



Araştırma Makalesi

Beslenme tipi ve yaşam ortamı farklı olan balıklarda immun sistem organları: I. Ön böbrek üzerinde histolojik çalışmalar

Ülker Eren^{1*} Müge Bozkurt²

¹Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Aydın/Türkiye. ²Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Aydın/Türkiye.

ÖZET

Öz bilgi/Amaç: Sunulan çalışmada, yaşam ortamı ve yeme alışkanlığı farklı olan üç balıkta, ön böbrek dokusunun histolojik ve histokimyasal özelliklerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Araştırmada materyal olarak; erişkin 15 adet deniz levreği (*Dicentrarchus labrax* L., 1758), 10 adet sudak (*Sander lucioperca* L., 1758) ve 6 adet ot sazanı (*Ctenopharyngodon idella* Val., 1844) kullanıldı. Ön böbrek örnekleri % 10'luk tamponlu nötral formalin (NBF) ve Bouin tespit solusyonunda tespit edildiler. Doku kesitlerine üçlü boyama yöntemi, Gordon ve Sweet'in gümüşleme metodu, Verhoeff boyama metodu, PAS reaksiyonu ve methyl green pyronin boyama yöntemleri uygulandı.

Bulgular ve Sonuç: Ön böbreğin deniz levreği ve sudakta hematopoetik özellikte olduğu, ot sazanında ise hemapoetik dokunun glomerular böbrek dokusu ile birarada bulunduğu görüldü. Her üç balıkta da melanomakrofaj merkezleri gözlemlendi. Deniz levreği ve sudakta endokrin hücre grupları da gözlenirken ot sazanında rastlanmadı. Her üç balıkta da miyeloid hücreler ve makrofajlar PAS pozitif reaksiyon verdiler. Ayrıca deniz levreğinde mast hücreleri, sudakta retikulum hücreleri de PAS pozitifitesi gösterdiler. Her üç balıkta da ön böbrek dokusunda pirozinofilik plazmoblast ve plazma hücreleri tespit edildi. Araştırma sonunda, ön böbrek dokusunun hem hematopoetik özellikte olduğu hem de savunmada rol aldığı görüldü. Karnivor balıkların ön böbreğinin savunma özelliklerinin, herbivor olan türe göre daha gelişmiş olduğu sonucuna varıldı. Bu durumda, incelenen balıklarda, ön böbrekteki savunma mekanizması üzerine, suyun tuzluluğundan ziyade yeme alışkanlığının oluşturduğu ortamın daha etkili olduğu ileri sürülebilir.

Anahtar kelimeler: *Dicentrarchus labrax*, *Sander lucioperca*, *Ctenopharyngodon idella*, ön böbrek, histoloji.

The immune system organs in fishes with different feeding behavior and habitats: I. Histological studies on head kidney

ABSTRACT

Background/Aim: The aim of this study was to investigate histological and histochemical differences of the head kidney tissue among three fish with different feeding behavior and habitats.

Material and Method: As a material, adult fifteen sea basses (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) and ten zanders (*Sander lucioperca* L., 1758), and six grass carps (*Ctenopharyngodon idella* Val., 1844) were used. Head kidney tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin (NBF) and Bouin's solution. The tissue sections were stained using triple, Gordon and Sweet's silver staining, Verhoeff's stain, PAS reaction and methyl green pyronin staining methods.

Results and Conclusion: It was observed that the head kidney is hematopoietic organ of sea bass and zander but hematopoietic tissue and portions of nephrotic tissue, both were found in head kidney of grass carp. In all three fishes, melanomacrophage centers were seen. Even though clusters of endocrine cells were seen in sea bass and zander, they were not present in grass carp. Myeloid cells and macrophages were giving a positive PAS reaction. Moreover mast cells in sea bass and reticular cells in zander were stained with pas reaction. In all three fishes, pyroninophilic plasmablasts and plasma cells were observed in head kidney. At the end of the research, it was seen that the head kidney is hematopoietic and defensive organ. In addition, research result showed that carnivorous fishes have more advanced defensive properties head kidney than herbivores. In this case, it can be affirm that the environment which connected to eating habits more effective on defens mechanism rather than the water's salinity in head kidney of examined fish.

Key words: *Dicentrarchus labrax*, *Sander lucioperca*, *Ctenopharyngodon idella*, head kidney, histology.

Corresponding to: Ülker Eren, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Aydın/Türkiye
Corresponding author: ueren@adu.edu.tr

Giriş

Omurgalı olarak tanımlanabilen ilk fosil, zırhlı balık Ostracoderm'lerdir. Bunların günümüzdeki temsilcisi, çenesiz balık Agnatha (hagfish and lampreys) olarak bilinir. Çeneli balıklar 400 milyon yıl öncesine dayanır ve onların torunları tatlı ve tuzlu suların kıkırdaklı (Chondrichthyes) ve kemikli (Osteichthyes) balıklarıdır (Zapata ve ark., 1996; Zimmer, 2000). Yaşayan omurgalıların 55000 türünün yarısından fazlasını oluştururlar. Bu olağanüstü taksonomik çeşitlilikle birlikte, aynı derecede etkileyici bir habitat çeşitliliği de vardır. Balıklar göllerde, yılın büyük bir kısmı buzlarla çevrili olan kutuplarda, tropikal bataklıklarda, geçici oluşan gelgit havuzlarında, okyanusların derinlerinde ve daha birçok yerde, neredeyse tüm önemli sucul habitatlarda bulunurlar. Böyle farklı çevrelerde gelişmek ve kolonize olmak için oldukça belirgin bir şekilde anatomik, fizyolojik, davranışsal ve ekolojik adaptasyonlar geliştirmişlerdir (Helfman ve ark., 2009).

Balıkların yaşam yeri olan akvatik habitatlar, deniz ve tatlı su habitatları olmak üzere, başlıca iki grupta toplanabilir. Balıklar denizlerde ya pelajik yani su kitlesi içinde ya da bentik, yani zeminle ilişkili olarak yaşarlar. Tatlı su ortamlarından yerüstü suları, lentik otam (durgunsular) ve lotik ortam (akarsular) olmak üzere başlıca iki gruba ayrılırlar (Demir, 1992).

Omurgalıların kabaca yarısını oluşturan balık türlerinin %95'inden fazlasını, 23500'den fazla olan türüyle, kemikli balıkların, ışın yüzgeçli balıkları oluşturur. Işın yüzgeçli balıkların % 99,8'ini de teleost balıklar oluşturur (Volf, 2005; Near ve ark., 2012).

Balıklar, tatlı sulardan, acı su ve deniz suyuna kadar değişen biyotoplarda yaşamlarını devam ettirirler (Wurts, 1998). Balıkların yaşam ortamındaki mikrobiyal ortamın kompozisyonunun, suyun tuzluluğu ile çok yakın korelasyonda olduğu tespit edilmiştir (Lozupone ve Knight, 2007). Dolayısıyla balıklarda intestinal mikrobiyata da suyun tuzluluğu ile yakın ilişki vardır (Sullam ve ark., 2012). İlaveten balıkların yeme alışkanlıkları gastro intestinal mikrobiyotanın kompozisyonu ve fonksiyonları için önemli olmaktadır (Ringo ve ark., 2006a). Kısaca, balıkların bulunduğu ortamın tuzluluğu ve yeme alışkanlıklarına bağlı olarak, balığın karşıkışıya olduğu mikrobiyal ortam oluşmaktadır.

Balıklar yeme alışkanlıkları açısından, karnivor, herbivor, omnivor ve limnivor olmak üzere dört temel grup oluştururlar (Agbon ve ark., 2016). Balıklar, suda bulunan fitoplankton (bitkisel özellik gösteren, su ve nemli yerlerde yaşayabilen tek hücreli canlı), zooplankton (hayvansal özellik gösteren, su ve nemli yerlerde yaşayabilen tek hücreli canlı), plankton olmayan diğer organizmalar, bitkiler ve diğer balıklarla beslenirler (Ekingen, 2001).

Biyotik ve abiyotik ekolojik faktörler immun sistemin evrimini belirler (Schulenburg ve ark., 2009). Balıkların immun sistemi, özellikle buldukları akvatik ortam ile aynı zamanda soğukkanlı olmaları ile koşullandırılmaktadır (Tort ve ark., 2003). Balıkların buldukları çevrede, sıcaklık, besinlere erişebilirlik, patojenlerin genetik farklılıkları gibi değişken olan çevresel koşullara bağlı olarak gelişen immun özellikler, balıkların buldukları çevrede yaşama ve çoğalma şansını artırmaya yöneliktir (Segner ve ark., 2012).

Teleost balıklarda kemikliliği ve lenf düğümü bulunmaz, esas

lenfoid organları ön böbrek, timus, dalak ve mukoza ilişkili lenfoid dokudur (Meseguer ve ark., 1995; Zapata ve ark., 2006). Balıklarda ön böbrek eritroid, lenfoid ve miyeloid hücrelerin üretildiği yerdir (Willett ve ark., 1999; Romano ve ark., 2002). Tatlı su teleostlarında timus gelişen ilk lenfoid organ olmakla beraber, hematopoetik prekürsörler ilk olarak böbrekte görülür. Tuzlu su teleostlarında ise yine ilk hematopoetik prekürsörler böbrekte görülür (Padros ve Crespo, 1996).

Balık yetiştiriciliğinde, yüksek nitelikte balık üretmek ve uygun büyüme koşullarını elde edebilmek önemlidir. Bu amaçla günümüzde balıkların beslenmesi, stres koşullarının azaltılması ve balıkların hastalıklardan korunması amacıyla çok sayıda bilimsel çalışma yapılmaktadır. Beslenme dahil söz konusu çalışma alanlarının hepsi balığın savunma mekanizmasıyla doğrudan bağlantılı olmaktadır.

Balık yetiştiriciliğinde üretimin devamı, balık sağlığının korunması ile mümkündür. Birçok teleost balık türünde, immunité üzerine, histolojik ve moleküler düzeyde çok çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Beslenme ve yaşam ortamı farklılığı açısından ise türler arasında immün sistem organları ile ilgili histolojik, karşılaştırmalı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Oysa konak-patojen etkileşimi, çevre tarafından güçlü bir şekilde yönetilmektedir (Harwell ve ark., 2002).

Yaşam ortamı ve yeme alışkanlıkları farklı olan balıkların, immün sistem organlarının da farklı özelliklerde olabileceği hipotezine dayanarak, ön böbrek ve dalağın karşılaştırmalı olarak araştırılması gerektiği düşünülmüştür. İlk aşamada sunulan bu çalışmada, tuzlu suda ve tatlı suda yaşayan karnivor balıklar ile tatlı suda yaşayan herbivor balıkta ön böbreğin incelenerek, beslenme ve yaşam ortamı farklılığının, histolojik ve histokimyasal farklılık oluşturup oluşturmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Sunulan araştırma, ADÜ-HADYEK tarafından, B.30.2.ADÜ.0.06.00.00/124-HEK/2008/51 nolu karar ile onaylanmıştır. Araştırmada karnivor balıklara örnek olarak tuzlu su balığı *Dicentrarchus labrax* L.,1758 (deniz levreği) (Şekil 1A) (Abbate ve ark., 2012) ve tatlı su balığı *Sander lucioperca* L.,1758 (sudak) (Şekil 1B) (Özyurt ve ark., 2012), herbivor balık örneği olarak da *Ctenopharyngodon idella* Val., 1844 (ot sazani) (Şekil 1C) (Cudmore ve Mandrak, 2004) belirlendi. Teleost balıklardan olan, deniz levreği, sudak ve ot sazani'nin omurgalı sistematiğindeki yeri şu şekildedir (Demirsoy, 1998).

Süper Classis: Pisces (Balıklar)

Classis 2: Osteichytes (Kemikli Balıklar)

Subclassis: Actinopterygii (Işınlı yüzgeçliler)

Süper Ordo: Teleostei (Tipik Kemikli Balıklar)

Ordo: Cypriniformes (Sazangiller)

Super familia: Cyprininae

- ***Ctenopharyngodon idella* (grass carp, ot sazani)**

Ordo: Perciformes (Levrekler)

Familia: Percidae

- ***Sander lucioperca* (zander, sudak)**

Familia: Moronidae

- ***Dicentrarchus labrax* (sea bass, deniz levreği)**

Deniz levreği, Latmos Su Ürünleri (Didim/AYDIN); sudak,

Tablo 1. Materyal olarak kullanılan balıkların boy ve ağırlık değerleri
Table 1. Length and weight values of fish used as material

Materyal	Çatal boy	Total boy	Ağırlık
Deniz levreği	30 cm	32 cm	400 gr
Sudak	25 cm	26 cm	130 gr
Ot sazani	75 cm	80 cm	3500 gr

Seyhan Baraj Gölü (ADANA); ot sazanı ise Akdeniz Su Ürünleri Araştırma Üretim ve Eğitim Enstitüsü (Kepez Mevkii/ANTALYA)'nden sağlandı.

Araştırmada, erişkin ve sağlıklı olan, 15 adet deniz levreği, 10 adet sudak ve 6 adet ot sazanı materyal olarak kullanıldı. Balıklar, MS222 (tricaine methanesulfonat, Sandoz) (10 litre su / 1 gram MS222) ile (Ortuno ve ark. 2002) derin anesteziye alındıktan sonra tartıldılar, çatal ve total boyları ölçüldü (Tablo 1). Dekapitasyon işlemi uygulandıktan sonra karın boşlukları açılarak böbrek dokusu örnekleri alındı.

Alınan doku örnekleri parafin kesitler için % 10'luk tamponlu nötral formalin (Neutral Buffered Formalin, NBF) ve Bouin tespit solusyonuna alındılar. Her bir tespit solusyonuna, 15 adet deniz levreği, 10 adet sudak ve altı adet ot sazanı ön böbrek doku örneği alındı. Dokular, % 10'luk NBF'de 24 saat ve Bouin tespit solusyonunda 6 saat tespit edildi; NBF ile tespit edilen doku örnekleri bir gece akarsuda yıkamaya alındı. Bouin solusyonu ile tespit edilen doku örnekleri ise tespit süresi sonunda 12 saat %70 alkolde bekletildi. Rutin doku takibinden sonra dokular parafine gömüldü. Parafin bloklardan her bir boyama yöntemi için, 5 µ kalınlığında, 80 µ arayla, beşer kesit alındı.

Dokuların genel görünümü için kesitlere üçlü boyama (Crossman, 1937) yöntemi uygulandı. Retikulum ipliği için Gordon ve Sweet'in gümüşleme metodu, elastik iplikler için Verhoeff boyama metodu, PAS pozitif hücreler için periyodik asit Schiff (PAS) reaksiyonu, plazma hücreleri için methyl gren pyronin boyama yöntemleri uygulandı (Culling ve ark., 1985). Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu (Leica DMLB) ve buna bağlı görüntü analiz sistemi (Q-WinStandard) yardımı ile incelendi. İncelenen kesitlerin gerekli görülen kısımlarının fotoğrafları çekildi.



Şekil 1. Araştırmada kullanılan balıklar. A. Deniz levreği (*Dicentrarchus labrax* L., 1758), B. Sudak (*Sander lucioperca* L., 1758), C. Ot sazanı (*Ctenopharyngodon idella* Val., 1844).

Figure 1. The fishes used in research . A. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758), B. Zander (*Sander lucioperca* L., 1758), C. Grass carp (*Ctenopharyngodon idella* Val., 1844).

Bulgular

Yapılan deneme boyamaları sonucunda, üçlü boyama için Bouin, diğer boyama metotları için ise NBF tespit solusyonunun daha uygun sonuç verdiği tespit edildi.

İncelenen her üç balıkta da böbrek kapsülünün ince olduğu görüldü. Ön böbreğin deniz levreği ve sudakta hematopoetik özellikte olduğu, ot sazanında ise hemapoetik dokunun glomerular böbrek dokusu ile birarada bulunduğu gözlemlendi (Şekil 2). Ayrıca deniz levreği ve sudakta endokrin hücre alanları dikkati çekti (Şekil 2). Hematopoetik dokuda eritroid, lenfoid ve

miyeloid hücre grupları ve kan damarları gözlemlendi (Şekil 2).

Her üç balıkta da melanomakrofaj merkezleri ayırt edildi (Şekil 3). Melanomakrofaj merkezlerinin farklılıklara sahip oldukları gözlemlendi. Bazı melanomakrofaj merkezlerinin bağdoku elemanları ile kapsül benzeri sınırlanmış olduğu (Şekil 3A) dikkati çekti. Melanomakrofaj merkezlerindeki makrofajlardaki pigmentler sarı, kahverengi ve siyah olarak gözlemlendi. Sudakta melanin birikiminin en fazla olduğu (Şekil 3B), özellikle damarların yakınında yerleştikleri görüldü. Ot sazanında ise melanomakrofaj merkezlerindeki hücrelerde melanin miktarının oldukça az olduğu ayrıca sarı ve kahverengi pigment bulunduğu görüldü (Şekil 3C). Ayrıca her üç balıkta da makrofajların tek tek ya da ikili üçlü gruplar halinde de bulunabildiği dikkati çekti.

Ön böbrek dokusunda retikulum iplikleri incelendiğinde, kapsülde, parenşimde ve damarların çevresinde bulunduğu görüldü. Özellikle deniz levreğinde daha fazla miktarda olan retikulum ipliklerinin, dokunun içine doğru trabekül benzeri bölmeler oluşturduğu (Şekil 4A), parenşimde ise hem deniz levreği hem de sudakta ağ benzeri bir yapı şekillendirdiği dikkati çekti (Şekil 4A, B). Ot sazanında retikulum ipliklerinin miktar olarak daha az olduğu gözlemlendi (Şekil 4C).

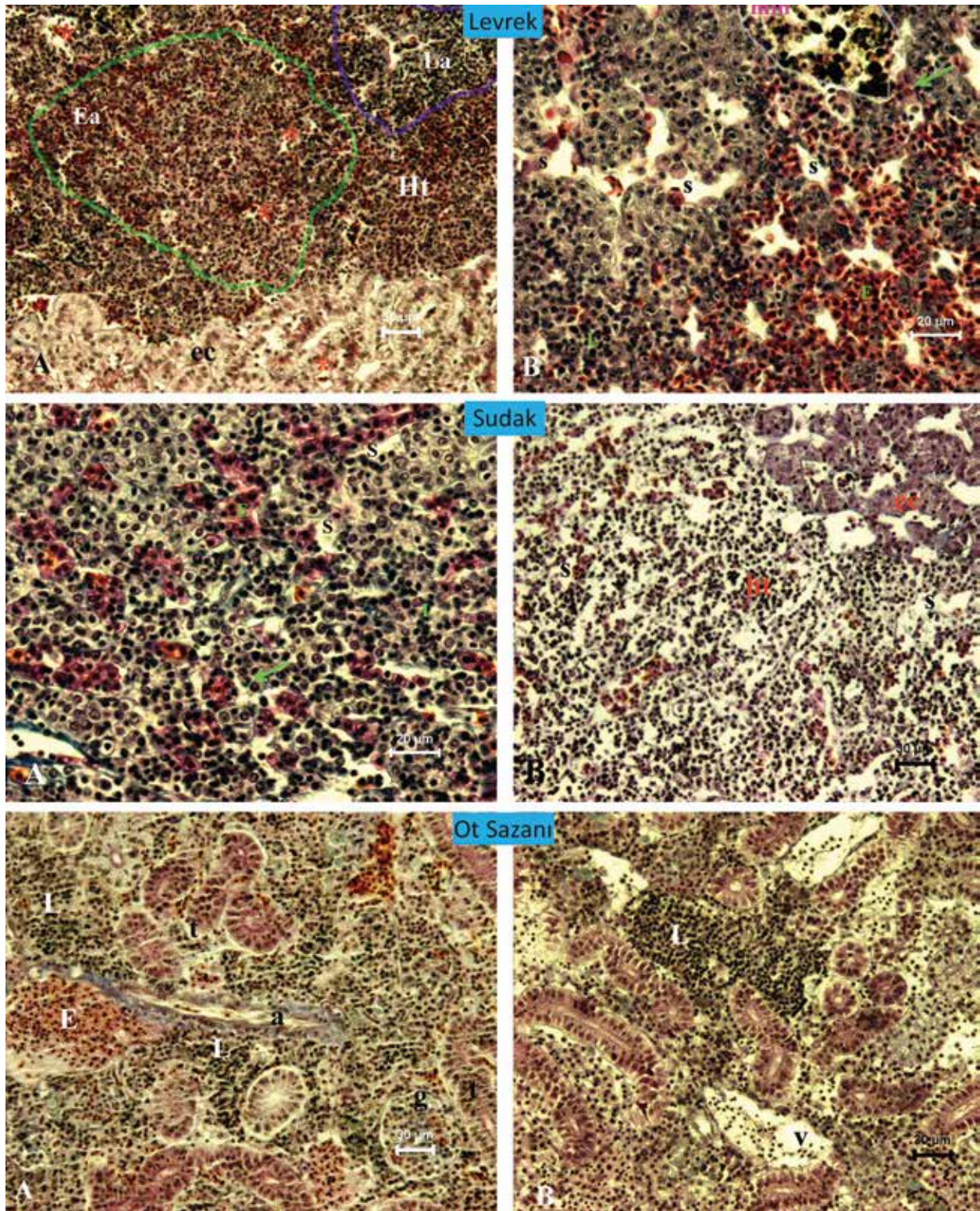
Ön böbrek dokusunda elastik iplik varlığı araştırıldı. Deniz levreği (Şekil 5A) ve sudakta (Şekil 5B) elastik ipliklere kapsülde, trabekül benzeri bölmelerde, doku içerisinde, melanomakrofaj merkezlerinin etrafında rastlandı. Ot sazanında ise elastik ipliklerin damarların etrafında daha belirgin olarak yer aldığı gözlemlendi (Şekil 5C).

Ön böbrek dokusunda her üç balıkta da PAS pozitif hücreler tespit edildi. Deniz levreğinde miyeloid hücreler (Şekil 6A), mast hücreleri ve makrofajların PAS pozitif reaksiyon verdikleri görüldü (Şekil 6B, C). Sudakta, melanomakrofaj merkezlerinde melanin içeriğinin fazla olmasına bağlı olarak, daha az sayıda makrofajın PAS reaksiyon verdiği gözlemlendi. Ayrıca farklı olarak sudakta retikulum hücrelerinin de PAS pozitif reaksiyon verdikleri tespit edildi (Şekil 7A, B). Ot sazanı böbreğinde ise miyeloid seri hücrelerin ve melanin miktarı yok denecek kadar az olan makrofajların, kuvvetli PAS reaksiyonu verdikleri görüldü (Şekil 8).

Ön böbrek dokusunda plazma hücrelerinin varlığı da araştırıldı. Deniz levreğinde (Şekil 9A), sudakta (Şekil 9B) ve ot sazanında (Şekil 9C) ön böbrek dokusunda pironin pozitif hücreler olarak plazmoblast ve plazma hücreleri ayırt edildi.

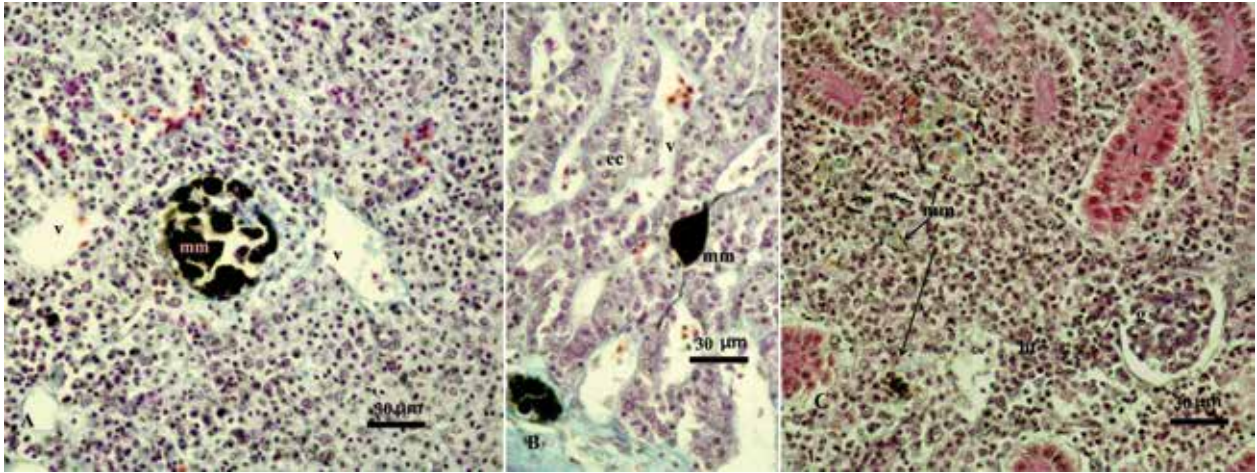
Tartışma ve Sonuç

Balıklarda ön böbrek dokusunun memelilerdeki kemikiliği gibi hematopoetik özellikte olduğu daha önce bildirilmiştir (Fange, 1986; Esteban ve ark., 1989; Meseguer ve ark., 1990; Meseguer ve ark., 1995; Zvollo ve ark., 2005; Zapata ve ark., 2006; Kondera, 2011). Sunulan çalışmada ön böbrek dokusu deniz levreği, sudak ve ot sazanında histolojik ve histokimyasal olarak incelendi. Her üç balıkta da ince bir kapsüle sahip olan ön böbrek dokusunun parenşim kısmının deniz levreği (Esteban ve ark., 1989; Meseguer ve ark., 1990, 1991) ve sudakta daha yoğun olmak üzere hematopoetik özellikte olduğu görüldü. Yapılan literatür taramasında sudak ön böbrek dokusu ile ilgili histolojik, tanımlayıcı bir çalışmaya rastlanamadı. Bunun yanında, ot sazanında hematopoetik doku ile birlikte nefrotik dokunun da bulunduğu dikkati çekti. Morovvati ve ark. (2006), de ot sazanında yaptıkları çalışmada yoğun hematopoetik dokunun arasında ekskretör tubüller ile birlikte glomerulusların da olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte Kondera ve ark. (2012), ot sazanı ön böbreğinin oldukça yüksek hematopoetik, özellikle eritropoietik kapasiteye sahip olduğunu göstermişlerdir.



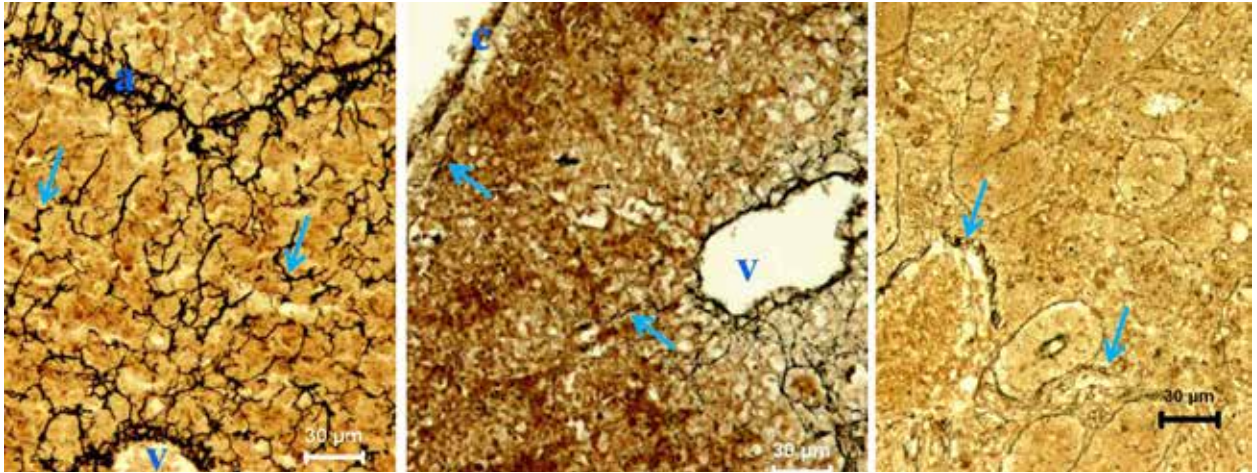
Şekil 2. Önböbrek dokusunun histolojik görünümü. Üçlü Boyama. Levrek: A. Ht: Hematopoetik doku, La: Lenfoid alan, Ea: Eritroid alan, ec: Endokrin hücreler, *: Sinuzoidler. B. L: Lenfoid alan, E: Eritroid alan, mm: Melanomakrofaj merkezi, S: Sinuzoidler, ok: Miyeloid seri hücreleri. Sudak: A. S: Sinuzoidler, E: Eritroid alanlar, L: Lenfositler, ok: Miyeloid hücre. B. ht: Hematopoetik doku, ec: Endokrin hücreler. Ot sazanı: A. L: Lenfoid alan, E: Eritroid alan, a: Arter, g: Glomerulus, t: Böbreğe ait tubuler yapı. B. v: Vena, L: Lenfoid alan.

Figure 2. Histological appearance of head kidney. Triple staining. Sea Bass: A. Ht: Hemopoietic tissue, La: Lymphoid area, Ea: Erytroid area, Ec: Endocrine cells, *Sinusoids. B. L: Lymphoid area, E: Erytroid area, mm: melano-macrophagecenter, S: Sinusoids, arrow: Cells of myeloid series. Zander: A. S: Sinusoids, E: Erytroid area, L: Lymphocytes, arrow: Cell of myeloid series. B. Ht: Hemopoietic tissue, ec: Endocrine cells. Grass carp: A. L: Lymphoid area, E: Erytroid area, a: Artery, g: Glomerulus, t: tubular structure of kidney. B. V: Vein, L: Lymphoid area.



Şekil 3. Sudakta (A, B) ve Ot sazanında (C) ön böbrek dokusunda melanomakrofaj merkezlerinin görünümü. Üçlü boyama. A. Hematopoetik dokuda damarların yakınında melanomakrofaj merkezi. mm: Kapsül benzeri sınırlanmış melanomakrofaj merkezi, V: Damar. B. Endokrin dokuda melanomakrofaj merkezi. ec: Endokrin hücreler, mm: Melanomakrofaj merkezi, V: Damar. C. melanomakrofaj merkezleri. ht: Hematopoetik doku, mm: Çizgi ile sınırlanmış melanomakrofaj merkezleri (oklar), g: Glomerulus, t: Tubulus.

Figure 3. Appearance of melano-macrophage centers in head kidney of zander (A, B) and grass carp (C). Triple staining. A. Melano-macrophage center at near the vessels in hematopoietic tissue, V: Vessel. B: Melano-macrophage center in endocrine tissue. ec: Endocrine cells, mm: melanomacrophage center, V: Vessel. C. Melano-macrophage centers which restricted with line (arrows), g: Glomerulus, t: Tubulus.



Şekil 4. Ön böbrek dokusunda hematopoetik alanda retikulum ipliği görünümü. Gordon ve Sweet'in gümüşleme metodu. A. Deniz levreği ön böbreğinde retikulum ipliği görünümü. V: Damar, a: Trabekül benzeri yapı, Oklar: Ağ görünümü. B. Sudakta ön böbreğinde retikulum ipliği görünümü. c: Kapsül, V: Damar, oklar: Retikulum ipliği. C. Ot sazanı ön böbreğinde retikulum ipliği görünümü. Oklar: Retikulum ipliği

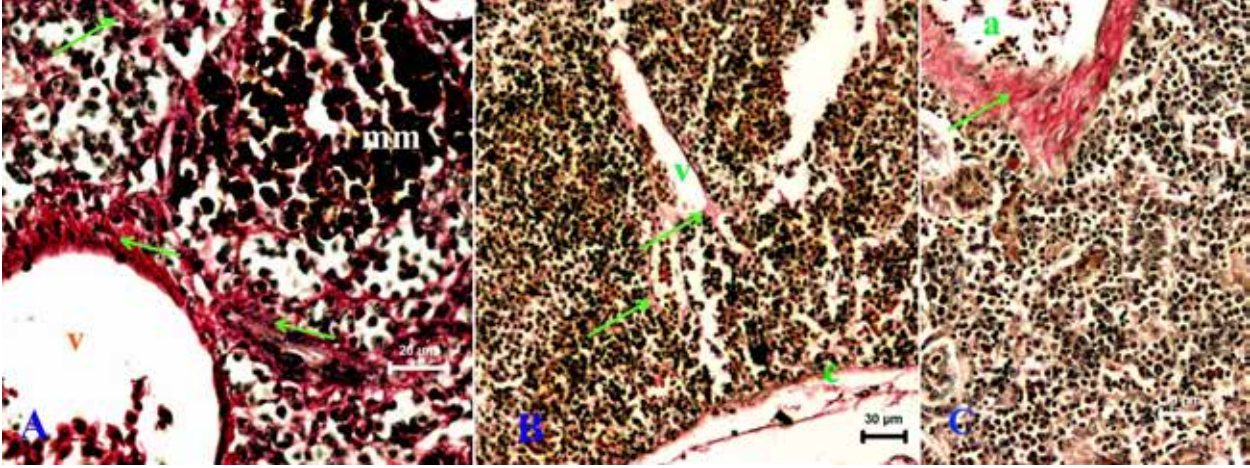
Figure 4. Appearance of reticular fibers at hematopoietic area of head kidney. Gordon and Sweet's silver staining method. A. Appearance of reticular fibers in head kidney of sea bass. V: Vessel, a: Trabecule like structure, Arrows: Reticular formation. B. Appearance of reticular fibers in head kidney of zander. C: Capsule, V: Vessel, Arrows: Reticular fibers. C. Appearance of reticular fibers in head kidney of grass carp. Arrows: Reticular fibers.

Sunulan araştırmada her üç balıkta da ön böbrek dokularında eritropoietik alanlar, miyeloid seri hücreler ve lenfoid alanlar tespit edilmiştir. Deniz levreğinde araştırmacılar ön böbrek dokusunda eritropoezis ve trombopoezis (Esteban ve ark., 1989) ile granulopoezisin (Meseguer ve ark., 1990) gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Çalışma materyalinde tespit edilen lenfoid alanlardaki hücreler lenfositler ve monositler olabilirler. Söz konusu bulgu araştırmacıların bulgularıyla uyumludur. Sazangillerden *Squalius cephalus* (L.) ön böbreğinde çalışan Kondera (2011), lenfoid seri hücrelerin en fazla oranda bulunduğunu belirtmişlerdir. Nitekim ön böbreğin aynı zamanda lenf düğümü anoloğu olarak çalıştığı da ileri sürülmüştür (Kaattari ve Irwin, 1985). Zvollo vd. (2005), gökkuşağı alabalıklarında böbrekte B lenfosit prekürsörlerini ve plazma hücrelerini tespit etmişler ve ön

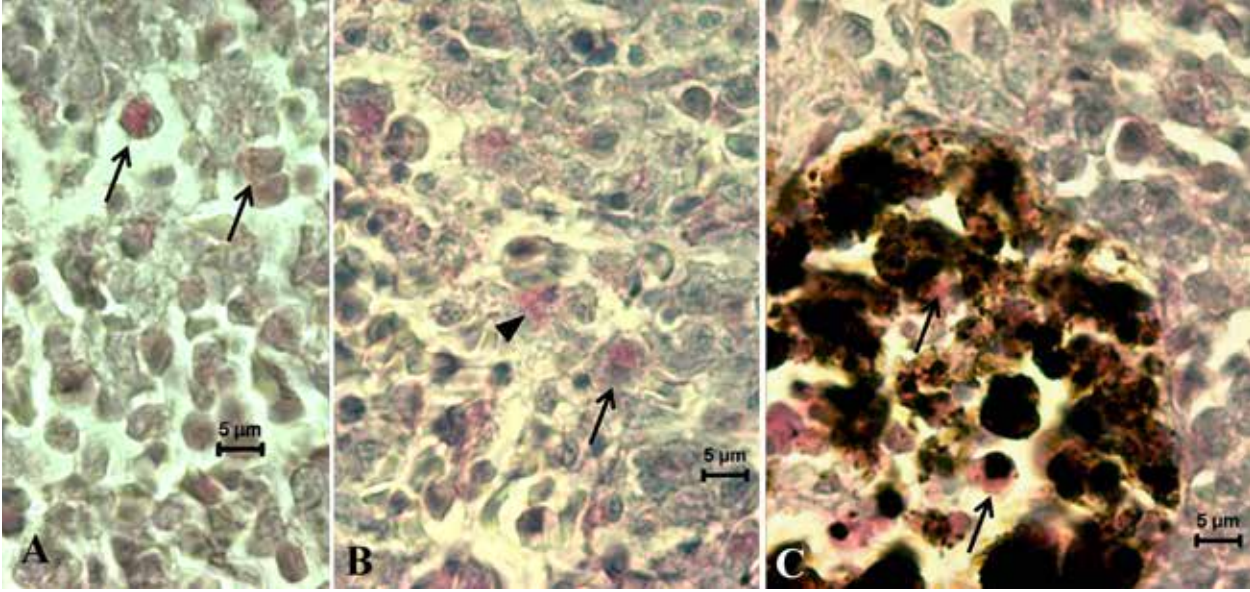
böbreğin hematopoetik özelliği yanında humoral immün yanıtın oluştuğu bir organ olduğunu bildirmişlerdir. T lenfositler memelilerde olduğu gibi balıklarda da timusta şekillenmekle beraber (dos Santos ve ark., 2000), olgun T lenfositlere böbrek dokusunda da rastlanmaktadır (Scapigliati ve ark., 1995; Nakanishi ve ark., 2015).

Balıklarda ön böbrek aynı zamanda memelilerdeki adrenal bezlerin homologu olan, kortikosteroid ve diğer hormonları salgılayan, endokrin hücre gruplarını barındırır. Bu şekilde ön böbrek, balıklar için nöroimmunoendokrin bağlantıları ile önemli bir organdır (Tort ve ark., 2003). Yapılan araştırmada endokrin hücre grupları deniz levreği ve sudağın ön böbreğinde görülmüştür. Bunun yanında ot sazanında doku alınan bölgede endokrin hücre gruplarına rastlanmamıştır. Abelli ve ark. (1996) deniz levreğinde ön böbrekte adrenalin ve noradrenalin



Şekil 5. Ön böbrek dokusunda hematopoietik alanda elastik iplik görünümü. Verhoeff'un elastik iplik boyama metodu. A. Deniz levreği ön böbrek dokusunda elastik ipliklerinin görünümü. V: Vena, mm: Melanomakrofaj merkezi, oklar: Elastik iplikler. B. Sudak ön böbrek dokusunda elastik ipliklerinin görünümü. V: Vena, c: Kapsül, oklar: Elastik iplikler. C. Ot sazani ön böbrek dokusunda elastik ipliklerinin görünümü. a: Arter, ok: Elastik iplikler.

Figure 5. Appearance of elastic fibers at hematopoietic area in head kidney. Verhoeff's elastic fiber staining method. A. Appearance of elastic fibers in head kidney of sea bass. V: Vein, mm: Melano-macrophage center, arrows: Elastic fibers. B. Appearance of elastic fibers in head kidney of zander. V: Vein, c: Capsule, arrows: Elastic fibers. C. Appearance of elastic fibers in head kidney of grass carp. A: Artery, arrow: Elastic fiber.



Şekil 6. Deniz levreğinde ön böbrek dokusunda PAS reaksiyonu veren hücrelerin görünümü. PAS boyama metodu. A. Miyeloid hücrelerin görünümü (oklar), B. PAS pozitif hücreler. Mast hücresi (ok başı), makrofaj (ok), C. Melanomakrofaj merkezi (mm) ve PAS pozitif reaksiyon veren hücreler (oklar).

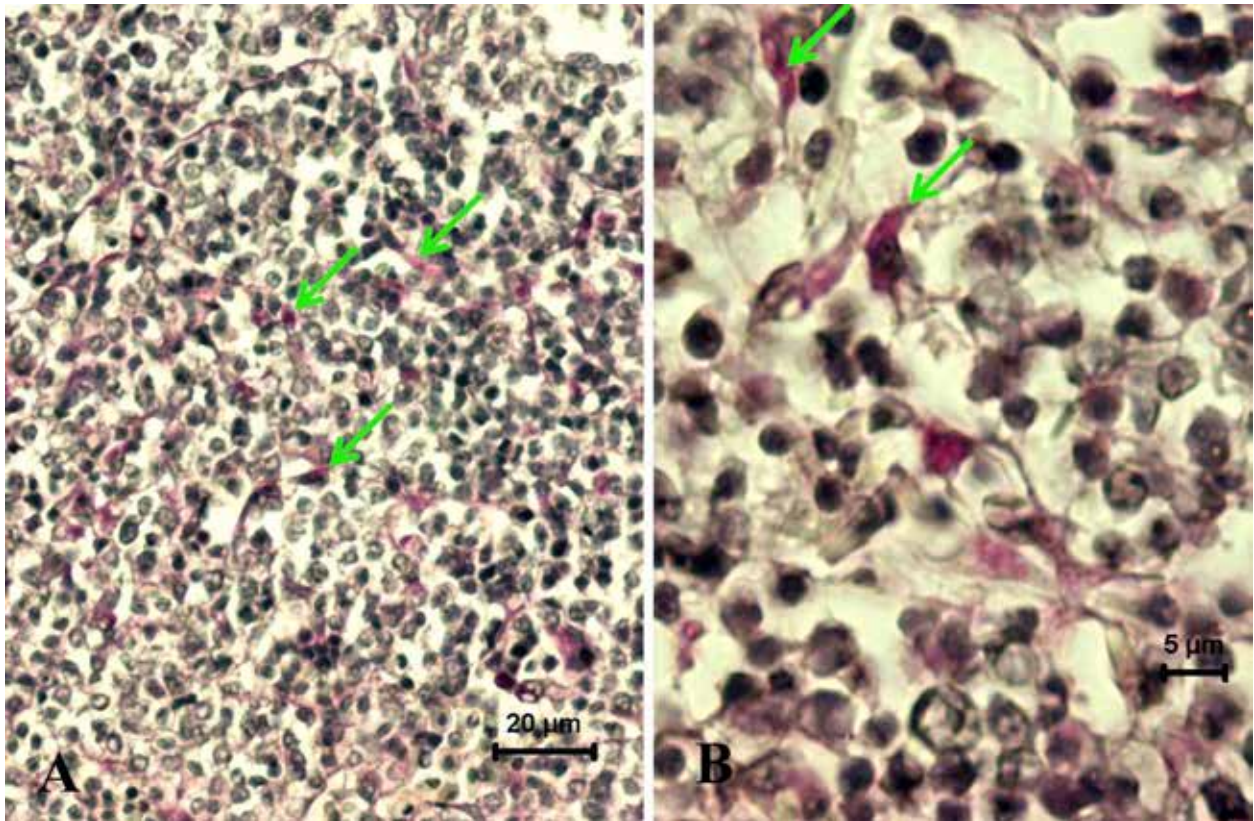
Figure 6. Appearance of PAS positive cells in head kidney of sea bass. PAS staining. A. Myeloid cells (arrows), B. PAS positive cells. Mast cell (arrow head), macrophage (arrow). C. Melano-macrophage center (mm) and PAS positive cells (arrows).

salgılayan hücreleri göstermişlerdir. Sudakta ve ot sazaniında ön böbrekte endokrin hücre ile ilgili herhangi bir kaynağa rastlanamamıştır.

Sunulan çalışmada bütün ön böbrek örneklerinde melanomakrofaj merkezleri gözlemlendi. Melanomakrofaj merkezlerinin balıklar arasında farklılıklara sahip olduğu görüldü. Bazı melanomakrofaj merkezlerinin kapsül benzeri sınırlanmış oldukları dikkati çekti. Meseguer ve ark. (1994) deniz levreğinde ön böbrekte melanomakrofaj merkezlerinden büyük olanları yassılmış fibroblast benzeri retikulum hücreleri ile sınırlanmış olduğunu göstermişlerdir. Sunulan çalışmada da benzer bulgu kaydedilmiştir. Sudakta melanin birikiminin en fazla olduğu, özellikle damarların yakınında yerleştikleri görüldü. Ot sazaniında ise melanomakrofaj merkezlerindeki hücrelerde melanin miktarının oldukça az olduğu görüldü. Ayrıca her üç balıkta da makrofajların tek tek ya da ikili üçlü

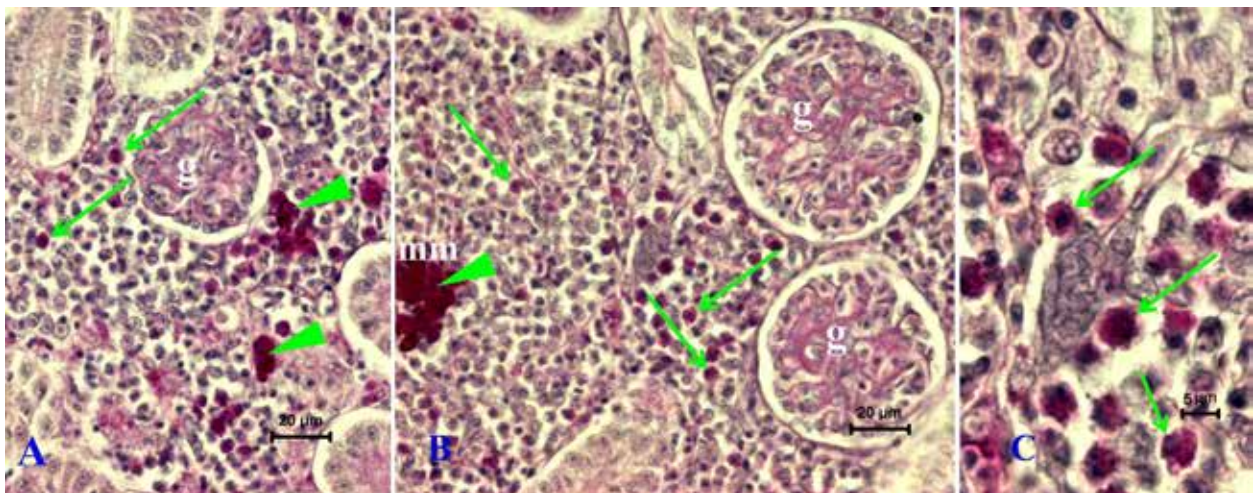
gruplar halinde de bulunabildiği dikkati çekti.

Deniz levreği ön böbreği stromasında Meseguer ve ark. (1991), fibroblast benzeri retikulum hücreleri, makrofaj tipi retikulum hücreleri az miktarda retikulum iplikleri ve adventisyal hücrelerle sınırlı sinuzoidlerden bahsetmektedirler. Sunulan çalışmada ön böbrek dokusu stromasında retikulum ipliklerinin kapsülde, parenşimde ve damarların çevresinde bulunduğu görüldü. Özellikle deniz levreğinde daha fazla miktarda olan retikulum ipliklerinin, dokunun içine doğru trabekül benzeri bölmeler oluşturduğu, parenşimde ise hem deniz levreği hem de sudakta ağ benzeri bir yapı şekillendirdiği dikkati çekti. Ot sazaniında retikulum ipliklerinin miktar olarak daha az olduğu gözlemlendi. Imagava ve ark. (1994) sazan (*Cyprinus carpio*) ön böbrek damarlarında bağdokusu ipliklerini göstermişlerdir. Ön böbrek dokusunda elastik iplik varlığı araştırıldı. Deniz levreği ve sudakta elastik ipliklerin kapsülde, trabekül benzeri



Şekil 7. Sudak ön böbrek dokusunda PAS reaksiyonu veren hücrelerin görünümü. PAS boyama metodu. A. PAS reaksiyonu veren hücreler (oklar), B. PAS pozitif reaksiyon veren retikulum hücrelerinin yakın görünümü (oklar).

Figure 7. Appearance of PAS positive cells in head kidney of zander. PAS staining. A. PAS positive cells (arrows), B. Enlarged image of PAS positive reticular cells (arrows).



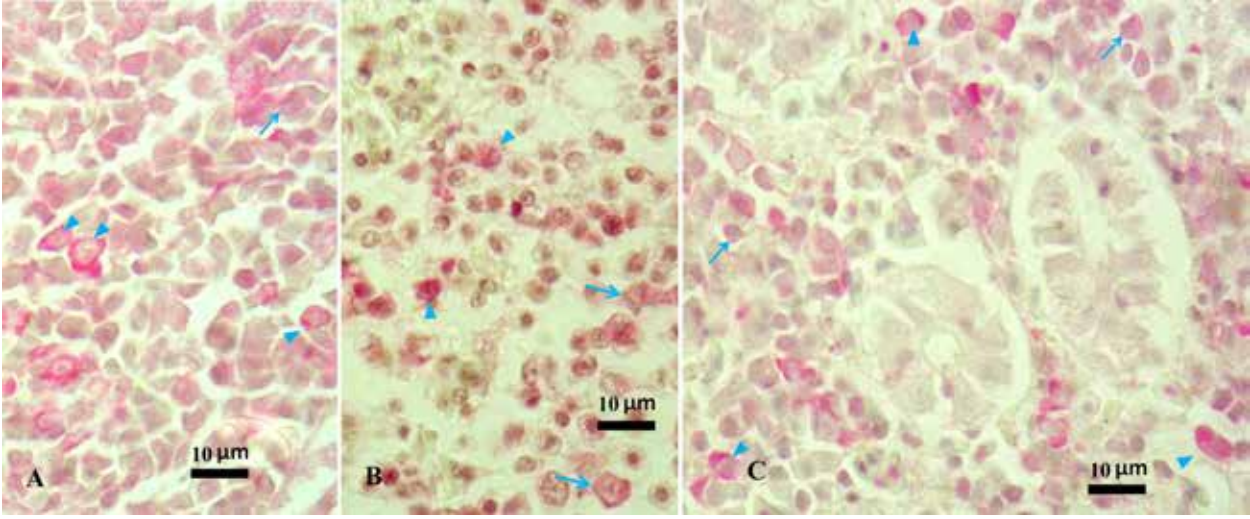
Şekil 8. Ot sazanı ön böbrek dokusunda PAS reaksiyonu veren hücrelerin görünümü. PAS boyama metodu. A. PAS reaksiyonu veren miyeloid seri hücreleri (oklar) makrofajlar (ok başları), g: Glomerulus, B. Melanomakrofaj merkezinde kuvvetli PAS pozitif reaksiyon veren makrofajlar (ok başı), mm: Melanomakrofaj merkezi, PAS pozitif miyeloid hücreler (oklar), g. Glomerulus. C. Miyeloid seri hücrelerinin büyütülmüş görüntüsü (oklar).

Figure 8. Appearance of PAS positive cells in head kidney of grass carp. PAS staining. A. PAS positive myeloid cells (arrows) and macrophages (arrow heads), g: Glomerulus, B. Intens PAS positive reaction of melano-macrophage center (arrow head), mm: Melano-macrophage center, PAS positive myeloid cells (arrows), g: Glomerulus. C. Enlarged image of Myeloid serial cells (arrows).

bölmelerde, doku içerisinde, melanomakrofaj merkezlerinin etrafında bulunduğu görüldü. Ot sazanında ise elastik ipliklerin damarların etrafında daha belirgin olarak yer aldığı dikkati çekti. Ön böbrek dokusunda elastik ipliklerle ilgili bulgu veren bir kaynağa rastlanmadı.

Sunulan çalışmada deniz levreği, sudak ve ot sazanı ön böbrek dokularında PAS pozitif hücreler tespit edildi. Deniz levreğinde

miyeloid hücreler, mast hücreleri ve makrofajların PAS pozitif reaksiyon verdikleri görüldü. Barber ve Westermann (1978) 30 farklı tür tatlı ve tuzlu su balığı kan hücrelerinden heterofil granulositlerde PAS pozitivitesi tespit etmişlerdir. Tavares-Dias (2006) farklı tür tatlı su balıklarında yaptığı çalışmada trombosit, nötrofil ve eozinofillerde PAS pozitivitesinden, glikojen içeriğinin varlığından bahsetmektedir. Noya ve Lamas



Şekil 9. Levrek (A), sudak (B) ve ot sazani ön böbrek dokusunda plazmablastlar (oklar) ve plazma hücreleri (ok başları). Methyl green pyronin boyama metodu.

(1996) *Gilthead seabream* solungaç bağ dokusunda PAS pozitif granular hücrelerin memelilerdeki mast hücrelerinin benzeri olduğunu belirtmişlerdir.

Melanomakrofaj merkezlerindeki makrofajlardaki pigmentasyon sarı, kahverengi ve siyah olarak gözlemlendi. Çoğunlukla melanin içerikli hücre birikimleri Yoffey (1929) tarafından "pigment nodülleri", Roberts (1975) tarafından ise "melanomakrofaj merkezleri" olarak isimlendirilmişlerdir. Balıklarda melanomakrofaj merkezlerindeki makrofajlarda melanin, lipofuksin ve hemosiderin bulunmaktadır (Micale ve Perdichizzi, 1990; Agius ve Roberts, 2003). Lipofuksin yaşlanmış, hasar görmüş organellerden kaynaklanır ve lipidlerin peroksidasyonu sonucu oluşur. Lipid peroksidasyonu ve hemoglobinin parçalanması sırasında serbest radikaller ve katyonlar açığa çıkar. Serbest radikallerin ve katyonların etkisi melanin sayesinde azaltılır (Agius ve Agbede, 1984; Zuasti ve ark., 1989). Kurtovic ve ark., (2008) çiftlikte beslenen ve doğal ortamında yaşayan deniz levreği dalak ve böbrek dokularını inceledikleri çalışmalarında, çiftlikte yetiştirilen deniz levreğinde her iki organda da melanomakrofaj merkezlerinin daha fazla sayıda olduğunu kaydetmişlerdir. Sunulan çalışmada melanomakrofaj merkezinde bulunan makrofajlarda da PAS pozitifitesi gözlemlendi. Makrofajlar, içerdikleri lipofuksin pigmentinden dolayı PAS pozitifitesi göstermektedirler (Roberts, 1975; Culling ve ark., 1985).

Sudakta, melanin içeriğinin fazla olmasına bağlı olarak daha az sayıda makrofajın PAS reaksiyon verdiği gözlemlendi. Farklı olarak sudakta ayrıca retikulum hücrelerinin PAS pozitif reaksiyon verdikleri tespit edildi. Bu hücrelerin de fagositoz yapabilen retikulum hücreleri olabileceği düşünüldü. Dolayısıyla PAS pozitifitesi fagositozla artan lipid peroksidasyonuna, dolayısıyla lipofuksine bağlı olabilir (Agius ve Agbede, 1984; Zuasti ve ark., 1989).

Ot sazani böbreğinde ise miyoloid seri hücrelerin ve melanin miktarı yok denecek kadar az olan makrofajların kuvvetli PAS reaksiyonu verdikleri görüldü. Pozitivite myeloid seri hücrelerde glikojen içeriğinden (Tavares-Dias, 2006), makrofajlarda ise lipofuksin içeriğinden kaynaklanmaktadır (Roberts, 1975; Culling ve ark., 1985).

Ön böbrek dokusunda plazma hücrelerinin varlığı da araştırıldı. Plazma hücreleri gelişim aşamaları ve fonksiyon süreleri açısından tiplendirilmektedir. Bunlardan ilki, az miktarda antikor üreten ve B hücre reseptörünü az miktarda ekspres eden genç hücreler olan plazmablastlardır. Bunun yanında, fazla miktarda antikor yapan, B hücre reseptörü bulundurmayan, kısa ve uzun ömürlü tipleri olan plazma hücreleri bulunmaktadır (Bromage

Figure 9. Appearance of plasmablasts (arrows) and plasma cells (arrow heads) in head kidney of sea bass (A), zander (B) and grass carp (C). Methyl green Pyronin staining method.

ve ark., 2004; Huttenhuis ve ark., 2005; Zwollo ve ark., 2005; Oracki ve ark., 2010; Zwollo ve ark., 2010). Deniz levreği ön böbreğinde plazma hücrelerinin varlığı bildirilmiştir (Meseguer ve ark., 1991). Tatlı su balıklarından Gökkuşluğu alabalığında antikor salgılayan hücrelerin plazmablast, kısa ve uzun ömürlü plazma hücre popülasyonları bildirilmiştir (Bromage ve ark., 2004; Zwollo ve ark., 2005). Press ve ark., (1994) Atlantik solmon balığında tek tek ya da küçük gruplar halinde immunglobulin pozitif hücreleri tespit etmişlerdir. Çalışmada deniz levreği, sudak ve ot sazani ön böbrek dokusunda pironin pozitif hücreler fenotiplerine bakılarak plazmablast ve plazma hücreleri olarak ayırt edildi. Sudak ve ot sazani ön böbrekte plazma hücrelerini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada, yaşam ortamı ve yeme alışkanlığı farklı olan üç balıkta ön böbrek dokusunun histolojik ve histokimyasal özellikleri karşılaştırmalı olarak incelendi. Araştırma sonunda, karnivor balıkların böbrek dokusunun herbivor olan türe göre daha gelişmiş olduğu gözlemlendi. Yapılan çalışmada elde edilen bulgular, materyal olarak kullanılan balıkların buldukları konvansiyonel koşulları yansıtan bulgulardır. Sunulan çalışmada elde edilen bulgular, besleme ve immunitiyi hedefleyen çalışmalarının tamamında temel bilgi olarak kullanılabilir.

Teşekkür

Sunulan çalışmayı (SAE-09014) destekleyen ADÜ/BAP Koordinasyon Birimine, materyal sağlamadaki yardımlarından dolayı Akdeniz Su Ürünleri Araştırma Üretim ve Eğitim Enstitüsü Müdürlüğü ile Latmos Su Ürünleri Şirketi yetkililerine teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Abbate F, Guerrera MC, Montalbano G, De Carlos F, Suárez AA, Ciriaco E, Germanà A (2012). Morphology of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) tongue. *Microscopy Research and Technique*, 75, 643-649.
- Abelli L, Gallo VP, Civinini A, Mastrolia L (1996). Immunohistochemical and ultrastructural evidence of adrenal chromaffin cell subtypes in sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.). *General and Comparative Endocrinology*, 102, 113-122.
- Agbon AO, Adeosun FI, Ikenweibe NB (2016). *Fish Ecology*. Alıntılanma adresi: http://www.unaab.edu.ng/attachments/463_FISH%20ECOLOGY.pdf
- Agius C, Agbede SA (1984). An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and hemosiderin in the

- haemopoietic tissues of fish. *Journal of Fish Biology*, 24, 471-488.
- Agius C, Roberts RJ (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, 26, 499-509.
- Barber LD, Westermann MJE (1978). Occurrence of the periodic acid-schiff positive granular leucocyte (PAS-GL) in some fishes and its significance. *Journal of Fish Biology*, 12, 35-43.
- Bromage ES, Kaattari IM, Zwollo P, Kaattari SL (2004). Plasmablast and plasma cell production and distribution in trout immune tissues. *The Journal of Immunology*, 173, 7317-7323.
- Crossman GA (1937). Modification of mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anatomical Record*, 6, 33-38.
- Cudmore B, Mandrak NE (2004). Biological synopsis of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Canadian manuscript report of fisheries and aquatic sciences, 2705, v+, 44p
- Culling CFA, Alliston RT, Barr WT (1985). Cellular pathology technique. Butterworths London, UK, 164-179.
- Demir N (1992). Ekoloji. In: İhtiyoloji. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul.
- Demirsoy A (1998). Yaşamın temel kuralları: Omurgalılar. Meteksan, Ankara.
- Dos Santos NM, Romano N, de Sousa M, Ellis AE, Rombout JH (2000). Ontogeny of B and T cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 10, 583-596.
- Ekingen G (2001). Balık anatomisi. Mersin Üniversitesi.
- Esteban MA, Meseguer J, Ayala AG, Agulleiro B (1989). Erythropoiesis and thrombopoiesis in the head-kidney of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): an ultrastructural study. *Archives of Histology and Cytology*, 52, 407-419.
- Fänge R (1986). Lymphoid organs in sturgeons (*Acipenseridae*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 12, 153-161.
- Harvell CD, Mitchell CE, Ward JR, Altizer S, Dobson AP, Ostfeld RS, Samuel MD (2002). Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science*, 296, 2158-2162.
- Helfman G, Collette BB, Facey DE, Bowen BW (2009). *The Science of Ichthyology*. In: *The Diversity of Fishes: Biology, Evolution, and Ecology*. 2nd Ed. Wiley-Blackwell, Pp 3-9
- Huttenhuis HB, Huising MO, van der Meulen T, van Oosterhoud CN, Sánchez NA, Tavernier-Thiele AJ, Rombout JH (2005). Rag expression identifies B and T cell lymphopoietic tissues during the development of common carp (*Cyprinus carpio*). *Developmental & Comparative Immunology*, 29, 1033-1047.
- Imagawa T, Kitagawa H, Uehara M (1994). Ultrastructure of blood vessels in the head kidney of the carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of Anatomy*, 185, 521-528.
- Kaattari SL, Irwin MJ (1985). Salmonid spleen and anterior kidney harbor populations of lymphocytes with different B cell repertoires. *Developmental and Comparative Immunology*, 9, 433-444.
- Kondera E (2011). Haematopoiesis in the head kidney of common carp (*Cyprinus carpio* L.): a morphological study. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37, 355-362.
- Kondera E, Dmowska A, Rosa M, Witeska M (2012). The effect of bleeding on peripheral blood and head kidney hematopoietic tissue in common carp (*Cyprinus carpio*). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 36, 169-175.
- Kurtović B, Teskeredžić E, Teskeredžić Z (2008). Histological comparison of spleen and kidney tissue from farmed and wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Acta Adriatica*, 49, 147-154.
- Lozupone CA, Knight R (2007). Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 11436-11440.
- Meseguer J, Esteban MA, Agulleiro B (1991). Stromal cells, macrophages and lymphoid cells in the head-kidney of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). An ultrastructural study. *Archives of Histology and Cytology*, 54, 299-309.
- Meseguer J, Esteban MA, Ayala AG, Ruiz AL, Agulleiro B (1990). Granulopoiesis in the head-kidney of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): an ultrastructural study. *Archives of Histology and Cytology*, 53, 287-296.
- Meseguer J, Lopez-Ruiz A, Esteban MA (1994). Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. *Cell and Tissue Research*, 277, 1-10.
- Meseguer J, López-Ruiz A, Ayala AG (1995). Reticulo-endothelial stroma of the head-kidney from the seawater teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): An ultrastructural and cytochemical study. *The Anatomical Record*, 241, 303-309.
- Micale V, Perdichizzi F (1990). A quantitative and histochemical study on melano-macrophage centres in the spleen of the teleost fish *Diplodus annularis* L. *Journal of Fish Biology*, 37, 191-197.
- Morovvati H, Alboghobeish N, Noori A, Rasekh A (2006). Seasonal changes of pronephros lymphoid tissue in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): a histometrical and histological study. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 7, 42-49.
- Nakanishi T, Shibasaki Y, Matsuura Y (2015). T Cells in fish. *Biology*, 4, 640-663.
- Near TJ, Eytan RI, Dornburg A, Kuhn KL, Moore JA, Davis MP, Smith WL (2012). Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 13698-13703.
- Noya M, Lamas J (1996). Morphology and histochemistry of a PAS-positive granular cell in the gills of the gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *Journal of Anatomy*, 189, 439.
- Oracki SA, Walker JA, Hibbs ML, Corcoran LM, Tarlinton DM (2010). Plasma cell development and survival. *Immunological Reviews*, 237, 140-159.
- Ortuño J, Esteban M, Meseguer J (2002). Effects of four anaesthetics on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) *Fish & Shellfish Immunology*, 12, 49-59.
- Özyurt CE, Mavruk S, Kayağaç VB (2012). Effects of predator size and gonad maturation on food preference and feeding intensity of Sander *luciperca* (Linnaeus, 1758). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12, 315-322.
- Padrós F, Crespo S (1996). Ontogeny of the lymphoid organs in the turbot *Scophthalmus maximus*: a light and electron microscope study. *Aquaculture*, 144, 1-16.
- Press CM, Dannevig BH, Landsverk T (1994). Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 4, 79-93.
- Ringø E, Sperstad S, Myklebust R, Mayhew TM, Olsen RE (2006a). The effect of dietary inulin on aerobic bacteria associated with hindgut of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture Research*, 37, 891-897.
- Roberts RJ (1975). Melanin-containing cells of teleost fish and their relation to disease. *The Pathology of Fishes*, 399, 399-428.
- Romano N, Ceccariglia S, Mastrolia L, Mazzini M (2002). Cytology of lymphomyeloid head kidney of Antarctic fishes *Trematomus bernacchii* (Nototheniidae) and *Chionodraco hamatus* (Channichthyidae). *Tissue and Cell*, 34, 63-72.
- Scapigliati G, Mazzini M, Mastrolia L, Romano N, Abelli L (1995). Production and characterisation of a monoclonal antibody against the thymocytes of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) (Teleostea, Percichthyidae). *Fish & Shellfish Immunology*, 5, 393-405.
- Schulenburg H, Kurtz J, Moret Y, Siva-Jothy MT (2009). Introduction. *Ecological immunology*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 3-14.
- Segner H, Möller AM, Wenger M, Casanova-Nakayama A (2012). Fish immunotoxicology: research at the crossroads of immunology, ecology and toxicology. *Interdisciplinary Studies on environmental chemistry-environmental pollution and ecotoxicology*, Eds., M. Kawaguchi, K. Misaki, H. Sato, T. Yokokawa, T. Itai, T. M. Nguyen, J. Ono and S. Tanabe, TERRAPUB, Pp. 1-12.
- Sullam KE, Essinger SD, Lozupone CA, O'Connor MP, Rosen GL, Knight ROB, Russell JA (2012). Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Molecular Ecology*, 21, 3363-3378.
- Tavares-Dias M (2006). A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*, 68, 1822-1833.

- Tort L, Balasch JC, Mackenzie S (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Immunología*, 22, 277-286.
- Voff JN (2005). Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity*, 94, 280-294.
- Willett CE, Cortes A, Zuasti A, Zapata AG (1999). Early hematopoiesis and developing lymphoid organs in the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 214, 323-336.
- Wurst WA (1998). Why can some fish live in freshwater, some in salt water, and some in both? *World Aquaculture*, 29, 65.
- Yoffey JM (1929). A contribution to the study of the comparative histology and physiology of the Spleen, with reference chiefly to its cellular constituents: I. In *Fishes*. *Journal of Anatomy*, 63, 314.
- Zapata A, Diez B, Cejalvo T, Gutierrez-de Frias C, Cortes A (2006). Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20, 126-136.
- Zapata A, Chibà A, Varas A (1996). Cells and tissues of the immune system of fish. In: Iwama Q, Nakanishi T (eds) *The fish immune system: organism, pathogen and environment*. Academic Press, San Diego, Pp. 1-62
- Zimmer C (2000). In search of vertebrate origins: beyond brain and bone. *Science*, 287, 1576-1579.
- Zuasti A, Jara JR, Ferrer C, Solano F (1989). Occurrence of melanin granules and melanosynthesis in the kidney of *Sparus auratus*. *Pigment Cell Research*, 2, 93-99.
- Zwollo P, Cole S, Bromage E, Kaattari S (2005). B cell heterogeneity in the teleost kidney: evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney. *The Journal of Immunology*, 174, 6608-6616.
- Zwollo P, Mott K, Barr M (2010). Comparative analyses of B cell populations in trout kidney and mouse bone marrow: establishing "B cell signatures". *Developmental & Comparative Immunology*, 34, 1291-1299.