

Avrupa Yayın Balığı (*Silurus glanis L.*)'nın Sindirim Kanalındaki Bazı Nöropeptidlerin İmmunohistokimyasal Olarak İncelenmesi

Sibel KÖPRÜCÜ¹, Mine YAMAN^{*2}

¹ Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Balık Hastalıkları Anabilimdalı, 23119, ELAZIĞ,
^{*2} Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Anabilimdalı, 23119, ELAZIĞ,
yaman@firat.edu.tr

(Geliş/Received: 19.04.2017; Kabul/Accepted: 10.02.2018)

Özet

İmmunohistokimyasal teknikler kullanılarak Avrupa yayın balığı *Silurus glanis*'in mide ve bağırsağında gastrin, glukagon ve kolesistokin (CCK-8) belirlendi. Bu nöropeptidler mide ve bağırsağın farklı bölümlerinde değişen yoğunluk ve lokalizasyonda tespit edildi. Gastrin ve glukagon immunoreaktiviteleri midenin gastrik mukozasında belirlendi. Bu immüreaktif hücreler genellikle midenin yüzey ve bez epitel hücreleri arasında lokalizedir. Gastrin, glukagon ve CCK-8 immunoreaktiviteleri bağırsakta bulundu. Bağırsak mukozasındaki immüreaktif hücreler yüzey epitel hücrelerinde belirlendi. Ekonomik öneme sahip olan *Silurus glanis*'in sindirim kanalında bu immüreaktivite ilk defa belirlenmiş olması, bu balığın kas ve mukosal salgı aktivitesinin morfolojik ve fonksiyonel yönden değerlendirilmesine katkı sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Silurus glanis L.*, İmmunohistokimya, Sindirim kanalı.

Examination immunohistochemically of some neuropeptides in the digestive tract of European Catfish (*Silurus glanis L.*)

Abstract

Using immunohistochemistry technique, gastrin, glucagon and cholecystokinin (CCK-8) were determined in the stomach and intestine of European catfish *Silurus glanis*. These neuropeptides were detected in varying intensity and localization in different parts of stomach and intestine. The gastrin and glucagon immunoreactivities were identified in the gastric mucosa of stomach. These immunoreactive cells were generally localised between surface and gland epithelial cells in stomach regions. The gastrin, glucagon and cholecystokinin (CCK-8) immunoreactivities were found in the intestine. The immunoreactive cells in the intestine mucosa were detected in surface epithelial cells. The first identification of these immunoreactivity in the digestive tract of *Silurus glanis*, which has economical importance, contributes to morphological and functional evaluation of muscle and mucosal secretion activity of this fish.

Keywords: European Catfish, Immunohistochemistry, Alimentary tract.

1. Giriş

Avrupa yayın balığı (*Silurus glanis L.*) Siluridae familyasından Avrupa'nın ikinci büyük tatlı su balığıdır. Türkiye'de büyük ırmaklarda ve baraj göllerinde bulunur. Suni göllerde de üretilen yayın balığı yenilen bir balıktır [1].

Balıkların sindirim kanalında endokrin hücreler tarafından üretilen pekçok düzenleyici hormon ve peptid bildirilmiştir [2]. Besinlerin sindirimi ve emilimi için gerekli olan sindirim enzimlerinin salgılanması, besin maddelerinin emilimi, bağırsak motilitesi ve kan dolaşımı gibi fizyolojik fonksiyonlar bu hücrelerin salgıları ile

düzenlenir [3]. Kanalın gelişimini ve fonksiyonlarını regüle eden peptid ve hormon yapısında olan bu salgıların bazıları gastrin, glukagon ve kolesistokin (CCK-8)'dir.

Gastrin hormonu G hücreleri diye adlandırılan ve pilorus bezlerinde bulunan gastrin hücrelerinden salgılanır. Gastrinin başlıca fizyolojik görevi midenin asit sekresyonunu uyarmaktır. Bunun yanı sıra özellikle midenin ve intestinal mukozanın gelişimini uyaran besinsel bir role de sahiptir [4]. Glukagon, langerhans adacıkları ve bağırsak epitel hücreleri tarafından üretilir. Enteroglukagon ince bağırsağın gelişmesini sağlayan ve kan şekerini yükselten bir

hormondur [5,6]. Kolesistokinin (CCK) ilk olarak bağırsaktan izole edilmiş olan bir peptiddir. Bir bağırsak hormonu olan kolesistokinin (CCK) sindirim sürecinde etkili olan ve periferel doygunluk sinyalleri aracılığı ile gıda alımının kontrol edilmesinde rol oynayan anoroksijenik bir peptiddir [7].

Sindirim kanalı nöroendokrin sistemindeki bu düzenleyici peptidlerin varlığı pek çok balık türünde belirlenmiştir [2,8-18]. Balıklarda sindirim kanalı endokrin hücrelerinin bölgesel dağılımı, yoğunluğu ve hücre tipleri hayvan grupları ve sindirim kanalının bölümleri arasında önemli farklılıklar göstermektedir [9,12,19,20]. Bu çalışma ile kemikli balıklardan olan Avrupa yayın balığı (*Silurus glanis L.*)'nin sindirim kanalı; gastrin, glukagon ve kolesistokinin (CCK-8) yönünden immunohistokimyasal teknikler kullanılarak incelenecek ve türe ait bölgesel dağılımdaki farklılıklar ortaya konulacaktır.

2. Materyal ve Metod

Bu çalışmada 10 adet Avrupa yayın balığı (*S. glanis L.*) kullanıldı. Balıkların mide ve bağırsak örnekleri Bouin tespit solüsyonunda 16–20 saat tespit edilerek, hazırlanan parafin bloklardan 5–6 µ kalınlığındaki kesitler polysine kaplı lamlara

alındı. Alınan kesitlere avidin-biotin horseradish peroksidaz kompleks (ABC) ve peroksidaz anti peroksidaz (PAP) teknikleri kullanılarak immunohistokimyasal boyama yapıldı [21]. Parafini giderilmiş kesitler endojen peroksidaz aktivitesini azaltmak için %3'lük hidrojen peroksidaz (H₂O₂)'da, antijen retrieval protokolü sonrası ise spesifik olmayan boyamaları engellemek için %10'luk normal keçi serumunda 10'ar dakika bekletildi. İmmunohistokimyasal boyamaları için kesitler, primer antikor olarak rabbit poliklonal antiserumu (rabbit anti-gastrin, -glukagon -kolesistokinin) ile Tablo 1'de verilen sulandırma oranlarına göre inkübe edildi.

PAP tekniği için primer antikorlarla inkübe edilen kesitler sekonder antikor olarak goat anti-rabbit IgG ve bunu takiben rabbit-peroksidaz anti-peroksidaz (PAP) ile prosedüre uygun olarak işleme tabi tutuldu. Daha sonra DAB kromojen substratı ile muamele edilerek hematoksilende boyandı. ABC tekniğinde ise, primer antikorlarla inkübasyondan sonra kesitler, sekonder antikor olarak biotinleştirilmiş sekonder antiserum (goat-anti-rabbit), sonra streptavidin horseradish peroksidaz ve ardından DAB kromojen substrat ile muamele edilerek hematoksilene boyandı [22].

Tablo 1. Çalışmada kullanılan primer antikor listesi

Primer Antikor	Sulandırma Oranı	Ticari İsim	Katalog No
Gastrin	1: 500	Abcam	ab16035
Glukagon	1: 200	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Germany	sc-13091
CCK-8	1: 100	Enzo Life Sciences	BML-CA1125

3. Bulgular

Avrupa yayın balığı (*Silurus glanis L.*)'nin sindirim kanalı fonksiyonları üzerinde oldukça etkili olan nöropeptidlerden gastrin, glukagon ve

kolesistokinin (CCK-8)'in immunohistokimyasal boyama sonuçları incelendi. Bu nöroendokrin hücrelerin; lokalizasyon yeri ve sıklığı, ortalama sayı değerleri olarak Tablo 2'de değerlendirildi.

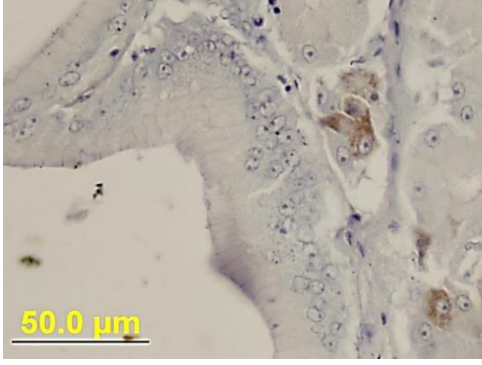
Tablo 2. Avrupa yayın balığı (*S. glanis L.*)'nin her sindirim kanalı bölümüne ait incelenen 10 mikroskop sahasındaki (toplamda 60 mikroskop sahası) endokrin hücrelerin ortalama sayı değerleri (ortalama ± SD).

Primer Antikor	Midenin Bölümleri			Bağırsağın Bölümleri		
	Kardia	Fundus	Pilorus	İnce Bağırsak	Orta Bağırsak	Kalın Bağırsak
Gastrin	-	1,80±0,60	5,60±1,11	1,50±0,67	-	-
Glukagon	-	11,10±1,14	5,60±0,92	11,40±1,28	11,50±1,36	1,70±0,64
CCK-8	-	-	-	11,60±1,11	11,30±0,90	2,20±0,87

Gastrin immunoreaktif hücrelere midenin kardial bölgesinde rastlanmazken, fundus bölgesinde az, pilorus bölgesinde ise daha fazla yoğunlukta bulundu (Şekil 1, 2). Bu hücreler ince

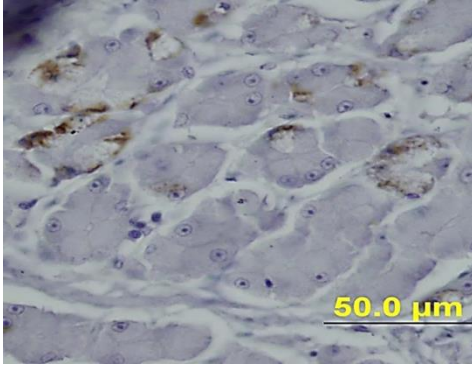
bağırsakta tek tek belirlenirken (Şekil 3), orta ve kalın bağırsakta hiç tespit edilemedi. Gastrin IR hücreler genelde gastrik mukozanın yüzey epitel hücreleriyle ile gastrik bezlerin bez epitel hücreleri

arasına lokalize olmuştu. İnce bağırsaktaki lokalizasyonu ise daha çok yüzey epitel hücreleri arasında belirlendi.

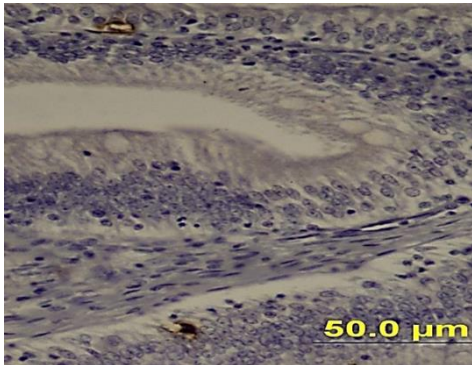


Şekil 1. Fundik midede gastrin IR hücreler.

Hücrelerin morfolojik görünümü genellikle yuvarlak ya da mekik şeklinde, ucu açık veya kapalı formda gözlemlendi.



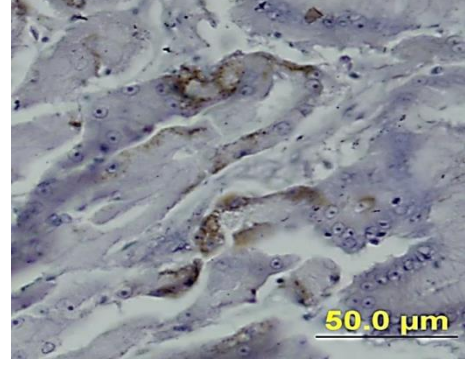
Şekil 2. Pilorik midede gastrin IR hücreler.



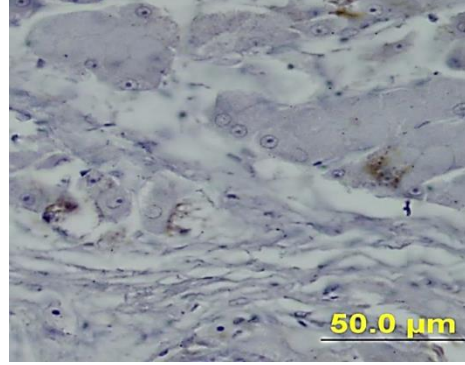
Şekil 3. İnce bağırsakta gastrin IR hücreler.

Glukagon immunoreaktif hücreler en yoğun olarak midenin fundus bölgesinde, bu bölgeye kıyasla daha az yoğunlukta pilorus bölgesinde belirlendi. Ancak midenin kardia bölümünde

herhangi bir immunoreaktivite tespit edilemedi. (Şekil 4, 5).

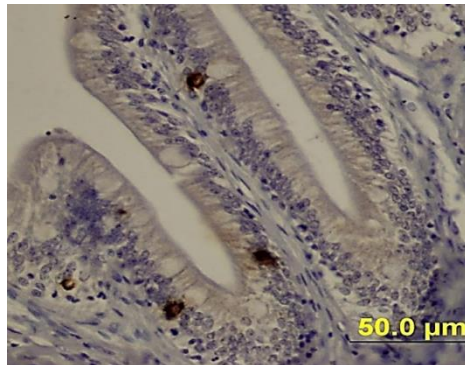


Şekil 4. Fundik midede glukagon IR hücreler.



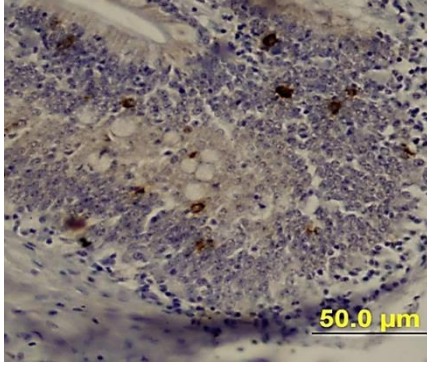
Şekil 5. Pilorik midede glukagon IR hücreler.

İnce bağırsak ve orta bağırsak bölümlerinde çok yoğun olarak gözlemlenirken, kalın bağırsakta çok az yoğunlukta gözlemlendi (Şekil 6, 7, 8).



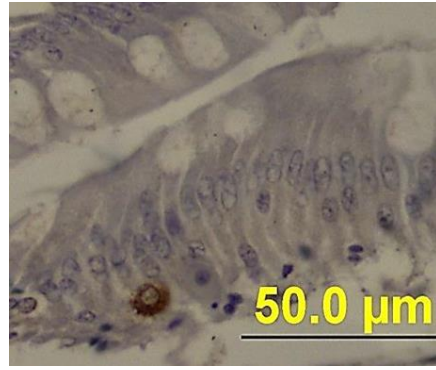
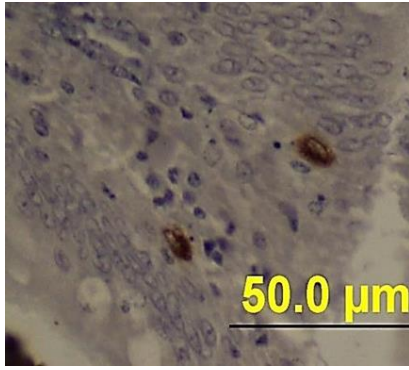
Şekil 6. İnce bağırsakta glukagon IR hücreler.

Glukagon IR hücrelerin midede genellikle gastrik bezlerin bulunduğu bölümde, bağırsaklarda ise kıvrımlarının üst yarısında lokalize olduğu belirlendi.

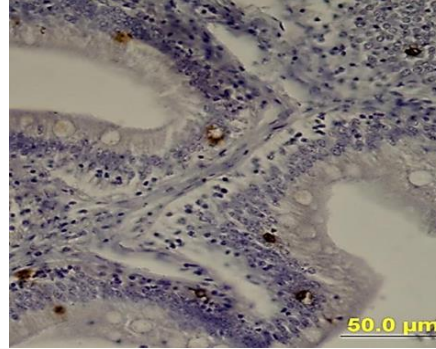
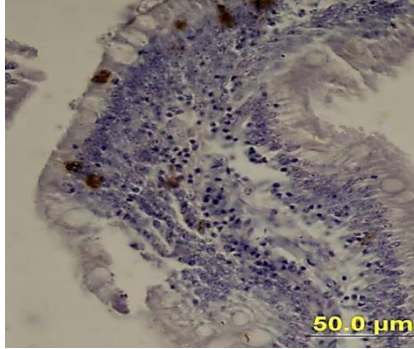


Şekil 7. Orta bağırsakta glukagon IR hücreler

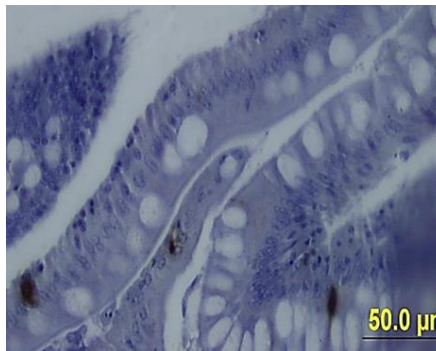
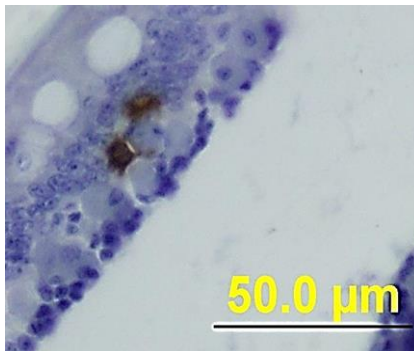
Hücrelerin morfolojik olarak; genelde mekik şekilli ya da ovale yakın iğ görünümlü olduğu, kapalı ya da nadiren açık formda görüldüğü tespit edildi. Kolesistokinin (CCK-8) immunoreaktif hücreler midenin kardial, fundus ve pilorus bölgelerinde görülmezken, ince ve orta bağırsakta çok yoğun miktarlarda (Şekil 9), kalın bağırsakta ise tek tük olarak gözlemlendi (Şekil 10). Bu IR hücreler en yoğun olarak ince bağırsakta belirlendi. Hücrelerin daha çok villus epitel hücreleri arasında lokalize olduğu, morfolojik olarak da genellikle yuvarlak ya da ovale yakın şekillerde ve kapalı formda olduğu tespit edildi.



Şekil 8. Kalın bağırsakta glukagon IR hücreler



Şekil 9. İnce ve orta bağırsakta CCK IR hücreler



Şekil 10. Kalın bağırsakta CCK IR hücreler

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışma; Avrupa yayın balığı (*S. glanis L.*)'nin sindirim kanalında gastrin, glukagon ve kolesistokinin (CCK-8) nöroendokrin hücrelerin varlığını türe özgün olarak göstermiştir.

Gastrin salgılayan nöroendokrin hücrelerin lokalizasyonu türler arasında farklılıklar göstermektedir. Bu hücreler *Channa argus* ve *Pelteobagrus fulvidraco* gibi bazı teleost türlerinin sadece midesinde gözlenirken [2], *Paralichthys olivaceus*'un bütün bağırsak bölümlerinde tespit edilmiştir [10]. *Rhamdia quelen* türünde ise bu endokrin hücrelere midede rastlanmazken, bağırsakların bütün bölümlerinde rastlanmıştır [16]. *Chanos chanos*'da bu immunoreaktivitenin sadece ön ve orta bağırsakta, özellikle de ilk bölümde oldukça belirgin olduğu [18]; *Salmo trutta* ve *Salminus brasiliensis*'de fundik ve pylorik midede yoğun olarak, bağırsakların başlangıç kısmında ise çok az miktarda rastlandığı bildirilmiştir [11, 17]. Mevcut çalışmada ise, *S. glanis*'in gastrin immunoreaktif hücrelerinin yerleşimi *Salmo trutta* ile benzer şekilde; midenin fundus kısmında az, pilorusda daha yoğun olarak, bağırsakların başlangıç kısmında ise çok az sayıda olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *S. glanis*'deki bu hücrelerin, morfolojik olarak farklı formlarda görülmesi, bazı balık türlerindeki hücre formlarına benzerliğini göstermektedir [17, 18]. Balıklarda da memelilerdeki gibi gastrin hormonunun spesifik hedefi, pepsinojen ve HCl salgılayan ekzokrin fundik hücrelerdir [23]. Bu bilgiler değerlendirildiğinde; gastrin immunoreaktif hücrelerin dağılımı, bu hormonun gıda sindiriminde etkin bir rol oynadığını bunu da öncelikli olarak gastrin asit sekresyonunu düzenleyerek yaptığını öngörmektedir.

Sindirim kanalında glukagon varlığı, balık türlerinde değişen yoğunlukta ve farklı lokalizasyonlarda gösterilmiştir [8, 9, 11-14]. Glukagonun, midesiz teleost türlerin genelinde sindirim kanalının özellikle başlangıç kısmında daha yoğun olarak yerleştiği ve epitelde sitoplazmik uzantıları ile değişen morfoloji sergileyen immunoreaktif hücreler şeklinde olduğu Pan vd. tarafından belirtilmiştir [8]. Bosi vd. tarafından yapılan bir çalışmada *Salmo trutta*'da glukagon benzeri endokrin hücrelerin pilorik seka ve tüm bağırsak bölümlerinde, özellikle ön bağırsakta yoğun bir şekilde olduğu

[11], Lee vd. tarafından yapılan başka bir çalışmada ise *Coreoperca herzi*'de sadece ince bağırsakta sınırlı sayıda olduğu tespit edilmiştir [12]. Çınar vd. [9] *Stizostedion lucioperca*'da bu hücrelerin, fundus bezlerinde yüzey epiteline göre daha yoğun, pilorik seka ve ilk bağırsakta ise daha düşük oranda ve daha çok kript epitelinde değişik şekillerde lokalize olduğunu, mide ve bağırsağın diğer bölümlerinde ise immunoreaktivitenin olmadığını bildirmiştir. Min vd.'nin [13] *Ictalurus punctatus*'da yaptıkları çalışmanın sonuçlarına benzer bir şekilde, *S. glanis*'de yapılan bu çalışmada glukagon immunoreaktivitesinin midenin fundusu ile ön ve orta bağırsaklarında, özellikle intestinal mukozanın epitelinde geniş sitoplazmalı, mekik ya da iğ şekilli olarak farklı morfolojik görünümde tespit edildi. *Garra rufa*'da yapılan araştırmada ise, özefagus sonrası genişlemiş mide benzeri kısımda ve tüm bağırsak bölümlerinde, özellikle ilk bağırsakta oldukça yoğun ve epitele yerleşmiş immunoreaktif endokrin hücreler gösterilmiştir [14]. Bu hücrelerin bazale kadar uzanan sitoplazmik uzantıları ve geniş sitoplazmalı şekilleri, parakrin ve nöroendokrin fonksiyon yaptıklarını düşündüren morfolojik bir görünümdür. Buna ilaveten mide ve ilk bağırsak bölümüne yoğun yerleşimleri, bu hormonun asit sekresyonunu regüle ettiğini göstermektedir.

Balıklarda CCK hormonu, merkezi ve periferik sinir sistemi ile sindirim sistemi endokrin hücrelerinde gen ekspresyonu ile ifade edilmiştir [24]. İmmunohistokimyasal olarak yapılan çalışmalar, pek çok balık türünde sindirim sistemi boyunca CCK immunoreaktif hücrelerini göstermişlerdir [11, 12, 15, 16, 18].

CCK-8 endokrin hücreler; *Salmo trutta*'da pilorik seka ve ön bağırsakta [11], karnivor türü olan *Epinephelus fasciatus*'da pilorik mide ve yine ön bağırsakta [25], *Salmo trutta macrostigma*'da ise mide ve daha yoğun olarak pilorik sekada tespit edilmiştir [26]. Başka bir ifadeyle *Stizostedion lucioperca*, ve *Salminus brasiliensis* türlerinde bu endokrin hücrelere mide ve bağırsağın bütün bölümlerinde değişen yoğunlukta rastlanmıştır [17, 27]. *S. glanis*'in sindirim sisteminde yaptığımız immunohistokimyasal boyamalar sonucunda ise sadece ince ve orta bağırsakta bu hücreler çok yoğun olarak tespit edilmiştir. Midenin herhangi bir bölümünde ve kalın bağırsakta ise CCK-8

immunoreaktivitesine rastlanılmamıştır. Bizim sonuçlarımız *Coreoperca herzi*, *Dicentrarchus labrax*, *Odontesthes bonariensis*, *Rhamdia quelen* ve *Chanos chanos* türü balıklarda yapılan çalışmaların bulgularına, immnoreaktivitenin sadece bağırsak bölümlerinde yoğunlaşmış olması yönüyle benzerlik göstermiştir. Ayrıca hücrelerin morfolojik görünümü ve daha çok villuslara yerleşimi ile de bahsedilen literatürlere paraleldir [12, 15, 16, 18, 28]. Balık türleri arasında CCK immunoreaktif hücrelerin türe spesifik yerleşim sergilemesini beslenme alışkanlığı ile ilişkilendirmek mümkündür. Çünkü CCK sindirim enzimlerinin sentezi ve salgılanması ile direk ilişkilidir. Ayrıca CCK'nın biyolojik rolü düşünüldüğünde; *S. glanis*'deki dağılımı safra kesesi kontraksiyonu, pankreatik enzim sekresyonu, gastrointestinal motilitenin stimülasyonu ve gastrik boşalmanın inhibisyonunda ön bağırsağın önemli bir rol oynadığını gösterebilir [29].

Sonuç olarak; *S. glanis*'in sindirim sistemine ait endokrin hücreler gastrin, glukagon ve kolesistokinin (CCK-8) immunoreaktivitesi yönünden incelendi. Bu nöropeptidlerin sistemin farklı bölümlerinde değişen yoğunluk ve lokalizasyonda olduğu tespit edildi. Özellikle midenin son bölümleri ve bağırsakların başlangıç kısmına yerleşmiş olmaları bu nöropeptidlerin gıda girişinin kontrolünde etkin olabileceğini düşündürmektedir.

7. Kaynaklar

1. Linhart O, Setch L, Svarc J, Rodina M, Audebert JP, Grecu J, Billard R (2002). The culture of the European catfish, *Silurus glanis*, in the Czech Republic and in France. *Aquatic Living Resources*, **15**: 139–144.
2. Pan QS, Fang ZP, Huang FJ (2000a). Identification, localization and morphology of APUD cells in gastroenteropancreatic system of stomach-containing teleosts. *World Journal of Gastroenterology*, **6(6)**:842-847.
3. Groff KE, John HY (1997). An immunohistochemical study of the endocrine cells within the pancreas, intestine, and stomach of the gar (*Lepisosteus osseus* L.). *General and Comparative Endocrinology*, **106**: 1–6.
4. Solcia E, Capella C, Buffa R (1987). Endocrine cells of the digestive system. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*. New York. Raven Press. 111p.
5. Sherwood NM, Kruecke SL, Mcrory JE (2000). The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. *Endocrine Reviews*, **21**: 619–670.
6. Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillo WS, Seal LJ, Cohen MA, Batterham RL, Taheri S, Stanley SA, Ghatei MA, Bloom SR (2001). Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes*, **50**: 2540–2547.
7. Peyon P, Lin XW, Himick BA, Peter RE (1998). Molecular cloning and expression of cDNA encoding brain preprocholecystokin in goldfish. *Peptides*, **19**:199–210.
8. Pan QS, Fang ZP, Zhao YX (2000b). Immunocytochemical identification and localization of APUD cells in the gut of seven stomachless teleost fishes. *World Journal of Gastroenterology*, **6**: 96-101.
9. Çınar K, Diler A (2002). Immunohistochemical localization of glucagon, substance-P, and vasoactive intestinal peptide in gastrointestinal tract mucosa of zander. *Journal of Fish Biology*, **60**: 319–327.
10. Kurokawa T, Suzuki T, Hashimoto H (2003). Identification of gastrin and multiple cholecystokin genes in teleost. *Peptides*, **24**: 227–235.
11. Bosi G, Giancamillo AD, Arrighi S, Domeneghini C (2004a). An immunohistochemical study on the neuroendocrine system in the alimentary canal of the Brown trout, *Salmo trutta*, L., 1758.. *General and Comparative Endocrinology*, **138**: 166–181.
12. Lee JH, Ku SK, Park KD, Lee HS (2004). Immunohistochemical study of the gastrointestinal endocrine cells in the Korean aucha perch. *Journal of Fish Biology*, **65(1)**: 170–181.
13. Min HE, Wang K, Zhang Y (2009). Immunocytochemical Identification and Localization of Diffuse Neuroendocrine System (DNES) Cells in Gastrointestinal Tract of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *Agricultural Sciences in China*, **8(2)**: 238-243.
14. Kuru N, Çınar K, Şenol N, Demirbağ E, Diler D (2010). Endocrine Cells in the Gastrointestinal Tract of *Garra rufa*. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **16 (Suppl-B)**: 235–241.
15. Vigliano FA, Munoz L, Hernandez D, Cerutti P, Bermudez R, Quiroga MI (2011). An immunohistochemical study of the gut neuroendocrine system in juvenile pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes). *Journal of Fish Biology*, **78**: 901–911.

16. Hernandez DR, Vigliano FA, Sanchez S, Bermudez R, Domitrovic HA, Quiroga MI (2012). Neuroendocrine system of the digestive tract in *Rhamdia quelen juveniles*: an immunohistochemical study. *Tissue and Cell*, **44**: 220–226.
17. Pereira RT, Costa LS, Oliveira IRC, Araujo JC, Aerts M, Vigliano PV (2015). Relative distribution of gastrin-, CCK-8-, NPY- and CGRP-immunoreactive cells in the digestive tract of dorado (*Salminus brasiliensis*) *Tissue and Cell*, **47**: 123–131.
18. Lin X, Wang P, Ou Y, Li J, Wen J (2017). An immunohistochemical study on endocrine cells in the neuroendocrine system of the digestive tract of milkfish *Chanos chanos* (Forsskal, 1775). *Aquaculture Research*, **48**: 1439–1449.
19. Ku SK, Lee JH, Lee HS (2004). Immunohistochemical study on the endocrine cells in the gut of the stomachless teleost, *Zacco platypus* (cyprinidae). *Anatomia Histologia Embryologia*, **33**: 212–219.
20. Bosi G, Shinn AP, Giari L, Simoni F, Dezfuli BS (2005). Changes in the neuromodulators of the diffuse endocrine system of the alimentary canal of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), naturally infected with *Eubothrium crassum* (Cestoda). *Journal of Fish Diseases*, **28**: 703–711.
21. Stenberger LA, (1986), Immunocytochemistry. 3rd ed. Wiley, New York.
22. Shu S, Ju G, Fan L (1988). The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neuroscience Letters*, **85**: 169–171.
23. Bjenning C, Holmgren S, (1988). Neuropeptides in the fish gut. An immunohistochemical study of evolutionary patterns. *Histochemistry*, **88**: 155–163.
24. Ping HC, Feng K, Zhang GR, Wei KJ, Zou GW, Wang WM (2014). Ontogeny expression of ghrelin, neuropeptide Y and cholecystokinin in blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **98**: 338–346.
25. Hur SW, Lee CH, Lee SH, Kim BH, Kim HB, Baek HJ, Lee YD (2013). Characterization of cholecystokinin-producing cells and mucus-secreting goblet cells in the blacktip grouper, *Epinephelus fasciatus*. *Tissue and Cell* **45**: 153–157.
26. Gençer TB, Bayrakdar A. Yaman M (2012). Immunohistochemical study of the endocrine cells in the stomach and pyloric caeca of the mountain trout, *Salmo trutta macrostigma*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* **11(4)**: 776–785.
27. Şenol N, Çınar K, Eren Ü (2009). Sudak (*Stizostedion Lucioperca L.*, 1758) Balığında Mide ve Bağırsakta Bazı Peptidlerin Lokalizasyonu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* (e-dergi), **4(2)**: 136-150.
28. Diler D, Çınar K, Zorlu S (2011). An Immunohistochemical Study on the Endocrine Cells in the Stomach and Intestine Regions of the *Dicentrarchus labrax*, L., 1758. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **25 (1)**: 01 – 06.
29. Jensen J (2001). Regulatory peptides and control of food intake in non-mammalian vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **128**: 471–479.