

**KANGAL BALIKLARININ (*GARRA RUFA*)
SOLUNGAÇLARINDAKİ MUKUS HÜCRELERİNİN
HİSTOKİMYASI ÜZERİNE ÇALIŞMA**

**STUDY ON THE HISTOCHEMISTRY OF MUCOUS CELLS IN
THE GILLS OF KANGAL FISH (*GARRA RUFA*)**

Dilek DİLER^{1*} ve Kenan ÇINAR¹

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı,
32260, ISPARTA

Geliş Tarihi: 1 Mayıs 2009

Kabul Tarihi: 20 Haziran 2009

ÖZET

Bu çalışma, Kangal balıklarının (*Garra rufa*) solungaçlarındaki mukus hücrelerinin histokimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla yapıldı. Primer lamel epitelinde bulunan mukus hücrelerinin asidik ve nötral glikokonjugatları, siyalik asit rezidüleri ve sülfatlı, çok sülfatlı ve O- sülfat esterli glikokonjugatları, sekonder lamele ait mukus hücrelerinin ise nötral glikokonjugat ile siyalik asit rezidüleri içerdiği belirlendi. Aynı zamanda PAS/AB pH 2.5 ve AF/AB pH 2.5 boyama yöntemlerinde primer lamel mukus hücrelerinde asidik glikokonjugatların baskın olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: *Garra rufa*, glikokonjugat, mukus hücresi, solungaç.

ABSTRACT

The study was undertaken to determine the histochemical properties of mucous cells in the gill of the Kangal fish (*Garra rufa*). It was detected mucous cells in the primary lamellae epithelium contained acidic and neutral glycoconjugates, sialic acid residues and sulphated, very sulphated and O- sulphate esters glycoconjugates and mucous cells in the secondary lamellae contained neutral glycoconjugate and sialic acid residues. Acidic glycoconjugates in the mucous cells of primary lamellae were dominant in PAS/AB pH 2.5 and AF/AB pH 2.5 staining procedures were determined.

Key words: *Garra rufa*, glycoconjugate, mucous cell, gill.

* Sorumlu yazar: dilekyilmaz@stud.sdu.edu.tr

1. GİRİŞ

Solungaçların çevreleriyle olan doğrudan temaslarından dolayı solungaç epitelinde bulunan mukus hücreleri tarafından salgılanan mukus maddesi, patojen mikroorganizmalara karşı fiziksel bir bariyer oluşturmasının yanı sıra lubrikasyon, solunum, iyon regülasyonu ve difüzyon gibi fonksiyonlardan da sorumludur (Fletcher, 1978; Shephard, 1994; Domeneghini vd., 1998; Zayed ve Mohamed, 2004).

Mukusun bileşimini belirlemeye yönelik kullanılan klasik ve lektin histokimya yöntemleri ile farklı balık türlerine ait solungaç mukus hücrelerinde bulunan mukus maddesinin içeriği hakkında çalışmalar yapılmıştır (Díaz vd., 2001; Calabró vd., 2005; Díaz vd., 2005a; Çınar vd., 2008).

Kangal balıkları (*Garra rufa*), Sivas-Kangal bölgesindeki termallerde yetiştirilen ve proteinden fakir beslenmeye bağlı olarak insan derisi üzerindeki ölü doku parçacıklarını tüketmesi nedeniyle bazı cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılan Cyprinid bir balıktır (http). Bu çalışmada, söz konusu özelliği nedeniyle ülkemiz turizmüne de önemli katkıları olan Kangal balıklarının (*Garra rufa*) solungaçlarındaki mukus hücrelerinin glikokonjugat içerikleri klasik histokimyasal yöntemlerle belirlenmeye çalışılmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada, 10 adet erişkin (uzunluk 8-10 cm, ağırlık 10-20 g) *Garra rufa* türüne ait solungaç örnekleri materyal olarak kullanıldı. Alınan doku örnekleri 24 saat süreyle % 10' luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Yıkama işleminden sonra rutin histolojik doku takibi işleminden (yükselen alkol serileri, ksiloller, ksilol-parafin) geçirilen örnekler parafinde bloklandı. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitlere Tablo 1' de belirtilen boyama yöntemleri uygulandı. Hazırlanan preparatlar Olympus CX 41 tipi ışık mikroskobu altında incelendi ve ilgili kısımlardan fotoğraf çekimi yapıldı.

Tablo 1. *Garra rufa* Solungaç Mukus Hücrelerinde Bulunan Glikokonjugatların Belirlenmesi İçin Uygulanan Klasik Histokimya Teknikleri. PAS, Periyodik asit-Shif; KOH, saponifikasyon; AB pH 0.5, Alsiyan mavisi pH 0.5; AB pH 1.0, Alsiyan mavisi pH 1.0; AB pH 2.5, Alsiyan mavisi pH 2.5; AF, Aldehit fuksin

Uygulanan Yöntemler	Kaynak	Uygulanan Yöntemin Amacı
PAS	(McManus,1948)	Nötral glikokonjugatların belirlenmesi
PAS/AB pH 2.5	(Mowry,1956)	Nötral ve asidik glikokonjugat kompozisyonunun karşılaştırılması
KOH/PAS	(Culling vd., 1976)	Siyalik asit rezidülü glikokonjugatların belirlenmesi
AB pH 0.5	(Lev ve Spicer, 1964)	Güçlü sülfatlı glikokonjugatların belirlenmesi
AB pH 1.0	(Lev ve Spicer, 1964)	O- sülfat esterli glikokonjugatların belirlenmesi
AB pH 2.5	(Lev ve Spicer, 1964)	Asidik glikokonjugatların belirlenmesi
AF	(Gomori, 1952)	Sülfatlı asidik glikokonjugatların belirlenmesi
AF/AB pH 2.5	(Spicer ve Mayer, 1960)	Sülfatlı ve asidik glikokonjugat kompozisyonunun karşılaştırılması

3. SONUÇLAR

Solungaç kesitlerine uygulanan klasik histokimyasal boyamalar sonucunda mukus hücreleri ile ilgili elde edilen bulgular dağılım ve histokimyasal boyanma özellikleri bakımından Tablo 2 ve Tablo 3' de verilmiştir.

Solungaçların primer ve sekonder lamel epitelinde bulunan mukus hücrelerinin uygulanan PAS yöntemine karşı güçlü reaksiyon verdikleri ve sekonder lamellerde yer alan PAS pozitif mukus hücrelerinin primer lamellerdekilere göre daha az sayıda oldukları gözlemlendi. Asidik ve nötral glikokonjugatların kıyaslanması amacıyla uygulanan PAS/AB pH 2.5 yöntemi sonucunda primer lamellerin uç

kısımında bulunan hücrelerinin çoğunda nötral glikokonjugatların bulunduğu belirlendi. Az sayıdaki mukus hücresinde ise asidik ve nötral glikokonjugatların karışım halinde bulunup asidik glikokonjugatların baskın olduğu, bazı hücrelerin ise AB pH 2.5 pozitif özellik gösterdiği belirlendi. Primer lamellerin sekonder lameller arasında bulunan mukus hücrelerinin çoğunun asidik glikokonjugatları içerdiği (Şekil 1), diğer hücrelerin bir kısmında asidik ve nötral glikokonjugatların karışım halinde bulunduğu ve asidik glikokonjugatların baskın olduğu gözlemlendi. Belirtilen bölgede az sayıdaki mukus hücresinin ise nötral karakterli glikokonjugatları içerdiği tespit edildi (Şekil 1). Sekonder lamellerde ise az sayıdaki mukus hücresinin PAS pozitif özellikte olduğu belirlendi.

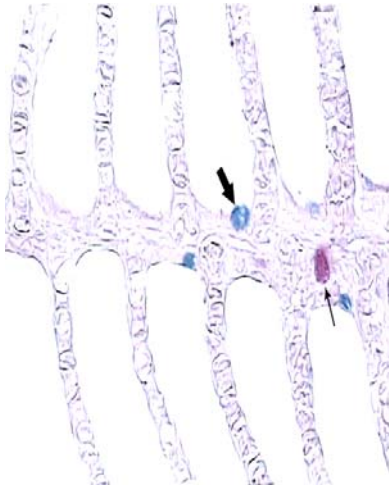
Siyalik asit rezidülü glikokonjugatların belirlenmesini sağlayan KOH/PAS boyama yöntemi sonucunda primer ve sekonder lamellerde bulunan mukus hücrelerinin bu yöntemle karşı güçlü reaksiyon verdikleri gözlemlendi (Şekil 2).

Tablo 2. *Garra rufa* Solungaç Mukus Hücrelerinin Dağılımı. Mukus Hücrelerinin Dağılımının Gösterimi; +++: çok; ++: orta; +: az; -: yok; * : baskın

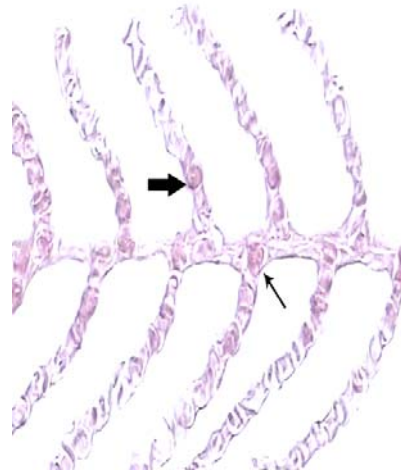
Uygulanan yöntemler	Mukus hücrelerinin dağılımı		
	Primer lamel		Sekonder lamel
	Uç kısım	Sekonder lamellerarası bölge	
PAS	+++	++	+
PAS/AB pH 2.5	AB *	AB *	PAS *
KOH/PAS	+++	++	+
AB pH 0.5	+	++	-
AB pH 1.0	++	++	-
AB pH 2.5	+++	+++	-
AF	+++	+	-
AF/AB pH 2.5	AB *	AB *	-

Tablo 3. *Garra rufa* Solungaçlarında Bulunan Mukus Hücrelerinin Histokimyasal Boyanma Özellikleri. Histokimyasal Boyanma Özelliklerinin Gösterimi; ++++: çok güçlü; +++: güçlü; ++: orta; +: zayıf; -: negatif; * : baskın

Uygulanan yöntemler	Boyanma özelliği		
	Primer lamel		Sekonder lamel
	Uç kısım	Sekonder lamellerarası bölge	
PAS	+++	+++	+++
PAS/AB pH 2.5	AB *	AB *	PAS *
KOH/PAS	+++	+++	+++
AB pH 0.5	+	+	-
AB pH 1.0	+	+	-
AB pH 2.5	++++	++++	-
AF	+	++	-
AF/AB pH 2.5	AB *	AB *	-

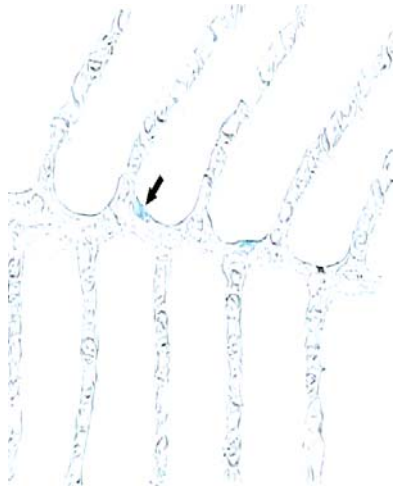


Şekil 1. Sekonder lameller arasında bulunan AB pH 2.5 (kalın ok) ve PAS (ince ok) pozitif mukus hücreleri, PAS/AB pH 2.5, X400.

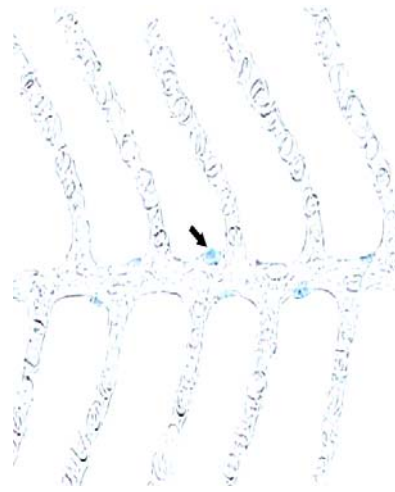


Şekil 2. Sekonder lameller arasında (kalın ok) ve sekonder lamelde (ince ok) KOH/PAS metoduna karşı reaksiyon gösteren mukus hücreleri, X400.

Farklı pH (0.5, 1.0 ve 2.5) değerlerine sahip AB metodlarının solungaç kesitlerine uygulanması ile primer lamellerde bulunan mukus hücrelerinin güçlü sülfatlı, O- sülfat esterli ve asidik glikokonjugatları içerdikleri tespit edildi. Sekonder lamellerde bulunan hücrelerde ise bu glikokonjugatlara rastlanmadı. Primer lamellerde bulunan mukus hücrelerinin AB pH 0.5 (Şekil 3) ve pH 1.0 (Şekil 4) yöntemlerine karşı zayıf, AB pH 2.5 yöntemine karşı ise güçlü reaksiyon verdikleri belirlendi.



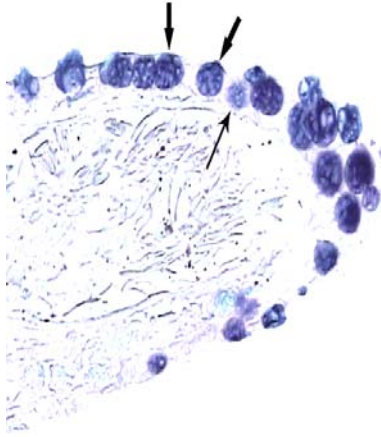
Şekil 3. Sekonder lameller arasındaki AB pH 0.5 pozitif mukus hücre (ok), X400.



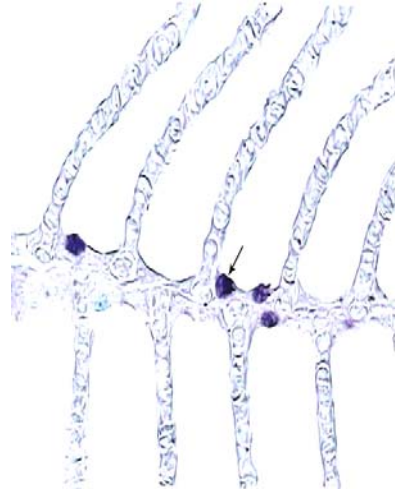
Şekil 4. Sekonder lameller arasındaki AB pH 1.0 pozitif mukus hücre (ok), X400.

Sülfatlı asidik glikokonjugatların belirlenmesi amacıyla uygulanan AF yöntemi ile primer lamellerin uç kısımlarında bulunan çoğu hücrenin bu yöntemle karşı zayıf, sekonder lameller arasında kalan az sayıda hücrenin ise orta dereceli reaksiyon verdiği saptandı.

Sülfatlı ve asidik glikokonjugatların kıyaslanmasını sağlayan AF/AB pH 2.5 kombine uygulaması sonucunda primer lamellerde bulunan mukus hücrelerinin çoğunun sülfatlı ve asidik glikokonjugat karışımını içerdiği saptandı (Şekil 5 ve 6). Fakat bu karışımda AB pH 2.5' in daha baskın olduğu ve az sayıda hücrenin de sadece AB pH 2.5 pozitif glikokonjugatı içerdiği belirlendi.



Şekil 5. Primer filamentin uç kısmında sülfatlı ve asidik glikokonjugat karışımını gösteren (kalın oklar) ve AB pH 2.5 pozitif gösteren (ince ok) mukus hücresi, AF/AB pH 2.5, X400.



Şekil 6. Sekonder lameller arasındaki sülfatlı ve asidik glikokonjugat karışımını gösteren (ok) mukus hücresi, AF/AB pH 2.5, X400.

4. TARTIŞMA

Araştırmacıların (Díaz vd., 2001; Arellano vd., 2004; Zayed ve Mohamed, 2004; Calabró vd., 2005; Díaz vd., 2005a ve 2005b; Çınar vd., 2008) *Micropogonias furnieri*, *Oreochromis niloticus*, *Clarias gariepinus*, *Solea senegalensis*, *Coelorhynchus coelorhynchus*, *Cynoscion guatucupa* ve *Cyprinus carpio* türleri üzerine yaptıkları solungaç histokimyası çalışmaları sonucunda elde ettikleri bulgular ile uyumlu olarak bu çalışmada da *Garra rufa* solungaçlarının bütün bölgelerinde yer alan mukus hücrelerinin primer lamellerin uçlarında daha yoğun olmak üzere solungaçların diğer bölgelerinin de PAS pozitif özellikle olduğu tespit edildi.

Solea senegalensis (Arellano vd., 2004) ve *Cyprinus carpio* (Çınar vd., 2008) türlerinde yapılan çalışmalarda mukus hücrelerinin çoğunun asidik glikokonjugatları içerdiği, *Micropogonias furnieri* (Díaz vd., 2001) türünde ise çoğu hücrenin nötral, az sayıdaki hücrenin ise asidik glikokonjugatlara sahip oldukları bildirilmektedir. Bu çalışmada ise primer lamellerin uç kısmında bulunan hücrelerin

çoğunun nötral glikokonjugatları içerdiği, sekonder lameller arasında bulunan mukus hücrelerinin çoğunun asidik, sekonder lamellerde ise az sayıdaki mukus hücrelerinin nötral glikokonjugat özellikte olduğu belirlendi.

Cyprinus carpio (Çınar vd., 2008), *Micropogonias furnieri* (Díaz vd., 2001) ve *Solea senegalensis* (Arellano vd., 2004) türlerinde elde edilen bulgularla uyumlu olarak bu çalışmada da *Garra rufa* solungaç mukus hücrelerinin siyalik asit rezidülü glikokonjugatları içerdiği gözlemlendi.

Arellano vd. (2004), Díaz vd. (2005a) ve Çınar vd. (2008) *Solea senegalensis*, *Cynoscion guatucupa* ve *Cyprinus carpio* solungaç mukus hücrelerinde çok sülfatlı ve O-sülfatlı esterli glikokonjugatların bulunduğunu bildirmelerine karşın, bu çalışmada primer lamellerde AB pH 0.5 ve pH 1.0 pozitif glikokonjugatlar belirlendi. *Solea senegalensis* (Arellano vd., 2004), *Coelorhynchus coelorhynchus* (Calabró vd., 2005), *Cynoscion guatucupa* (Díaz vd., 2005a) ve *Cyprinus carpio* (Çınar vd., 2008) solungaçlarına ait mukus hücrelerinin asidik glikokonjugatları içerdikleri bildirilmektedir. Bu çalışmada ise sadece primer lamelde asidik glikokonjugatları içeren mukus hücreleri belirlendi. Ancak sekonder lamel mukus hücrelerinde bu glikokonjugatlara rastlanmadı.

Çınar vd. (2008)' nin *Cyprinus carpio* solungaç mukus hücrelerinin sülfatlı glikokonjugatları içerdiklerini bildirmelerine karşın, bu çalışmada *Garra rufa* solungaç primer lamelinde AF pozitif mukus hücreleri belirlenirken, sekonder lamel mukus hücrelerinde sülfatlı glikokonjugatlara rastlanmadı.

Cyprinus carpio solungaç mukus hücrelerinde AF pozitif glikokonjugatların baskın olduğu bildirilirken (Çınar vd., 2008), bu çalışmada primer lamel mukus hücrelerinde asidik glikokonjugatların baskın durumda olduğu belirlendi.

5. ÖNERİLER

Bu çalışmada, Cyprinid bir balık olan ve endemik olarak Sivas-Kangal bölgesindeki termallerde yetiştirilen *Garra rufa* solungaçlarındaki mukus hücrelerinin içerdikleri glikokonjugat kompozisyonları belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen verilerin,

daha sonra bu tür ile ilgili yapılacak olan histopatolojik ve toksikolojik çalışmalara ışık tutacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

- Arellano, J.M., Storch, V., Sarasquete, C. (2004). Ultrastructure and histochemical study on gills and skin of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. *J Appl Ichthyol.* 20, 452-460.
- Calabró, C., Albanese, M.P., Lauriano, E.R., Licata, A., Martella, S., Concetta, C. (2005). Morphological histochemical and immunohistochemical study of the gill epithelium in the abyssal teleost fish *Coelorrhynchus coelorrhynchus*. *Folia Histochem Cytobiol.* 43, 51-56.
- Culling, C.F.A., Reid, P.E., Dunn, W.L. (1976). A new histochemical. method for the identification and visualisation of both side chain acylated and non-acylated sialic acids. *J Histochem Cytochem.* 24, 1225-1230.
- Çınar, K., Şenol N., Özen, M.R. (2008). Histochemical characterization of glycoproteins in the gills of the carp (*Cyprinus carpio*). *Ankara Univ Vet Fak Derg.* 55, 61-64.
- Díaz, A.O., Garcia, A.M., Devinenti, C.V., Goldemberg, A.L. (2001). Mucous cells in *Micropogonias furnieri* gills: Histochemistry and ultrastructure. *Anat Histol Embryol.* 30, 135-139.
- Díaz, A.O., Garcia, A.M., Devinenti, C.V., Goldemberg, A.L. (2005 a). Glycoconjugates in the branchial mucous cells of *Cynoscion guatucupa* (Cuvier, 1830) (Pisces: Sciaenidae). *Sci Mar.* 69, 545-553.
- Díaz, A.O., Garcia, A.M., Devinenti, C.V., Goldemberg, A.L. (2005 b). Ultrastructure and histochemical study of glycoconjugates in the gills of the white croaker (*Micropogonias furnieri*). *Anat Histol Embryol.* 34, 117-122.
- Domeneghini, C., Pannelli Straini, R., Veggetti, A. (1998). Gut glycoconjugates in *Sparus aurata* L. (Pisces, Teleostei). A comparative histochemical study in larval and adult ages. *Histol Histopathol.* 13, 359-372.
- Fletcher, T.C. (1978). Defence mechanism in fish. *J Histochem Cytochem.* 32, 681-689.
- Gomori, G. (1952). Gomori' s aldehyde fuchsin stain. (S. 238). (Editörler: C.F.A. Culling, R.T. Allison, W.T. Barr.) *Cellular Pathology Technique*. London: Butterworths.
- Lev, R., Spicer, S.S. (1964). Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *J Histochem Cytochem.* 12, 309-309.

- McManus, J.F.A. (1948). Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.* 23, 99-108.
- Mowry, R.W. (1956). Alcian blue techniques for the histochemical study of acidic carbohydrates. *J Histochem Cytochem.* 4, 407-408.
- Shephard, K.L. (1994). Functions for fish mucus. *Rev Fish Biol.* 4, 401-429.
- Spicer, S.S., Mayer, D.R. (1960). Aldehyde fuchsin/ alcian blue. (S. 233). (Editörler: C.F.A. Culling, R.T. Allison, W.T. Barr.) *Cellular Pathology Technique.* London: Butterworths.
- Zayed, A.E., Mohamed, S.A. (2004). Morphological study on the gills of two species of fresh water fishes: *Oreochromis niloticus* and *Clarias gariepinus*. *Ann Anat.* 186, 295-304.

http://www.tr.wikipedia.org/wiki/Kangal_bal%C4%B1%C4%9F%C4%B1
