



## Beslenme tipi ve yaşam ortamı farklı olan balıklarda immün sistem organları: II. Dalak üzerinde histolojik çalışmalar

Ülker Eren<sup>1\*</sup> Müge Bozkurt<sup>2</sup>

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

\*Corresponding author: ueren@adu.edu.tr

### ÖZET

**Öz bilgi / Amaç:** Yaşam ortamı ve yeme alışkanlığı farklı olan üç balıkta, dalak dokusunun histolojik ve histokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması 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. Balıklardan alınan dalak örnekleri % 10'luk tamponlu nötral formalin (NBF) ve Bouin tespit solusyonunda tespit edildi. Doku kesitlerine üçlü boyama yöntemi, Gordon ve Sweet'in gümüşleme metodu, Verhoeff'in elastik iplik boyama metodu, PAS reaksiyonu ve methyl green pyronin boyama yöntemleri uygulandı.

**Bulgular ve Sonuç:** Deniz levreğinde dalağın histolojik organizasyonunun diğer balıklara göre daha düzenli olduğu, beyaz pulpa alanlarının daha belirgin olduğu görüldü. Sudak dalağında pulpanın daha karmaşık yapıda olduğu gözlemlendi. Ot sazanı dalağında diğerlerinden farklı olarak, eritroid alanlar tespit edildi. Damarlarda eritrosit rezervuarı dikkati çekti. Hem deniz levreği hem de sudakta elipsoid ve elipsoid çevresi lenfoid doku ayırt edildi. Ot sazanında ise dalak dokusunda elipsoidler ayırt edildi fakat elipsoid çevresi lenfoid doku gözlenmedi. Melanomakrofaj merkezlerinin levrekte daha düzenli, sınırlandırılmış şekilde olduğu ve hücrelerde melanin içeriğinin fazla olduğu dikkati çekti. Ot sazanında makrofajlardaki melanin miktarının, diğer balıklara göre az olduğu görüldü. Her üç balıkta da makrofajlar, levrekte ise ilaveten mast hücreleri de PAS pozitif reaksiyon gösterdiler. Parenşimde pirinofilik plazmoblast ve plazma hücreleri tespit edildi. Bu hücrelerin özellikle melanomakrofaj merkezlerinin çevresinde ve elipsoidlerin etrafında yoğunlaştıkları dikkati çekti. Araştırma sonunda, karnivor bir balık olan deniz levreğinin dalağının, savunma mekanizması açısından diğer balıklara göre daha organize yapıda olduğu belirlendi.

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

## The immune system organs in fishes with different feeding behavior and habitats: II. Histological studies on spleen

### ABSTRACT

**Background/ Aim:** The aim of this study was to investigate histological and histochemical differences of the head kidney and the splenic 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. Splenic tissue samples of fishes 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 Discussion:** It was observed that the histological organization spleen was more organized and the white pulp areas of spleen were more pronounced in sea bass, differently from the others. The splenic pulp structure was more confusing in zander. In the grass carp, the splenic tissue has erytroid areas and the filled wessels with erythrocyte. Ellipsoid and periellipsoid lymphoid tissue were also distinguished in spleen of sea bass and zander. Whereas, the splenic tissue ellipsoids were observed, but peri ellipsoid lymphoid tissues were absent in grass carp spleen. It was noted that the centers of melanomacrophages were more regular, restricted, and the content of melanin in the cells was greater in spleen of sea bass. However, the amount of melanin in melanomacrophage center was less in grass carp as compared to others. The macrophages had PAS positive reaction in three fish's splenic tissue, and in addition the mast cells were give PAS positive reaction in sea bass. In all three fish, pyroninophilic plasmoblasts and plasma cells were observed in splenic tissue. Particularly, these cells were accumulated around the melanomacrophage centers and ellipsoids. Research results showed that the sea bass which carnivorous fish have more advanced defense mechanism in spleen than the others.

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

## Giriş

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). Humoral ve hücrel immun yanıtta timus, ön böbrek, dalak, sindirim sistemi ilişkili lenfoid doku ve hücrel elemanlar rol alırlar (Zapata ve ark., 1996; Scapigliati ve ark., 2002). Tatlı su teleostlarında en son dalak lenfoid özellik kazanır. Tuzlu su teleostlarında ise yine ilk hematopoetik prekürsörler böbrekte görülür fakat daha sonra dalak gelişir (Padros ve Crespo, 1996). Balıkların savunma sistemi yüksek omurgalılarıdakine aksine daha çok non-spesifik immuniteye dayanmaktadır. Bunun balıklar için bazı avantajları vardır; patojenle daha önceden karşılaşmış olması gerekmez, hastalık etkenine anında cevap verilebilir. Spesifik sistemin aktive olması non-spesifik sistemin aktive olmasına bağlıdır ve spesifik sistem su sıcaklığı düştükçe daha yavaş çalışır ancak non-spesifik sistemin çalışması su sıcaklığına bağlı değildir (Watts ve ark., 2001). Balıklarda patojenler solungaçlar, deri ve sindirim sisteminde fiziksel engellerden olan mukus, pullar ve epitelyum ile tutulurlar. Mukusta patojenleri elimine eden humoral faktörler bulunur. Gerekliğinde de spesifik immün mekanizma uyarılır, hücrel ve humoral yanıt verilir (Ellis, 2001; Castro ve Tafalla, 2015). Bu araştırmada; tuzlu suda ve tatlı suda yaşayan karnivor balıklar ile tatlı suda yaşayan herbivor balıkta dalağın incelenerek, beslenme ve yaşam ortamı farklılığının, histolojik ve histokimyasal farklılık oluşturup oluşturmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Araştırmada karnivor balıklara örnek olarak tuzlu su balığı *Dicentrarchus labrax* L.,1758 (deniz levreği) (Abbate ve ark., 2012) ve tatlı su balığı *Sander lucioperca* L.,1758 (sudak) (Özyurt ve ark., 2012), herbivor balık örneği olarak da *Ctenopharyngodon idella* Val., 1844 (ot sazani) (Cudmore ve Mandrak, 2004) belirlendi.

Araştırmada, erişkin ve sağlıklı olan, 15 adet deniz levreği, 10 adet sudak ve 6 adet ot sazani materyal olarak kullanıldı. Deniz levreği, Latmos Su Ürünleri (Didim/AYDIN); sudak, Seyhan Baraj Gölü (ADANA); ot sazani ise Akdeniz Su Ürünleri Araştırma Üretme ve Eğitim Enstitüsü (Kepez Mevkii/ANTALYA)'nden sağlandı. 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 dalak örnekleri alındı. Araştırmanın ilk aşamasında, aynı balıkların ön böbrek dokuları incelendi. Alınan doku örnekleri parafin kesitler için % 10'luk tamponlu nötral formalin (Neutral Buffered Formalin, NBF) ve Bouin tespit solusyonuna alındılar. 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.

## Bulgular

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

İncelenen üç balıkta da dalak kapsülünün oldukça ince olduğu gözlemlendi. Beyaz pulpa, kırmızı pulpa ve stroma ayırt edildi. Beyaz pulpa ve kırmızı pulpa kısımlarının mikroskopik görünümünün memeli dalağına göre oldukça karmaşık olduğu gözlemlendi. Pulpa arteri, arteriyol, penisillar kapillar ve venöz sinuslar ayırt edildi. Deniz levreğinde beyaz pulpanın, pulpa arterinin etrafında, arteriyollerin ve kapillarların çevresinde yer aldığı gözlemlendi. Arteriyel dallanmanın diğerlerine göre levrekte daha belirgin olduğu ve periarteriyoler lenfoid dokunun daha yoğun bulunduğu dikkati çekti (Şekil 1). Kırmızı pulpanın daha fazla alan kapladığı ve kırmızı pulpada retikulum hücrelerinin yoğun olduğu görüldü (Şekil 1A, B). Penisillar kapillarların çevresinde, elipsoid çevresi lenfoid dokunun bulunduğu dikkati çekti (Şekil 1C). Melanomakrofaj merkezlerinin genellikle damarlara yakın olarak yerleştiği izlendi (Şekil 1C). Bazı kesitlerde de ana arter ve vena gözlemlendi.

Sudakta (Şekil 2) kırmızı-beyaz pulpa alanlarının daha karışık olduğu, retikulum hücrelerinin daha az fark edildiği, damar çevresinde bağdokusunun belirgin olduğu görüldü. Melanomakrofaj merkezlerinin sudak dalağında daha seyrek ve melanin miktarının az olup, lipofuksin içeriğinin fazla olduğu dikkati çekti (Şekil 2B). Sudakta da deniz levreğinde olduğu gibi, elipsoid çevresi lenfoid doku ayırd edildi (Şekil 2C).

Ot sazani dalağında diğer türlere göre kırmızı pulpanın daha belirgin olduğu görüldü (Şekil 3A). Damarların eritrositlerle dolu olduğu, parenşimde eritroid alanların bulunduğu gözlemlendi (Şekil 3B). Beyaz pulpanın, lenfoid doku odakları halinde farklı noktalarda bulunduğu dikkati çekti (Şekil 3A, B). Penisillar kapillar çevresinde elipsoid ilişkili hücrelerin bulunmasına rağmen, elipsoid çevresi lenfoid doku görülmedi (Şekil 3A). Az sayıda olan melanomakrofaj merkezlerinin çok farklı büyüklüklerde olduğu, hücrelerin melanin miktarının çok az olduğu, lipofuksin içerdikleri gözlemlendi (Şekil 3B, C). Makrofaj benzeri hücrelerin tek tek veya birkaç adet hücre içeren gruplar halinde parenşime dağılmış olduğu tespit edildi (Şekil 3B). Stroma ve damarların etrafında bulunan bağ dokunun diğer balıklara göre daha az olduğu dikkati çekti.

Dalakta, retikulum iplikleri ile elastik ipliklerin kompozisyonu araştırıldı. Retikulum ipliklerinin her üç balıkta da kapsülde, bütün damarların duvarında, parenşimde bulunduğu görüldü (Şekil 4). Melanomakrofaj merkezlerini sınırlandıracak şekilde organize olduğu dikkati çekti (Şekil 4A).

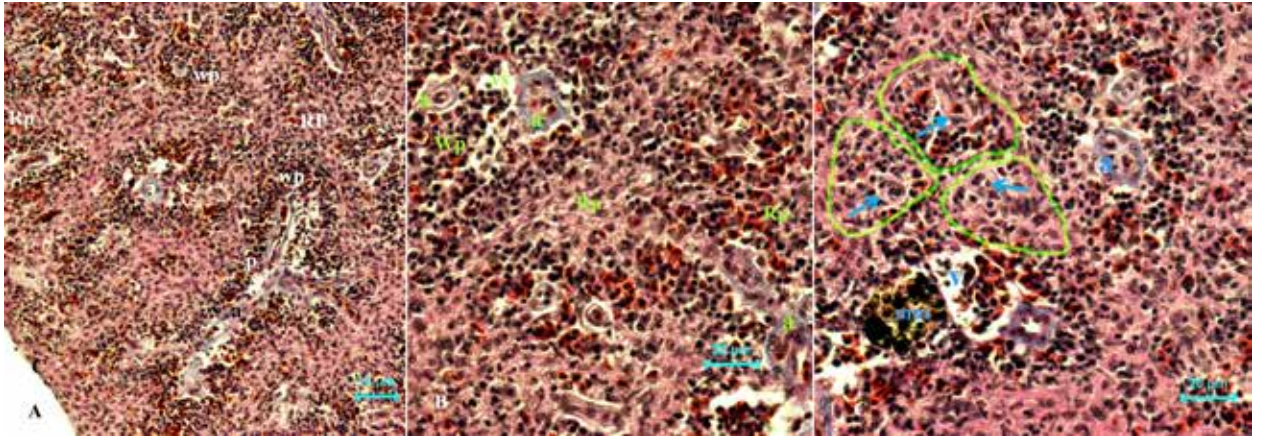
İncelenen dalak dokularında elastik ipliklerin ise kapsül ve damarların etrafında buldukları gözlemlendi (Şekil 5).

**Tablo 1.** Materyal olarak kullanılan balıkların boy ve ağırlık değerleri

**Table 1.** Length and weight values of fish used as material

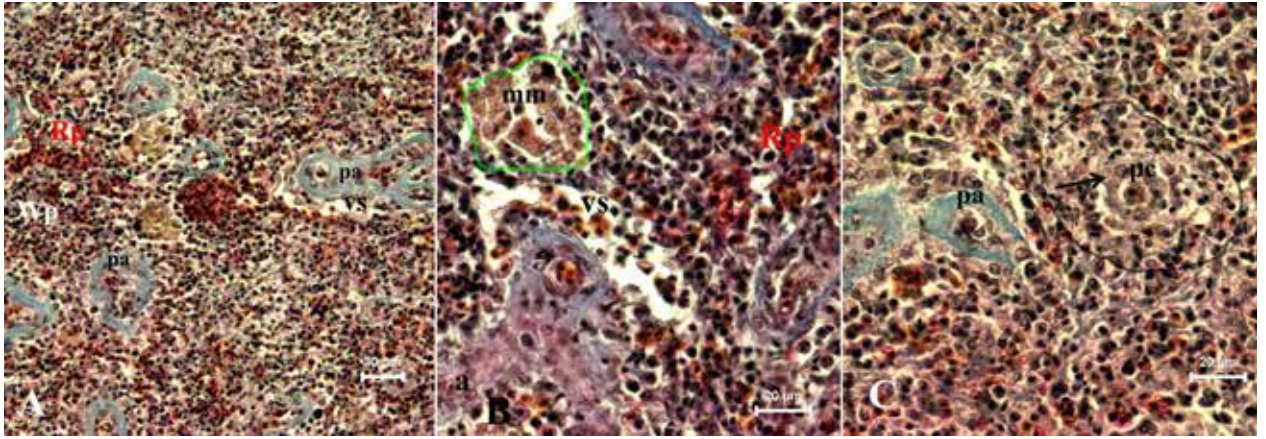
Materyal	Çatal boy	Total boy	Ağırlık
Deniz levreği	30 cm	32 cm	400 gram
Sudak	25 cm	26 cm	130 gram
Ot sazani	75 cm	80 cm	3500 gram





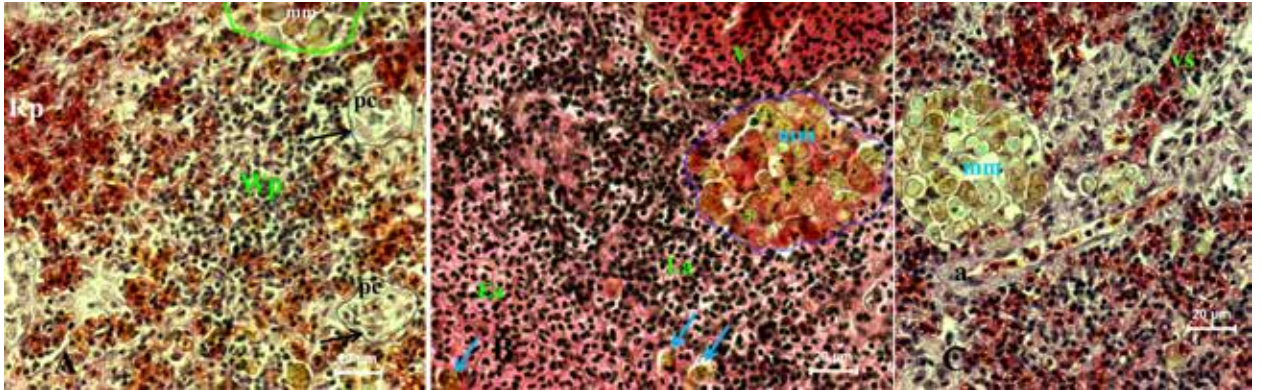
**Şekil 1.** Deniz levreği dalak dokusunun mikroskopik görünümü. Üçlü Boyama. A. Genel görünüm. c: Kapsül, Wp: Beyaz pulpa, Rp: Kırmızı pulpa alanları, a: Arter, P: Periarteriyoler lenfoid kılıf. B. Retikulum hücreleri ağırlıklı kırmızı pulpa alanları (Rp) ve beyaz pulpanın (Wp) görünümü. a: Arteriyol, vs: Venöz sinüs. C. Penisillar kapillarlar (oklar) ve elipsoid çevresi lenfoid dokunun görünümü (çizgi ile çevrelenmiş alanlar). a: Arteriyol, mm: Melanomakrofaj merkezi, v: Venöz sinüs.

**Figure 1.** Microscopical appearance of spleen of sea bass. Triple staining. A. General view of tissue. C: Capsule, Wp: White pulp, Rp: Red pulp area, a: Artery of pulp, P: Periarterial lymphoid sheet. B. The appearance of white pulp (Wp) and red pulp areas (Rp) which has more reticular cells. A: Arteriole, vs: Venous sinus. C. Penicillar capillaries (arrows) and peri-ellipsoid lymphoid tissue (restricted area with line). A: Arteriole, mm: Melano-macrophage center, v: Venous sinus.



**Şekil 2.** Sudak dalak dokusunun mikroskopik görünümü. Üçlü Boyama. A. Genel görünüm. Wp: Beyaz pulpa, Rp: Kırmızı pulpa, pa: Penisillar arteriyol, vs: Venöz sinüs. B. Melano makrofaj merkezinin görünümü (mm). Rp: Kırmızı pulpa, vs: Venöz sinüs. C. Elipsoid çevresi lenfoid dokunun görünümü. Pa: Penisillar arteriyol, pc: Penisillar kapilar, ok: Elipsoid ilişkili hücre.

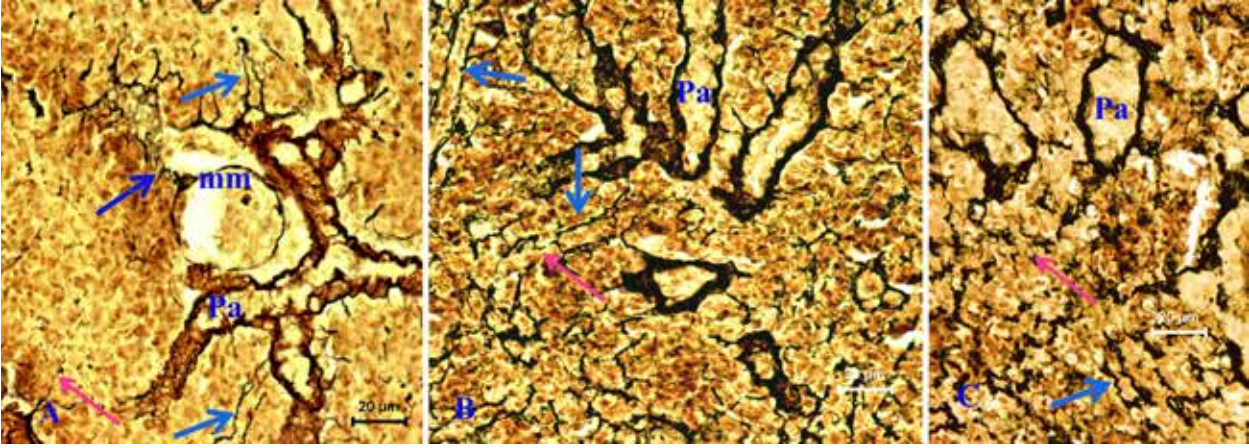
**Figure 2.** Microscopical appearance of spleen of zander. Triple staining. A. General view of tissue. Wp: White pulp, Rp: Red pulp, pa: Penicillar arteriole, vs: Venous sinus. B. Appearance of melano-macrophage center (mm). Rp: Red pulp, vs: Venous sinus. C. Peryellipsoidal lymphoid tissue. Pa: Penicillar arteriole, pc: Penicillar capillary, arrow: Ellipsoid associated cell.



**Şekil 3.** Ot sazani dalak dokusunun mikroskopik görünümü. Üçlü Boyama. A. Genel görünüm ve elipsoidlerin görünümü. Rp: Kırmızı pulpa, Wp: Beyaz pulpa, mm: Melanomakrofaj merkezi, pc: Penisillar kapilar, oklar: Elipsoid (çizgi ile sınırlandırılmış). B. Eritroid (Ea) ve Lenfoid alanların (La) görünümü. mm: Melano makrofaj merkezi (sınırlandırılmış), V: Damar, oklar: Makrofajlar. C. Kan damarlarına yakın olarak yerleşmiş melanomakrofaj merkezinin görünümü. mm: Melanomakrofaj merkezi, vs: Venöz sinüs, a: Arteriyol, ok: Penisillar kapilar.

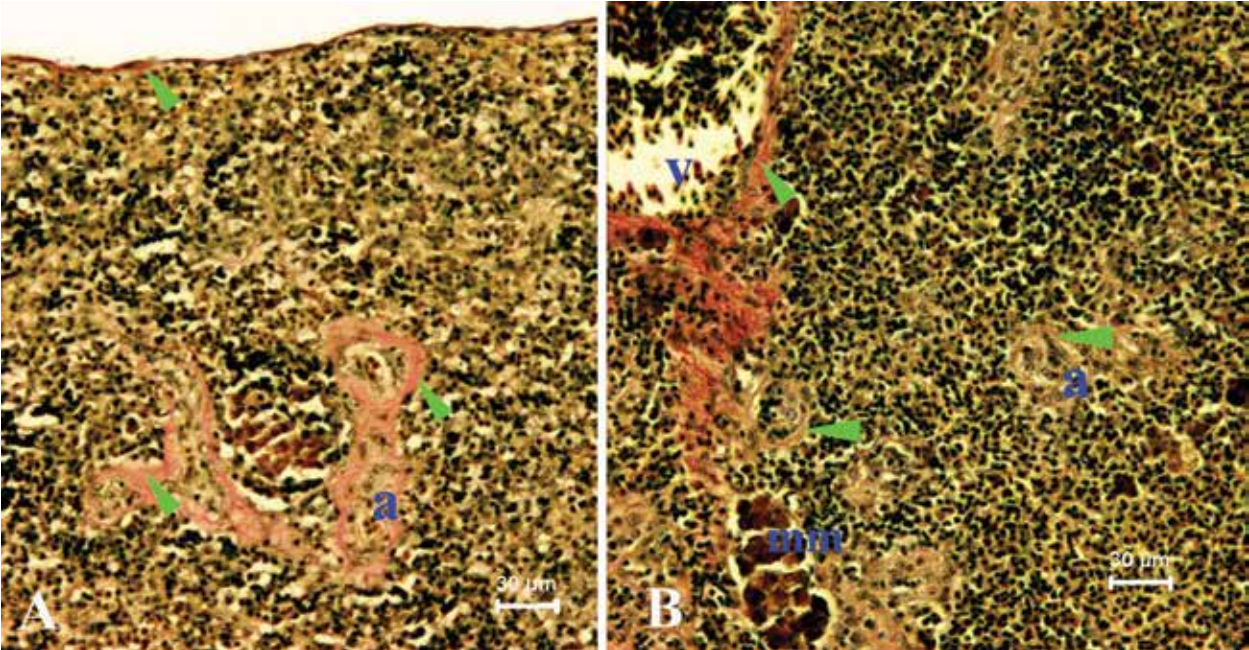
**Figure 3.** Microscopical appearance of spleen of grass carp. Triple staining. A. General view of tissue and ellipsoids. Rp: Red pulp, Wp: White pulp, mm: Melano-macrophage center, pc: Penicillar capillary, arrows: Ellipsoid (restricted with line). B. Erytroid area (Ea) and Lymphoid area (La). Mm: Melano-macrophage center (restricted with line), V: Vessel, arrows: Macrophages. C. Melano-macrophage center near vessels. Mm: Melano-macrophage center, vs: Venous sinus, a: Arteriole, arrow: Penicillary capillary.





**Şekil 4.** Dalak dokusunda retikulum ipliklerinin görünümü. Gordon ve Sweet'in gümüşleme metodu. A. Deniz levreği dalağında retikulum ipliklerinin organizasyonu. Pa: Penisillar arter çevresi, mm: Melanomakrofaj merkezinin çevresi, mavi oklar: Penisillar kapillarların çevresi, pembe ok: Parenşimde retikulum ipliği. B. Sudak dalağında retikulum ipliklerinin görünümü. Pa: Penisillar arter, mavi oklar: Penisillar kapillarlar, pembe ok: Parenşimde retikulum ipliği. C. Ot sazani dalağında retikulum ipliklerinin görünümü. Pa. Penisillar arter, mavi ok: Penisillar kapillar, pembe ok: Parenşimde retikulum ipliği.

**Figure 4.** Appearance of reticular fibers. Gordon and Sweet's silver staining. A. Reticular formation in spleen of sea bass. Pa: Around of penicillar artery, mm: Around of melano-macrophage center, blue arrows: Around of penicillar capillary, Pink arrow: Reticular fibers in paranchyma. B. Reticular fibers in spleen of zander. Pa: Penicillary artery, blue arrows: Penicillar capillary, pink arrow: Reticular fibers in paranchyma. C. Reticular fibers in spleen of grass carp. Pa: Penicillary artery, blue arrow: Penicillar capillary, pink arrow: Reticular fibers in paranchyma.



**Şekil 5.** Dalak dokusunda elastik ipliklerin görünümü. Verhoeff'un elastik iplik boyama metodu. A. Sudak balığı dalağında elastik ipliklerin görünümü. Ok başları: Kapsül ve damar çevresinde elastik iplikler, a: Arteriyol. B. Ot sazani balığının dalak kesitinde elastik ipliklerin görünümü. v: Vena, a: Arteriyol, mm: Melanomakrofaj merkezi, Ok başları: Elastik iplikler.

**Figure 5.** Elastic fibers in splenic tissue. Verhoeff's method for elastic fibers. A. Elastic fibers in zander spleen. Arrowheads: Elastic fibers in capsule and around wessels, a: Arteriole. B. Elastic fibers in grass carp spleen. V: Vein, a: Arteriole, mm: Melanomacrophage center, Arrowheads: elastic fibers.

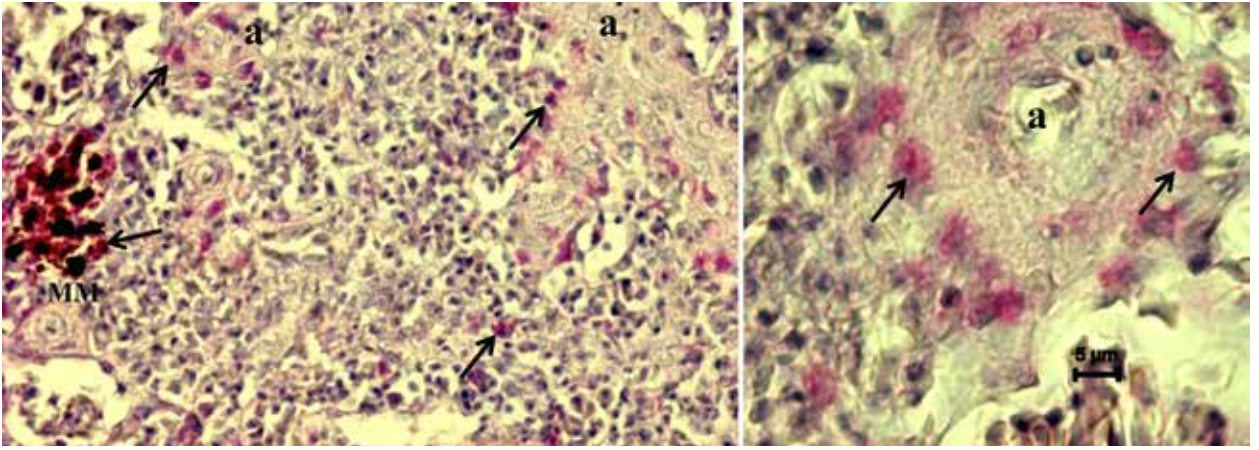
Deniz levreği (Şekil 6A, B), sudak (Şekil 7A) ve ot sazani (Şekil 7B) dalak dokularında PAS pozitif hücreler incelendi. Deniz levreğinde pozitifite gösteren hücrelerin melanomakrofaj merkezlerinde, lenfoid dokuda ve damarların etrafında yerleştikleri görüldü (Şekil 6). Bunların makrofajlar veya mast hücreleri olabileceği düşünüldü. Sudakta ve ot sazani ise damarların etrafında PAS pozitif hücreler görülmedi. Melanomakrofaj merkezlerinde bulunan makrofajların PAS reaksiyonu verdikleri belirlendi. Parenşimde de tek tük PAS reaksiyonu veren hücreler gözlemlendi (Şekil 7). Deniz levreği (Şekil 8A), sudak (Şekil 8B) ve ot sazani (Şekil

8C) dalakta, plazmablast ve plazma hücreleri pironinofilik özellikleriyle tespit edildi. Özellikle melanomakrofaj merkezlerinin çevresinde (Şekil 8A, C) ve elipsoid çevresinde (Şekil 8B) yoğunlaştıkları dikkati çekti.

### Tartışma ve Sonuç

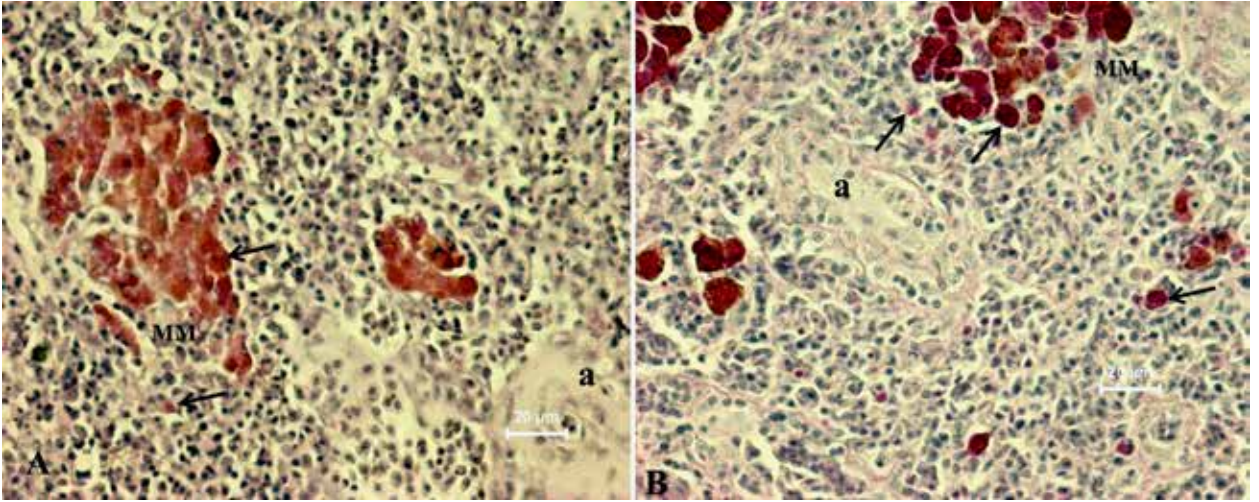
Dalak dokusu kesitlerinde damarların seyri, stroma ve parenşim özellikleri mikroskopik olarak incelendi. Pulpa arteri, arteriyol, penisillar kapillar ve venöz sinuslar ayırt edildi. Dalakta genelde venöz sinusların arteriyollere komşu olduğu izlendi. Beyaz pulpanın deniz levreğinde pulpa arterinin etrafında,





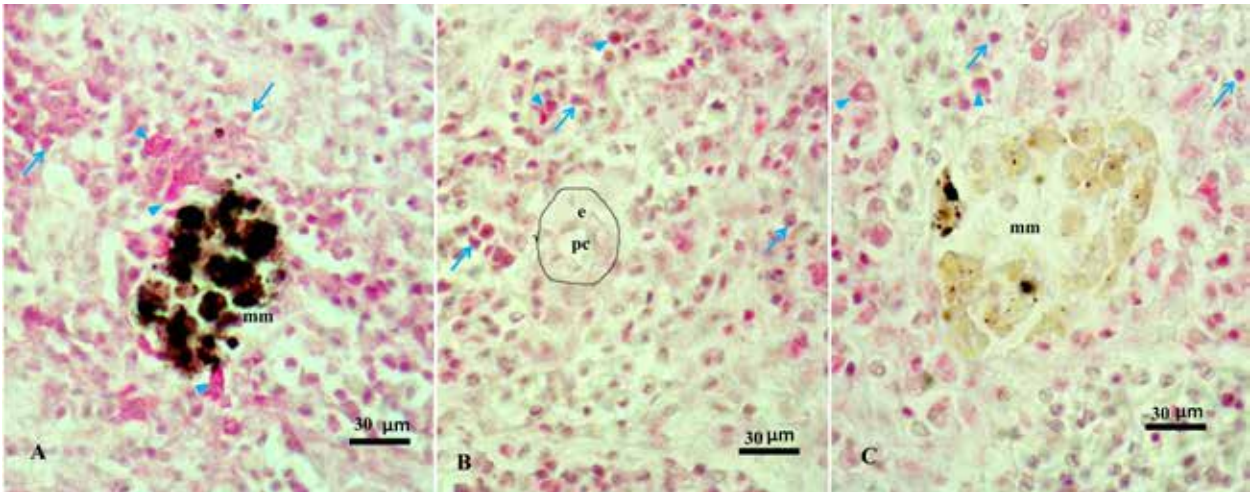
**Şekil 6.** A. Deniz levreğinde dalak dokusunda PAS reaksiyonu veren hücrelerin görünümü. MM: Melanomakrofaj merkezi, oklar: PAS pozitif reaksiyon veren hücreler, a: Arter. B. Damar çevresinde PAS reaksiyonu veren hücreler (oklar), a: Arter. PAS boyama metodu.

**Figure 6.** A. PAS positive cells in splenic tissue of sea bass. MM: Melano-macrophage center, arrows: PAS positive cells, a: Artery. B. PAS positive cells around of vessels (arrows), a: Artery. PAS staining method.



**Şekil 7.** Sudak (A) ve ot sazani dalağında (B) PAS reaksiyonu veren hücrelerin görünümü. MM: Melanomakrofaj merkezi, oklar: PAS pozitif reaksiyon veren hücreler, a: Arter. PAS reaksiyonu.

**Figure 7.** PAS positive cells in splenic tissue of zander (A) and grass carp (B). MM: Melano-macrophage center, arrows: PAS positive cells, a: Artery. PAS staining method.



**Şekil 8.** Dalakta plazmoblast ve plazma hücrelerinin görünümü. Methyl green pyronin boyama metodu. A. Deniz levreği dalak dokusunda melanomakrofaj çevresinde plazmoblastlar (oklar) ve plazma hücreleri (ok başları), mm: Melanomakrofaj merkezi. B. Sudak dalak dokusunda plazmoblastlar (oklar) ve plazma hücreleri (ok başları). Pc: Penisillar kapilar, e: Elipsoid. C. Ot sazani dalak dokusunda plazmoblastlar (oklar) ve plazma hücreleri (ok başları). mm: Melanomakrofaj merkezi.

**Figure 8.** Plasmablasts and plasma cells in splenic tissue. Methyl green pyronin staining method. A. Plasmablasts (arrows) and plasma cells (arrowheads) around melano-macrophage center in splenic tissue of sea bass, mm: Melano-macrophage center. B. Plasmablasts (arrows) and plasma cells (arrowheads) in splenic tissue of zander. Pc: Penicillar capillary, e: Ellipsoid. C. Plasmablasts (arrows) and plasma cells (arrowheads) in splenic tissue of grass carp. mm: Melano-macrophage center.

arteriyollerin ve penisillar kapılların çevresinde yer aldığı gözlemlendi. Deniz levreğinde, Quesada ve ark., (1990) beyaz pulpanın pulpa arterlerinin etrafında ve melanomakrofaj merkezlerinin etrafında manşet şeklinde yer aldığını, kapılların elipsoid ya da makrofaj halkası ile çevrelendiğini, lenfoid alanlarda lenfopoezis ve plazmopoezisin görüldüğünü belirtmişlerdir. Sunulan çalışmada araştırmacılar farklı olarak, melanomakrofaj merkezlerinin etrafında, manşet şeklinde beyaz pulpa izlenmedi. Ayrıca deniz levreğinde arteriyollerin etrafında diğer türlere göre daha belirgin miktarda lenfoid doku bulunduğu dikkati çekti. Kırmızı pulpanın beyaz pulpadan fazla alan kapladığı ve kırmızı pulpada retikulum hücrelerinin ağırlıkta olduğu görüldü. Söz konusu bulgu Quesada ve ark., (1990)'nin bulgularını destekler niteliktedir.

Sudakta kırmızı-beyaz pulpa alanlarının daha karışık olduğu, levreğe göre retikulum hücrelerinin daha az bulunduğu, damar yapısının belirgin olduğu görüldü. Melanomakrofaj merkezlerinin daha seyrek ve melanin miktarının da oldukça az olduğu dikkati çekti. Ot sazani dalağında farklı noktalarda lenfoid doku odakları gözlemlendi. Melanomakrofaj merkezlerinin çok farklı büyüklüklerde olduğu, melanin miktarının az olduğu görüldü. Stroma ve damarların etrafında bulunan bağ dokunun daha az olduğu dikkati çekti. Sudak ve ot sazani dalağını histolojik olarak tanımlayan herhangi bir kaynağa rastlanamamıştır.

Ot sazani dalağında diğer türlerden farklı olarak eritroid alanlar gözlemlendi. Kan damarlarının eritrositlerle dolu olduğu izlendi. Bu durum, ot sazani dalağının eritropoietik özellikte ve eritrosit rezervuarı olarak görev aldığını gösterir. Bazı balıklarda dalağın eritropoietik ve rezervuar fonksiyonları bildirilmiştir (Kita ve Itazawa, 1989; Van Muiswinkel ve ark., 1991)

Her üç balık dalağında da melanomakrofaj merkezlerinin damarlara yakın olarak yerleştiği gözlemlendi. Meseguer ve ark. (1994) da melanomakrofaj merkezlerinin damarlara yakın olarak yerleştiğini bildirmişlerdir. Melanomakrofaj merkezlerinin germinal merkezlerin evrimsel prekürsörü olduğu Vigliano ve ark., (2006) tarafından ileri sürülmüştür.

Espenes ve ark., (1995a) tatlı su balığı olan gökkuşağı alabalıklarında yaptıkları çalışmada elipsoidlerin bulunduğunu tanımlamışlar ve elipsoidin görevinin antijene karşı tuzak oluşturmak olduğunu göstermişlerdir (Espenes ve ark., 1995b). Koppang ve ark., (2010) da alabalıklarda elipsoid çevresi lenfoid dokuda T lenfositlerin biriktiğini belirtmişlerdir. Graf ve Schlüns (1979) sazanda (*Cyprinus carpio L.*) yaptıkları çalışmada elipsoid kapılların çevresinde retikulum ipliklerinin ve tek sıra makrofajların varlığından bahsetmişlerdir. Makrofajların oluşturduğu halkanın kollagen ipliklerle pulpadan sınırlandırıldığını ve söz konusu yapının bazı omurgalıların dalağındaki elipsoidin benzeri olduğunu ileri sürmüşlerdir. Sunulan çalışmada da penisillar kapıllar çevresinde elipsoid ilişkili hücreler üç balık türünde de görüldü. Bunun yanında elipsoid çevresi lenfoid doku, deniz levreği ve sudak dalağında görüldü, fakat ot sazani dalağında rastlanmadı.

Dalak dokusunda bağ dokusu ipliklerinin varlığı incelendi. Retikulum ipliklerinin kapsülde, bütün damarların duvarında ve parenşimde bulunduğu, ayrıca melanomakrofaj merkezlerinin sınırlandırarak şekilde organize olduğu görüldü. Kollagen ipliklerin penisillar arterlerin son kısımlarına kadar bulunduğu görüldü. Elastik ipliklerin de kapsül ve damarların etrafında buldukları gözlemlendi. Yapılan literatür taramasında dalakta bağdokusu iplikleri ile ilgili bir çalışmaya rastlanamamıştır.

Deniz levreği, sudak ve ot sazani dalak dokularında PAS pozitif hücreler tespit edildi. Lenfoid doku arasında ve melanomakrofaj merkezinde bulunan makrofajlar PAS pozitif olarak gözlemleniler. İçeriklerindeki lipofuksin ve mukosubstans nedeniyle PAS pozitivitesi verdikleri söylenebilir (Roberts 1975; Culling ve ark., 1985). Deniz levreğinde ise ilaveten damarların etrafındaki bazı hücrelerin de PAS reaksiyonu verdikleri görüldü. Bunların da yerleşim yeri ve hücresel fenotiplerine bakarak mast

hücreleri olduğu ileri sürülebilir. Nitekim heparin ve histamin içeriklerinden dolayı mast hücreleri PAS pozitif reaksiyon vermektedirler (Barber ve Westermann, 1978; Noya ve Lamas, 1996).

Sunulan çalışmada deniz levreği, sudak ve ot sazani dalak dokularında plazmablast ve plazma hücreleri pironinofilik olarak gözlemlendi. Özellikle melanomakrofaj merkezlerinin çevresinde ve elipsoidlerin etrafında yoğunlaştıkları dikkati çekti. Benzer şekilde deniz levreğinde daha önce beyaz pulpanın zayıf olduğu yerlerde, pulpa arterlerinin çevresinde ve melanomakrofajların etrafında Ig pozitif hücreler gözlemlenmiştir (Scapigliati ve ark., 1996). Kalkan balığında IgM pozitif hücreler dalakta elipsoid çevresi ve melanomakrofaj merkezlerinin etrafında tespit edilmiştir (Press ve ark., 1994; Fournier-Betz ve ark., 2000). Bu konuda sudak ve ot sazani dalağında yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanamadı.

Sonuç olarak bu çalışmada, yaşam ortamı ve yeme alışkanlığı farklı olan üç balıkta, dalak dokusunun histolojik ve histokimyasal özellikleri karşılaştırmalı olarak incelendi. Deniz levreğinde dalağın daha gelişmiş bir organizasyona sahip olduğu tespit edildi. Araştırma sonunda, tuzlu su ve karnivor beslenme alışkanlığının oluşturduğu mikrobiyal ortamının, sekonder lenfoid organ olan dalak dokusunun daha organize gelişmesine katkıda bulunduğu söylenebilir.

Yapılan çalışmada elde edilen bulgular, materyal olarak kullanılan balıkların buldukları konvansiyonel koşulları yansıtan bulgulardır. Patojenlerin olmadığı ortamlarda yetiştirilen balıklarda ön böbrek ve dalak dokusunun incelenmesi ve deneysel enfeksiyonlarla, karşılaştırmalı immünite çalışmalarının yapılması önerilebilir. Sunulan çalışmada elde edilen bulgular, besleme ve immüneyi hedefleyen çalışmalarının tamamında temel bilgi olarak kullanılacak niteliktedir.

## Teşekkür

Sunulan araştırmaya (SAE-09014) desteklerinden dolayı ADÜ/BAP Koordinasyon Birimine, materyal sağlamadaki yardımlarından dolayı Akdeniz Su Ürünleri Araştırma Üretme 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.
- 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(1): 35-43.
- Castro R, Tafalla C (2015). Overview of fish immunity. *Mucosal Health in Aquaculture*. Academic Press USA, pp. 3-54.
- Crossman G (1937). Modification of mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anatomical Record*, 69, 33-8.
- Cudmore B, Mandrak NE (2004). Biological synopsis of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Canadian Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2705, 44.
- Culling CFA, Alliston RT, Barr WT (1985). *Cellular pathology technique*. Butterworths London, UK, pp. 164-79.
- Ellis AE (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, 25, 827-839.
- Espenes A, Press CML, Dannevig BH, Landsverk T (1995a). Investigation of the structural and functional features of splenic ellipsoids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell and Tissue Research*, 279, 469-74.
- Espenes A, Press CML, Dannevig BH, Landsverk T (1995b). Immune-complex trapping in the splenic ellipsoids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell and Tissue Research*, 282, 41-48.

- Fournier-Betz V, Quentel C, Lamour F, LeVen A (2000). Immunocytochemical detection of Ig-positive cells in blood, lymphoid organs and the gut associated lymphoid tissue of the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 10, 187-202.
- Graf R, Schlüns J (1979). Ultrastructural and histochemical investigation of the terminal capillaries in the spleen of the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cell and Tissue Research*, 196, 289-306.
- Kita J, Itazawa Y (1989). Release of erythrocytes from the spleen during exercise and splenic constriction by adrenaline infusion in the rainbow trout. *Japanese Journal of Ichthyology*, 36, 48-52.
- Koppang EO, Fischer U, Moore L, Tranulis MA, Dijkstra JM, Köllner B, Hordvik I (2010). Salmonid T cells assemble in the thymus, spleen and in novel interbranchial lymphoid tissue. *Journal of Anatomy*, 217, 728-739.
- 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, Garcí-Ayala A (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, 303-9.
- 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, 439-43.
- 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, Kiyaga 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, 315-22.
- 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 CML, 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.
- Quesada J, Viilena MI, Agulleiro B (1990). Structure of the spleen of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a light and electron microscopic study. *Journal of Morphology*, 206, 273-281.
- Roberts RJ (1975). Melanin-containing cells of teleost fish and their relation to disease. *The Pathology of Fishes*, p. 399-428.
- Scapigliati G, Romano N, Buonocore F, Picchietti S, Baldassini MR, Prugnoli D, Abelli L (2002). The immune system of sea bass, *Dicentrarchus labrax*, reared in aquaculture. *Developmental & Comparative Immunology*, 26, 151-60.
- Scapigliati G, Romano N, Picchietti S, Mazzini M, Mastrolia L, Scalia D, Abelli L (1996). Monoclonal antibodies against sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) immunoglobulins: immunolocalisation of immunoglobulin-bearing cells and applicability in immunomassays. *Fish & Shellfish Immunology*, 6, 383-401.
- Van Muiswinkel WB, Lamers CHJ, Rombout JHWM (1991). Structural and functional aspects of the spleen in bony fish. *Research in immunology*, 142, 362-366.
- Vigliano FA, Bermúdez R, Quiroga MI, Nieto JM (2006). Evidence for melano-macrophage centres of teleost as evolutionary precursors of germinal centres of higher vertebrates: an immunohistochemical study. *Fish & Shellfish Immunology*, 21, 467-71.
- Watts M, Munday BL, Burke CM (2001). Immune responses of teleost fish. *Australian Veterinary Journal*, 79, 570-4.
- Zapata A, Diez B, Cejalvo T, Gutierrez-de Frias C, Cortes A (2006). Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20, 126-36.
- 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.