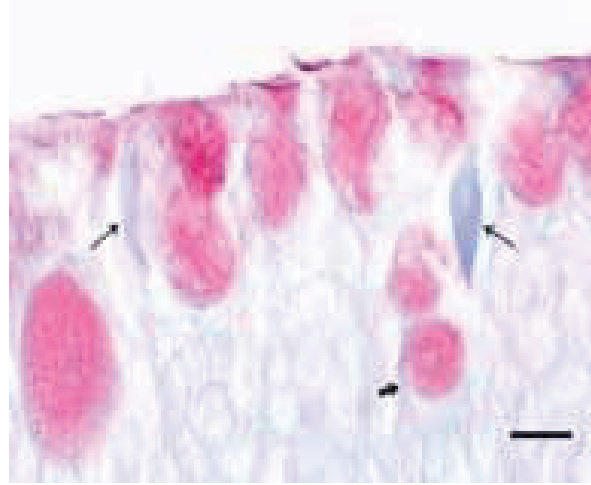
reaksiyon şiddetinin azaldığı belirlendi. Diğer ventral vücut bölgelerine kıyasla başın gerisi ve caudal yüzgece komşu bölgelerde hem PAS (+) hücre yoğunluğunun hem de PAS'a karşı reaktivitenin daha az olduğu saptandı.

Nötral ve güçlü asidik (karboksilatlı) glikokonjugatları kıyaslamaya yönelik uygulanan PAS/AB (pH 2.5) yöntemi sonucunda dorsalde ventral yüzgece komşu bölgenin dışındaki bölgelerde sadece PAS (+) reaksiyon gösteren hücre yoğunluğunun fazla olduğu ve reaksiyonun güçlü olduğu belirlendi (Şekil 3). Ayrıca az sayıda hücrenin sadece karboksilatlı glikokonjugatları içerdiği tespit edildi (Şekil 4). Bazı hücrelerin ise hem karboksilatlı hem de nötral mukosubstansları birlikte içerdiği, bu hücrelerde karboksilatlı glikokonjugatların az miktarda oldukları saptandı (Şekil 5). Dorsalde ventral yüzgece komşu bölgede ise PAS (+) reaksiyon gösteren mukus hücrelerindeki reaksiyon şiddetinin daha az olduğu belirlendi. Aynı bölgede sadece karboksilatlı glikokonjugatlarla hem karboksilatlı hem de nötral glikokonjugatları içeren hücre yoğunluğunun ve gösterdikleri reaksiyon şiddetinin dorsaldeki diğer bölgelerle benzer olduğu tespit edildi. Ventral vücut bölgelerinden alınan tüm örneklerde sadece PAS (+) reaksiyon gösteren hücrelerin çoğunlukta olduğu görüldü. Bazı hücrelerde hem PAS (+) hem de AB (pH 2.5)(+) mukosubstansların birlikte bulunduğu belirlendi. Az sayıda mukus hücresinde sadece karboksilatlı glikokonjugatların bulunduğu (Şekil 6), bazı hücrelerde ise bu glikokonjugatın baskın olduğu tespit edildi (Şekil 7). Ayrıca bu hücrelerin yoğunluklarının dorsal vücut bölgelerine nazaran daha fazla olduğu saptandı. Ventralde başın gerisi ile caudal yüzgece komşu bölgelerde tespit edilen mukosubstans yoğunluklarının diğer bölgelere nazaran daha az olduğu görüldü.

Kalkan Balığı (*Psetta maxima*) Derisinde Mukus Hücrelerinin Dağılımı ve Histokimyasal Yapısı

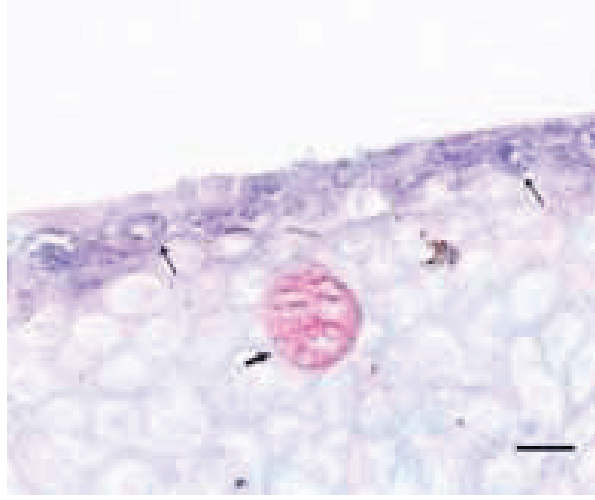


Şekil 3. 3. bölge. Güçlü PAS reaksiyonu gösteren mukus hücreleri (oklar). PAS. Bar: 10 μ m

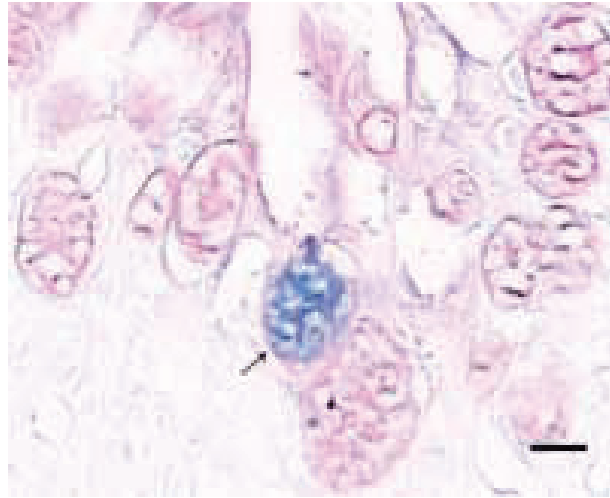


Şekil 4. 1. bölge. AB pH 2.5 (+) (ince oklar) ve PAS (+) (kalın ok) mukus hücreleri. PAS/AB (pH 2.5). Bar: 10 μ m

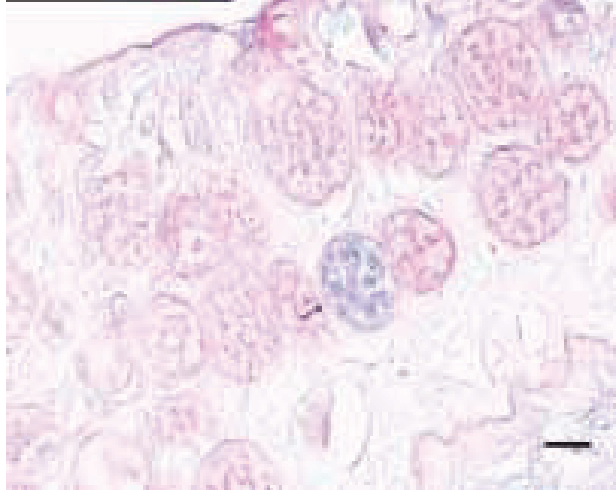
M. Rüştü ÖZEN, Emel DEMİRBAĞ, Kenan ÇINAR



Şekil 5. 1. bölge. PAS/AB (+) (ince oklar) ve sadece PAS (+) mukus hücreleri (kalın ok). PAS/AB (pH 2.5). Bar: 10 μ m



Şekil 6. 5. bölge. AB (pH 2.5) (+) mukus hücresi (ok). PAS/AB (pH 2.5). Bar: 10 μ m



Şekil 7. 5. bölge. AB (pH 2.5) baskın (+) mukus hücresi (ok). PAS/AB (pH 2.5). Bar: 10 μ m

HY: Hücre Yoğunluğu; BŞ: Boyanma Şiddeti; MK: Mukus Karakteri; AB: sadece AB (+); PAS: sadece PAS (+); K^{AB}: mukus karışımında AB baskınlığı; K^{PAS}: mukus karışımında PAS baskınlığı; K^{EB}: mukus karışımında eş baskınlık; - : yok; + : çok az; ++ : az; +++ : orta; ++++ : fazla; +++++ : çok fazla; * : çok zayıf; ** : zayıf; *** : orta şiddet; **** : güçlü; ***** : çok güçlü

TARTIŞMA VE SONUÇ

Fletcher vd. (1976) dere pisi (*Platichthys flesus* L.), pisi balığı (*Pleuronectes platessa* L.) ve gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Richardson) üzerine yaptıkları çalışmada üç türün epidermisinde de hem nötral hem de asidik glikoproteinleri birlikte içeren goblet hücrelerinin bulunduğunu ve pisi balığı ile gökkuşağı alabalığında sadece asit glikoprotein ve süfatlı musin üreten üniform hücre popülasyonlarının belirlendiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da araştırmacıların bulgularıyla benzer olarak kalkan balığında hem sadece asit glikoprotein hem de nötral ve asit glikoproteinleri birlikte içeren mukus hücreleri belirlenirken, süfatlı glikoprotein içeren mukus hücresine rastlanmadı.

Carmignani ve Zaccone (1975) torpil balığı (*Torpedo ocellata* Rafineque) epidermisindeki mukus hücrelerinin karboksilli, siyalik asitli ve nötral

glikoproteinleri içerdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada da araştırmacıların bulgularına benzer bulgular elde edildi.

Sarasquete vd. (1998) çipura (*Sparus aurata*) epidermis hücrelerinde AB pH 0.5, AB pH 1.0, AB pH 2.5 ve PAS pozitivitesine rastladıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise kalkan balığı epidermisindeki mukus hücrelerinde AB pH 0.5 reaksiyonuna rastlanmadı.

Horozbina (*Blennius sanguinolentus* Palas)'da epidermisteki mukus hücrelerinin sülfatlı, karboksilatlı, siyalik asitli ve nötral glikoproteinleri içerdikleri bildirilmesine (Zaccone, 1983) karşın; bu çalışmada sülfatlı glikoprotein içeren mukus hücrelerine rastlanmadı.

Kahverengi yayın balığı (*Ictalurus nebulosus*) üzerine yapılan bir çalışmada hem asit stresine maruz bırakılmış gruptaki türlerde hem de kontrol grubundaki türlerde vücudun dorsal ve ventralindeki mukus hücrelerinin nötral ve asidik mukosubstansları birlikte içerdikleri, aside maruz bırakılan balıklarda ayrıca sülfatlı ve sialik asitli mukosubstansların bulunduğu bildirilmiştir (Zuchelkowski vd., 1985). Bu çalışmada ise araştırmacıların (Zuchelkowski vd., 1985) bulgularıyla benzer biçimde kalkan balığında vücudun dorsal ve ventralinde nötral ve asidik glikoproteinleri birlikte içeren mukus hücrelerine rastlandı. Bununla birlikte araştırmacıların (Zuchelkowski vd., 1985) deney grubunda bulunan bireylerde elde ettikleri bulguların aksine kalkan balığında sülfatlı glikoprotein içeren mukus hücrelerine rastlanmadı.

Kedi balığı (*Arius tenuispinis*) derisindeki mukus hücrelerinin güçlü PAS ve AB pH 1.0, buna karşın zayıf AB pH 2.5 reaksiyonu gösterdikleri bildirilmiştir (Al-Banaw vd., 2010). Bu çalışmada ise çalışılan vücut kısımlarındaki mukus hücrelerindeki AB pH 2.5 reaksiyonunun AB pH 1.0'e nazaran daha kuvvetli olduğu ve güçlü PAS reaksiyonu gösterdikleri belirlendi.

Kalkan balığı (*Psetta maxima*) derisinde mukus salgılayan hücrelerin dağılım ve yoğunlukları ile histokimyasal karakterlerinin hem vücudun dorsal ve ventral tarafları hem de çalışılan bölgeler arasında farklılık gösterdiği, özellikle nötral glikokonjugat salgılayan hücrelerin çalışılan vücut kısımlarında yoğun dağılıma sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre nötral glikokonjugat yoğunluğunun tatlı su balıklarına nazaran daha fazla olduğu ve bu glikokonjugatın vücudun maruz kaldığı tuz konsantrasyonunu dengeleyebileceği düşünülmektedir. Vücut kısımları ve türler arasında gözlenen farklılıkların, derideki mukus bileşimi ile ortam koşul-

larında oluşabilecek farklılıklara adaptasyonun bir göstergesi olabileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKÇA

Al-Banaw, A., Kenngott, R., Al-Hassan, J.M., Mehana, N., Sinowatz, F. (2010). Histochemical analysis of glycoconjugates in the skin of a catfish (*Arius tenuispinis*, Day). Anat. Histol. Embryol. 39, 42-50.

Baran, İ., Timur, M. (1983). Ichthyologie-Balık Bilimi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları: 392, Ankara, 176s.

Bat, L., Erdem, Y., Ustaoglu Tırl, S., Yardım, Ö. (2008). Balık Sistematigi. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 270 s.

Carmignani, M.P., Zaccone, G. (1975). Histochemical analysis of epidermal cells and mucous cells in the skin of *Torpedo ocellata* Rafinesque. Acta Histochem., 52, 100-110.

Fletcher, T.C., Jones, R., Reid, L. (1976). Identification og glycoproteins in goblet cells of epidermis and gill of plaice (*Pleuronectes platessa* L.), flounder (*Platichthys flesus* L.) and rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Histochem. J., 8(6), 597-608.

Hibiya, T., Yokote, M., Oguri, M., Sato, H., Takashima, F., Aida, K. (1997). An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features. Gustav Fischer Verlag, New York, 145 pp.

Sarasquete, C., Gonzalez de Canales, M.L., Arellano, J., Perez-Prieto, S., Garcia-Rosado, E., Borrego, J.J. (1998). Histochemical study of lymphocytes disease in skin of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. Histol Histopathol, 13, 37-45.

Timur, M. 2006. Balık Fizyolojisi. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 192 s.

Timur, G. 2008. Balık Anatomisi. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 184 s.

Zaccone, G. (1983). Histochemical studies of acid proteoglycans and glycoproteins and activities of hydrolytic and oxidoreductive enzymes in the skin epidermis of the fish *Blennius sanguinolentus palas* (Teleostei: Blenniidae). *Histochemistry*, 78(2), 163-75.

M. Rüştü ÖZEN, Emel DEMİRBAĞ, Kenan ÇINAR

Zuchelkowski, E.M., Pinkstaff, C.A., Hinton, D.E. (1985). Mucosubstance histochemistry in control and acid-stressed epidermis of Brown bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus* (LeSueur). *Anatomical record*, 212(4), 327-335, 396-8.