

***Muraena helena* Linnaeus, 1758 (Akdeniz Müren Balığı)'nın Mide Mukozasının Histolojik ve Histokimyasal Olarak İncelenmesi**

Fatma KAYA*¹, Mehmet Rüştü ÖZEN²

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 32260, Isparta, Türkiye

²Isparta Uygulamalı Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, 32260, Isparta, Türkiye

(Alınış / Received: 09.01.2021, Kabul / Accepted: 03.12.2021, Online Yayınlanma / Published Online: 20.04.2022)

Anahtar Kelimeler

Akdeniz müreni,
Muraena helena,
Histokimya,
Mukoza,
Mukosubstans

Özet: Çalışmada *Muraena helena*'nin mide mukozasının, histolojik yapısı ve histokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla *Muraena helena* (N= 10)'nın mide bölgelerini oluşturan kardiya, fundus ve pilorustan alınan örnekler incelenmiştir. Otopsi ile alınan doku örnekleri %10 nötral formaldehit solüsyonunda tespit edilmiştir. Rutin histolojik doku takip aşamalarından sonra dokular parafin bloklara alınarak bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler hazırlanmıştır. Preparatlar Hematoksilen-Eosin (H-E), Aldehyde Fuchsin (AF), Periodic Acid Schiff (PAS), KOH, Alcian Blue (AB) pH 0.5, AB 0.3 M, AB 0.06 M, AB pH 2.5, AF/AB pH 2.5, AB pH 1.0, PAS/AB pH 2.5 boyama yöntemleri ile boyanmış ve fotoğraflanmıştır. İncelenen doku kesitlerinde, mide mukozasının tunika mukoza, submukoza, tunika muskularis ve tunika seroza olarak dört katmandan oluştuğu gözlenmiştir. Uygulanan histokimyasal boyama yöntemleri ile kardiya, fundus ve pilorus bölgelerinin güçlü düzeyde sülfatlı asidik, asidik, sülfatlı ve karboksilli asidik mukosubstans özelliği gösterdiği tespit edilmiştir.

Histological and Histochemical Investigation of the Stomach Mucosa of *Muraena helena* Linnaeus, 1758 (Mediterranean Moray Fish)

Keywords

Mediterranean morayeel,
Muraena helena,
Histochemistry,
Mucosa,
Mukosubstance

Abstract: In this study, it was aimed to determine the histological structure and histochemical properties of gastric mucosa of *Muraena helena*. For this purpose, samples taken from cardia, fundus and pylorus which from the stomach regions of *Muraena helena* (N=10) were examined. Tissue samples taken at autopsy were fixed in 10 % neutral formaldehyde solution. After the routine histological tissue following procedure stages, tissues were taken into paraffin blocks and 5 µm thick sections were prepared from the blocks. The preparations were stained with Hematoxylin-Eosin (H-E), Aldehyde Fuchsin (AF), Periodic Acid Schiff (PAS), KOH/PAS, Alcian Blue (AB) pH 0.5, AB 0.3 M, AB 0.06 M, AB pH 2.5, AF/AB pH 2.5, AB pH 1.0, PAS/AB pH 2.5 staining methods and photographed. In the tissue sections examined, it was observed that the stomach mucosa consists of four layers as tunica mucosa, submucosa, tunica muscularis and tunica serosa. With the histochemical staining methods applied, it was determined that the cardia, fundus and pylorus regions showed sulphate acidic, acidic sulphate and carboxylated acidic mucosubstances.

1. Giriş

Bu çalışmada kullanılan balıklar için gerekli olan izinler Tarım ve Orman Bakanlığı (15/08/2018 67852565-140.03.03- E.2410154; 30/01/2020 67852565-140.03.03- E.348181) ve Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'ndan (2020/1) alındı.

Muraenidae familyası dünya genelinde toplam 15 cins ve 197 türden oluşan bir ailedir. Kuzeydoğu Atlantik ve

Akdeniz'de bu 3 demersal predatör türle temsil edilmektedir [1]. Bu türler *Muraena helena* (Linnaeus, 1758), *Gymnothorax unicolor* (Delaroche, 1809) ve *Enchelycore anatina* (Lowe, 1838)'dir [2]. *Muraena* cinsinin en iyi bilinen türü olan *Muraena helena* (Akdeniz müreni) ilk kez Linnaeus tarafından 1758'de tanımlanmıştır [3]. *Muraena helena* dünya üzerinde Doğu Atlantik, Britanya Adalarının güneyi, Senegal, Azorlar, Madeira, Kanarya adaları, Yeşil Burun Adaları ve Akdeniz'de dahil olmak üzere geniş bir alanda yayılış gösterir [3].

*İlgili yazar: fatmakaya32@gmail.com

Müren balıklarının uzunlukları 27,5 cm ile 121 cm ağırlıkları ise 116 gr ile 3680 gr aralığında değişiklik gösterir. Yaşamlarını 5-80 metre arasında değişen derinliklerde sürdürebilirler. *Muraena helena* nokturnal, yani geceleri aktif olarak beslenen karnivor bir tür olup en önemli besin kaynağını bentik balıklar, cephalopodlar, crustacealar ve kaya deliklerinde bulunan bentik komüniteler oluşturur [4]. Mürenlerin vücutları koyu renkli olup, üzeri sarı benekli ve pulsuz bir deriyle kaplıdır. Stres anında deriden bol miktarda mukus salgırlarlar. Çenelerinde sıra halinde sivri dişler bulunur. Isırığı insanlar için tehlikelidir. Uzun ve güçlü ağızlarının içinde sivri uçlu, uzun ve keskin dişleri bulunur [5]. *Muraena helena* ülkemiz Akdeniz sularının belli bölgelerinde geniş olarak yayılım göstermekte ve bol miktarda bulunmaktadır. Önemli bir tür olarak değerlendirilmekte birlikte saldırgan olması ve zor avlanabilmesi nedeniyle ekolojileri ve biyolojik özellikleri ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça azdır.

Kemikli balıklarda sindirim kanalında yer alan mukus hücrelerinin yerleşimlerinin sindirim kanalının değişik bölümlerinde türden türe değişiklik gösterdiği ve kayganlaştırma, parazit ve patojenik bakterilere karşı bariyer oluşturma, mide mukozasını sindirim enzimlerinden koruma, iyonik ve ozmotik dengeyi düzenleme, sindirim ve absorpsiyon gibi işlevlere yardımcı olduğu, asidik ve sülfatlı glikoproteinlerin bakteriyel adezyonları engellediği, glikoproteinlerin proteaz enziminin dejenerasyonundan koruduğu rapor edilmiştir [6]. Bu çalışmada *Muraena helena*'nın mide kısımlarının genel histolojik yapısının belirlenmesi ve mide mukozasındaki değişik karakterdeki mukosubstans yerleşiminin histokimyasal yöntemlerle tespit edilmesi amaçlanmıştır. Araştırma bu türün midesinin histokimyasal yapısı ile ilgili ilk olup, elde edilen bulguların yapılacak sonraki bilimsel çalışmalara yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyal

Bu çalışmada Antalya ili sınırları içerisinde bulunan Konyaaltı bölgesinden (20 m derinlik) ve Antalya iline 42 km uzaklıkta bulunan Serik ilçesi Boğazkent bölgesinden (20-30 m derinlik) paraketa ile avlanan 10 adet erişkin *Muraena helena* (Akdeniz müreni) balığı kullanıldı. Balıkların boyları 50-93 cm ve total ağırlıkları 320-650 gr aralığında tespit edildi. Avcılık ile ilgili yasal izin ve gerekli diğer izinler Tarım ve Orman Bakanlığı (15/08/2018 67852565-140.03.03-E.2410154) (30/01/2020 67852565-140.03.03-E.348181) ile Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (2020/1) alındı.

2.2. Metot

2.2.1. Otopsi yöntemi

Yakalanan balıklar, içerisinde deniz suyu bulunan ve oksijenlendirilen taşıma kapları ile Süleyman Demirel

Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü laboratuvarına getirildi. Balıklara önce kinaldin (Quinaldine) solüsyonu (150 mg/L) ile derin anestezi işlemi uygulandı. Bayıltilan balıkların boy ve total ağırlıkları ölçüldü. Anüsüne steril sivri uçlu keskin bir makasla girilerek öne doğru bir insizyon yapıldı. Sonra yine öne doğru ilerlemek suretiyle özofagusun proksimal kısmına kadar karın bölgesi açıldı. Midenin kardiya, fundus ve pilorus bölgelerinden örnek alımı gerçekleştirildi.

2.2.2. Histolojik yöntem

Midenin kardiya, fundus ve pilorus bölgelerinden alınan dokular %10' luk nötral formaldehit solüsyonunda 24 saat bekletilerek tespit edildi [19]. Kardiya, fundus ve pilorus bölgelerinden alınarak tespit edilen 1-2 cm uzunluğundaki doku örnekleri proses kaplarına aktarıldı. Bir gece akan suda yıkanıp ertesi gün doku takibi aşamalarından (%70, %80, %96, %100, %100 alkol serilerinden) geçirilerek [7] parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Doku kesitlerine Hematoksilen-Eosin [7,8,9] boyama yöntemi uygulandı.

2.2.3. Histokimyasal yöntemler

Örneklenen bölgelerin mukozasında farklı karaktere sahip mukosubstansın yerleşimini tespit etmek için doku kesitlerine Tablo 1' de gösterilen boyama yöntemleri uygulandı.

Tablo 1. Mide mukosubstans özelliklerinin belirlenmesi için uygulanan spesifik boyama yöntemleri

Mukosubstans Özelliği	Uygulanan Yöntem
Sülfatlı asidik mukosubstans	AF (Aldehyde Fuchsin) [10]
Siyalik asitli glikoproteinler	KOH/PAS [8]
Güçlü sülfatlı glikoproteinler	AB pH 0.5 [11]
Güçlü sülfat ve zayıf sülfatlı glikoproteinler	AB 0.3 M [12]
Karboksil grup (siyalik asit ya da uranik asit) ya da sülfat esterli glikoproteinler	AB 0.06 M [12]
Asidik mukosubstans	AB (Alcian Blue) pH 2.5 [11]
Sülfatlı ve karboksilli asidik mukosubstans	AF/AB pH 2.5 [13]
Nötr mukosubstans	PAS (PeriodicAcid/Schiff) [14]
O-sülfat esterli glikoproteinler	AB pH 1.0 [11]
Nötr ve asidik mukosubstans	PAS/AB pH 2.5 [15]

Histokimyasal boyama yöntemleri ile boyanarak hazırlanan preparatlar Olympus CX 41 tipi ışık mikroskopunda incelenerek Leica DM 2500 tipi kamerayla fotoğraflandı. Mikrofotoğraflar üzerindeki morfolojik ölçümler, bilgisayar ortamında ImageJ (rsbweb.nih.gov/ij/) görüntü analiz programı kullanılarak gerçekleştirildi. Programın kalibrasyonu,

mikrofotografılar çekilirken, aynı büyütmede objektif mikrometrenin de fotoğraflanması ile sağlandı. Elde edilen sonuçlar boyanma oranları göz önüne alınarak negatif (-), çok zayıf (\pm), zayıf (+), orta (++) , güçlü (+++) ve çok güçlü pozitif (++++) aralığında değerlendirildi.

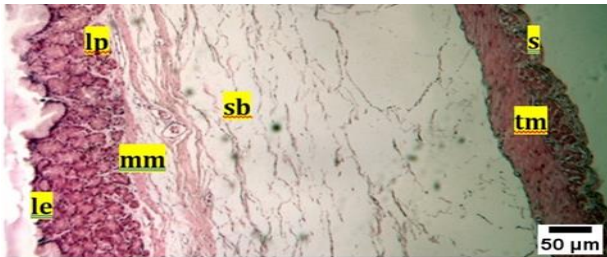
3. Bulgular

3.1. Histolojik bulgular

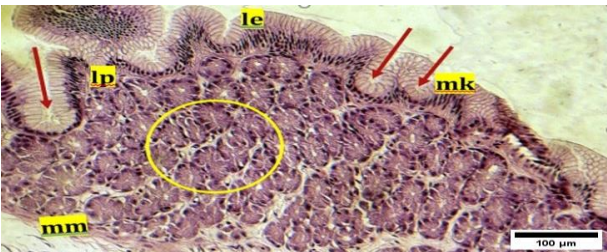
Midenin duvar yapısının sırasıyla; tunika mukoza, submukoza, tunika muskularis ve tunika seroza olarak dört katmandan oluştuğu gözlemlendi. Kardiya, fundus ve pilorusta yer alan mukozaların farklı yapısal özelliklere sahip olduğu gözlemlendi.

3.1.1. Kardiya

Kardiya duvarının lamina epitelyalis, lamina propria, muskularis mukoza, submukoza, tunika muskularis ve seroza tabakalarından oluştuğu gözlemlendi (Şekil 1). Midenin ilk bölgesi olan kardiya mukozanın lümenine doğru mukozal katlanmalar yaptığı ve tek katlı prizmatik örtü epitelden oluştuğu belirlendi. Bu katlanmalar arasında yüzey epiteli tarafından içeriye doğru oluşturulan gastrik girintiler tespit edildi (Şekil 2). Lamina propriyanın altındaki muskular mukoza tabakasının ince bir katman halinde soluk renkte boyandığı ve kas liflerinden oluştuğu gözlemlendi (Şekil 1,2). Submukoza tabakasının damardan zengin olduğu ve gevşek bağ dokusundan oluştuğu belirlendi (Şekil 1). Tunika muskularis tabakasının içte sirküler ve dışta ise longitudinal düz kas tabakaları olmak üzere iki tabakadan oluştuğu gözlemlendi. En içteki sirküler kas tabakasının oldukça kalın olduğu tespit edildi. En dışta kardiya bölümünü dıştan saran seroza tabakasının yer aldığı gözlemlendi (Şekil 1).



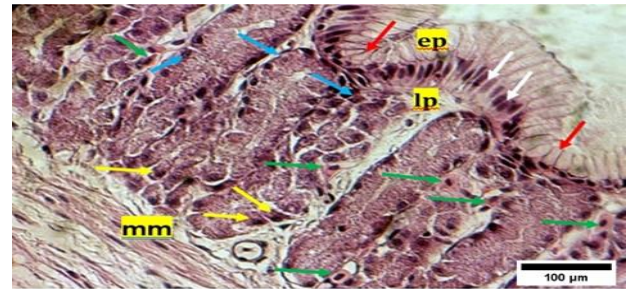
Şekil 1. Kardiya. Lamina epitelyalis (le); Lamina propria (lp); Muskular mukoza, (mm); Submukoza (sb); Tunika muskularis (tm); Tunika seroza (s). H&E; Bar 50 µm.



Şekil 2. Kardiya. Gastrik girinti (kırmızı oklar); Mukozal katlanma (mk); Lamina epitelyalis (le); Lamina propria (lp); Kardiya bezleri (sarı daire); Muskular mukoza (mm). H&E; Bar 100 µm.

3.1.2. Fundus

Midenin en geniş kısmı olan fundus duvarının lamina epitelyalis, lamina propria, muskularis mukoza, submukoza, tunika muskularis ve seroza tabakalarından oluştuğu gözlemlendi (Şekil 3). Kardiya bölgesinde olduğu gibi fundus bölgesinde de yüzey epitelinin içeriye doğru gastrik girintiler oluşturduğu ve tek katlı prizmatik hücrelerden oluştuğu tespit edildi. Fakat fundusta gastrik girintilerin biraz daha derinleştiği belirlendi (Şekil 3). Yüzey müköz hücrelerinin alt kısımlarında eozinofilik granüler hücreler saptandı. Gastrik girintilerin hemen altında yer alan lamina propria bölgesinde tübüler şekilli fundus bezleri gözlemlendi. Fundus bezlerinin boyun kısımlarında yer alan müköz boyun hücreleri ile bu hücrelere arasına dağılmış pariyetal hücreler ve bezin derinliklerinde şef hücreleri gözlemlendi (Şekil 3). Müköz boyun hücreleri sitoplazmalarının açık boyanması pariyetal hücreler ise belirgin eozinofilik boyanması sayesinde kolaylıkla ayırt edildi. Fundus bezlerindeki şef hücreleri ise bazal konumlu çekirdekleri ve hematoksilenle yoğun boyanmış olmaları nedeniyle kolaylıkla tanındı. Şef hücrelerinin bezin derinliklerinde daha fazla olduğu tespit edildi. Musküler mukozanın kardiya'daki gibi soluk renkli ince bir tabakadan ve kas liflerinden oluştuğu gözlemlendi (Şekil 3). Tunika muskularis tabakasının ise içte sirküler dışta da longitudinal olarak iki düz kas katmanından oluştuğu belirlendi. Kas tabakaları arasında miyenterik pleksusa rastlandı. En dışta fundus bölümünü dıştan saran seroza tabakası gözlemlendi (Şekil4).



Şekil 3. Fundus. Lamina epitelyalis (le); Eozinofilik granüler hücreler (beyaz oklar); Lamina propria (lp); Pariyetal hücreler (yeşil oklar); Şef hücreler (sarı oklar); Müköz membran hücreleri (mavi oklar); Yüzey müköz hücreleri (kırmızı oklar); Muskular mukoza (mm). H&E; Bar 100 µm.



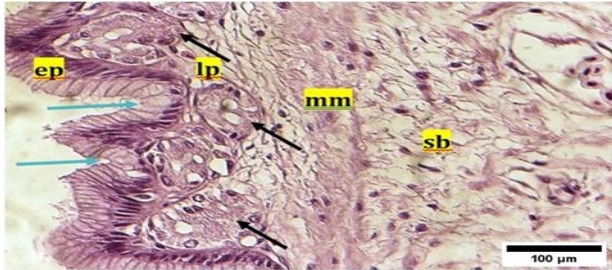
Şekil 4. Fundus. Tunika muskularis (tm) (kırmızı ok); Sirküler kas tabakası (skt); Longitudinal kas tabakası (lkt); Miyenterik pleksus (yeşil oklar); Tunika seroza (s). H&E; Bar 100 µm.

3.1.3. Pylorus

Midenin son kısmı olan pylorus duvarının lamina epitelyalis, lamina propria, musküler mukoza, submukoza, tunika muskularis ve seroza tabakalarından oluştuğu gözlemlendi (Şekil 5). Epitelin tek katlı prizmatik örtü epiteliyle döşeli olduğu saptandı (Şekil 6). Mukozanın lümenine doğru kardiya ve fundusa göre daha büyük mukozal katlanmalar yaptığı tespit edildi (Şekil 5). Epitelin içeriye doğru oluşturduğu gastrik girintilerin yani foveolaların pylorusta oldukça derin olduğu belirlendi (Şekil 5). Foveola gastrikaların derin olması nedeniyle pilor bezlerinin boylarının kısa olduğu ve tek tip müköz hücrelerden oluştuğu gözlemlendi (Şekil 6). Muskular mukozanın çoğu yerde kesikli ince bir tabaka ve kas liflerinden oluştuğu, submukozanın kan damarları ve sinir lifleri içeren gevşek bağ dokusundan oluştuğu belirlendi (Şekil 5, 6).



Şekil 5. Pylorus. Lamina epitelyalis (le); Lamina propria (lp); Faveola gastrikalar (mavi oklar); Mukozal katlanma (mk); Muskular mukoza (mm); Submukoza (sb). H&E; Bar 100 µm.



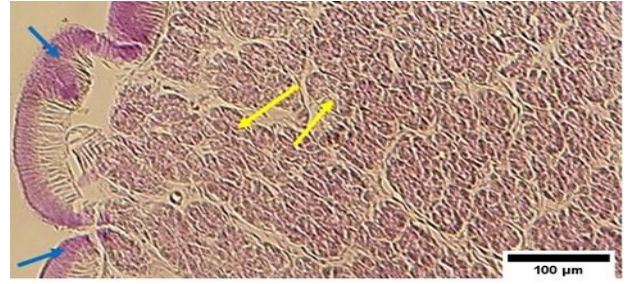
Şekil 6. Pylorus. Gastrik girintiler (mavi oklar); Lamina epitelyalis (le); Lamina propria (lp); pilor bezleri (siyah oklar); Muskular mukoza (mm); Submukoza (sb). H&E; Bar 100 µm.

3.2. Histokimyasal bulgular

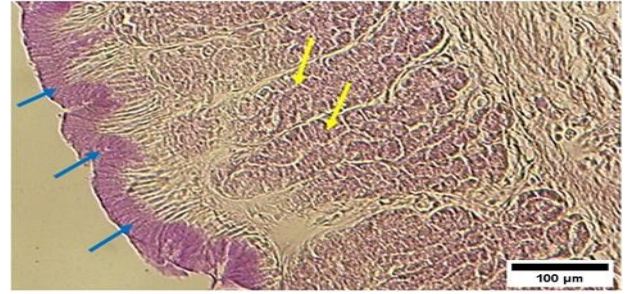
Uygulanan histokimyasal boyama yöntemleri mide mukozasının farklı mukosubstansları içerdiğini ve histokimyasal olarak farklı özelliklere sahip olduğunu gösterdi.

3.2.1. Sülfatlı asidik mukosubstansın belirlenmesi [(AF (Aldehyde Fuchsin))]

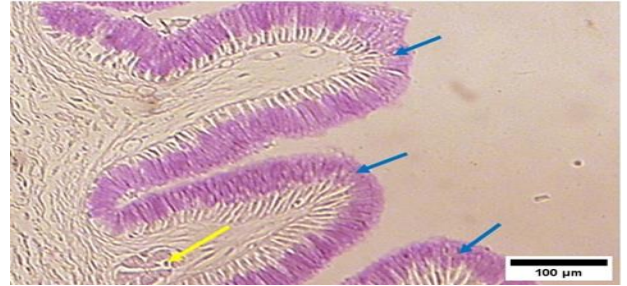
Kardiya bölgesinde (Şekil 7) lamina epitelyalinin güçlü (+++) reaksiyon verdiği, fundus (Şekil 8) ve pylorus bölgesinde (Şekil 9) ise çok güçlü (++++) reaksiyon verdiği gözlemlendi. Kardiya, fundus ve pylorus bezlerinin AF boyama yöntemi ile gösterdikleri reaksiyonun kardiya ve fundusta orta (Şekil 7,8), pylorusta ise zayıf olduğu görülmektedir (Şekil 9).



Şekil 7. Kardiya. Lamina epitelyalinde sülfatlı asidik mukosubstans; (mavi oklar), Kardiya bezleri (sarı oklar). AF; Bar 100 µm.



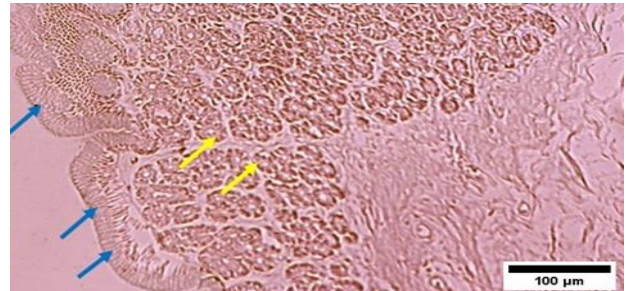
Şekil 8. Fundus. Lamina epitelyalinde sülfatlı asidik mukosubstans (mavi oklar). Fundus bezleri (sarı oklar); AF; Bar 100 µm.



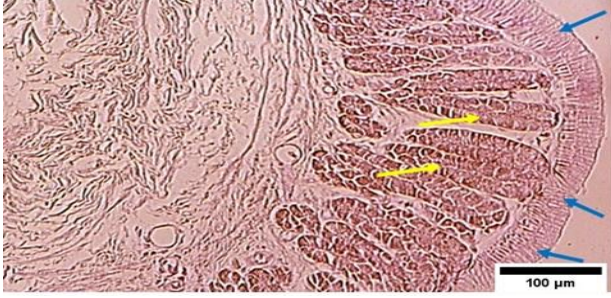
Şekil 9. Pylorus. Lamina epitelyalinde sülfatlı asidik mukosubstans (mavi oklar). Pylorus bezi (sarı ok); AF; Bar 100 µm.

3.2.2. Sialik asitli mukosubstansın belirlenmesi (KOH/PAS)

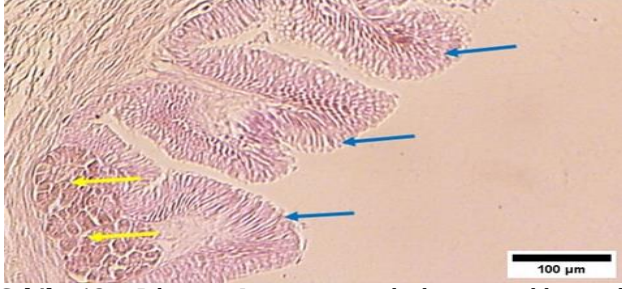
Kardiya (Şekil 10), fundus (Şekil 11) ve pylorus bölgelerinde (Şekil 12) lamina epitelyalinin KOH/PAS kombine boyama yönteminde zayıf reaksiyon verdiği gözlemlendi. Kardiya, fundus ve pylorusta yer alan mide bezlerinin KOH/PAS boyama yöntemiyle orta şiddette reaksiyon verdiği gözlemlendi (Şekil 10, 11, 12).



Şekil 10. Kardiya. Lamina epitelyalinde; sialik asitli mukosubstans (mavi oklar). Kardiya bezleri (sarı oklar). KOH/PAS; Bar 100 µm.



Şekil 11. Fundus. Lamina epitelyaliste siyalik asitli mukosubstans (mavi oklar). Fundus bezleri (sarı oklar). KOH/PAS; Bar 100 µm.



Şekil 12. Pylorus. Lamina epitelyaliste siyalik asitli mukosubstans (mavi oklar). Pylorus bezleri (sarı oklar). KOH/PAS; Bar 100 µm.

3.2.3. Güçlü sülfatlı mukosubstansın belirlenmesi (Alcian Blue pH 0.5)

Kardiya, fundus ve pylorus bölgesinde lamina epitelyalinin çok zayıf (\pm) reaksiyon gösterdiği saptandı. Kardiya, fundus ve pylorusta yer alan mide bezlerinin AB pH 0.5 boyama yöntemiyle reaksiyon vermediği gözlemlendi.

3.2.4. Güçlü sülfatlı ve zayıf sülfatlı mukosubstansın belirlenmesi, (Alcian Blue 0.3 M)

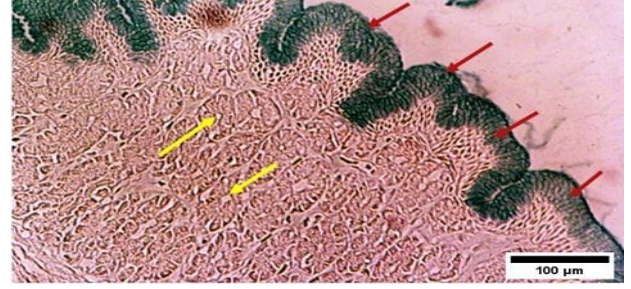
Güçlü sülfatlı ve zayıf sülfatlı glikoproteinlerin belirlenmesi için uygulanan AB 0.3 M boyama yöntemi sonucunda herhangi bir reaksiyon gözlenmedi.

3.2.5. Karboksil gruplu (siyalik asit ya da uranik asit) ya da sülfat esterli mukosubstansın belirlenmesi, (Alcian Blue 0.06 M)

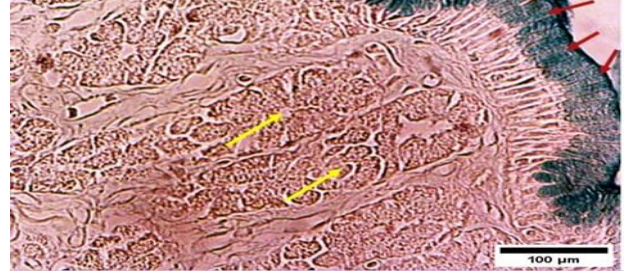
Karboksil gruplu (siyalik asit ya da uranik asit) ya da sülfat esterli glikoproteinlerin belirlenmesi için uygulanan AB 0.06 M boyama yöntemi sonrasında herhangi bir reaksiyon gözlenmedi.

3.2.6. Asidik mukosubstansın belirlenmesi, (Alcian Blue pH 2.5)

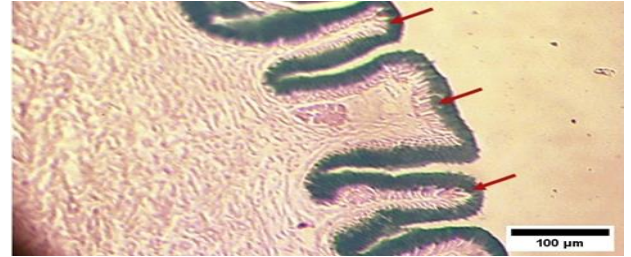
Kardiya (Şekil 13), fundus (Şekil 14) ve pylorus (Şekil 15) bölgelerinde AB pH 2.5 boyama sonrasında lamina epitelyalinin çok güçlü (+++++) reaksiyon verdiği gözlemlendi. Midede yer alan bezlerin ise AB pH 2.5 boyama yönteminde boyanmadığı gözlemlendi.



Şekil 13. Kardiya. Lamina epitelyaliste asidik mukosubstans (kırmızı oklar). Kardiya bezleri (sarı oklar). AB pH 2.5; Bar 100 µm.



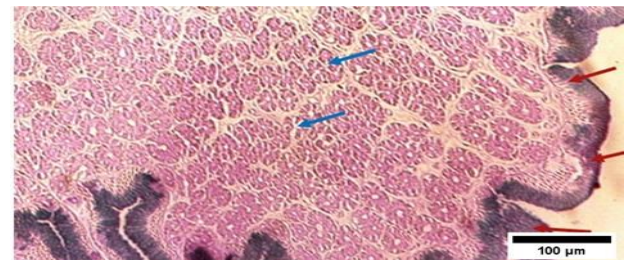
Şekil 14. Fundus. Lamina epitelyaliste asidik mukosubstans (kırmızı oklar). Fundus bezleri (sarı oklar). AB pH 2.5; Bar 100 µm.



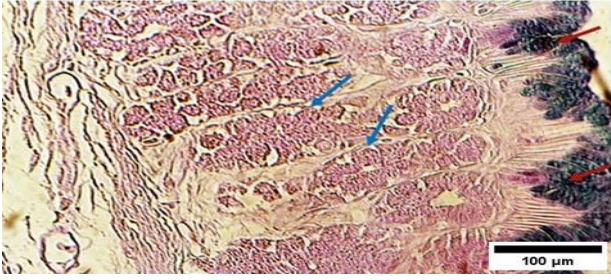
Şekil 15. Pylorus. Lamina epitelyaliste asidik mukosubstans (kırmızı oklar). AB pH 2.5; Bar 100 µm.

3.2.7. Sülfatlı ve karboksilli asidik mukosubstansın belirlenmesi, (AF/AB pH 2.5)

Kardiya (Şekil 16), fundus (Şekil 17) ve pylorusta (Şekil 18) lamina epitelyalinin AF/AB pH 2.5 kombine boya yönteminde AB pH 2.5 ile çok güçlü (+++++) boyanma özelliğine sahip olduğu belirlendi. Lamina epitelyaliste AB pH 2.5 boyamanın AF boyamaya göre daha baskın olduğu gözlemlendi (kırmızı oklar). Kardiya, fundus ve pylorustaki bezlerde ise çok güçlü reaksiyon gözlemlendi (mavi oklar).



Şekil 16. Kardiya. Lamina epitelyaliste sülfatlı ve karboksilli asidik mukosubstans (kırmızı oklar). Kardiya bezleri (Mavi oklar). AF/ AB pH 2.5; Bar 100 µm.



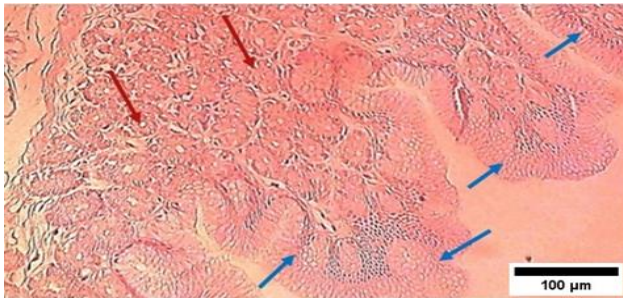
Şekil 17. Fundus. Lamina epitelyaliste sülfatlı ve karboksilli asidik mukosubstans (kırmızı oklar). AF/ AB pH 2.5; Bar 100 µm.



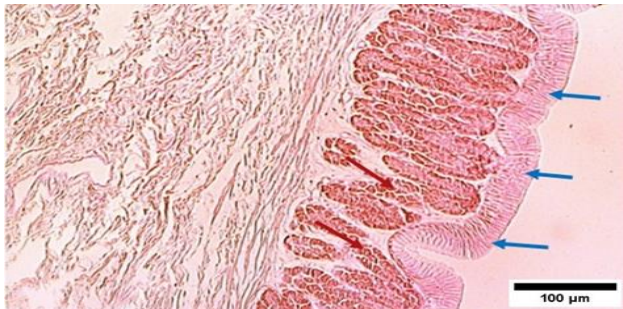
Şekil 18. Pylorus. Lamina epitelyaliste sülfatlı ve karboksilli asidik mukosubstans (krmızı oklar). AF/ AB pH 2.5; Bar 100 µm.

3.2.8. Nötr mukosubstansın belirlenmesi, PAS (Periodic Acid/Schiff)

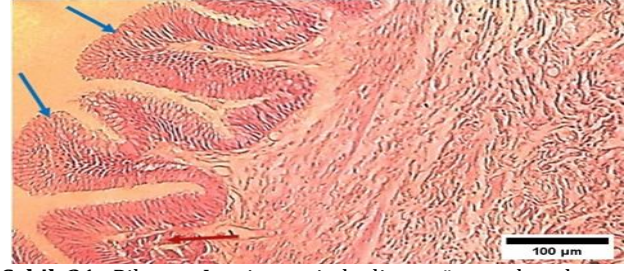
Lamina epitelyalinin PAS boyama yöntemiyle kardiya (Şekil 19) bölgesinin çok zayıf, fundus (Şekil 20) bölgesinin orta, pylorus (Şekil 21) bölgesinin ise zayıf reaksiyon gösterdiği gözlemlendi. Fundusun ise kardiya göre daha güçlü reaksiyon verdiği gözlemlendi. Fundus bezlerinin kardiya ve pylorus bezlerine göre daha güçlü boyandığı gözlemlendi.



Şekil 19. Kardiya. Lamina epitelyaliste nötr mukosubstans (mavi oklar); Kardiya bezleri (kırmızı oklar). PAS; Bar 100 µm.



Şekil 20. Fundus. Lamina epitelyaliste nötr mukosubstans (mavi oklar). Fundus bezleri (kırmızı oklar). PAS; Bar 100 µm.



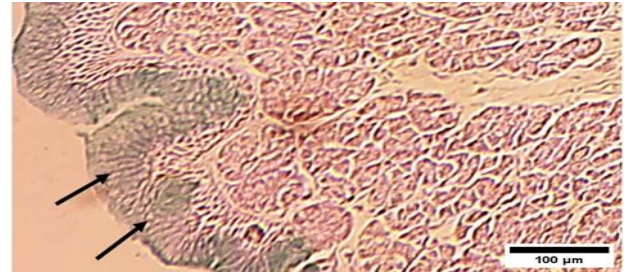
Şekil 21. Pylorus. Lamina epitelyaliste nötr mukosubstans (mavi oklar); Pylorus bezleri (kırmızı ok). PAS; Bar 100 µm.

3.2.9. O-sülfat esterli glikoproteinlerin belirlenmesi, (Alcian Blue pH 1.0)

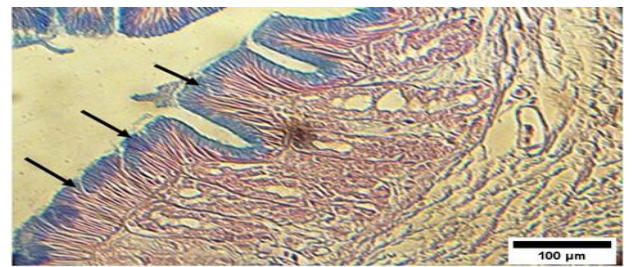
Kardiya, fundus ve pylorus bölgelerinde uygulanan AB pH 1.0 boyama yönteminde lamina epitelyalinin zayıf (+) reaksiyon verdiği gözlemlendi.

3.2.10. Nötr ve asidik mukosubstansın belirlenmesi (PAS/AB pH 2.5)

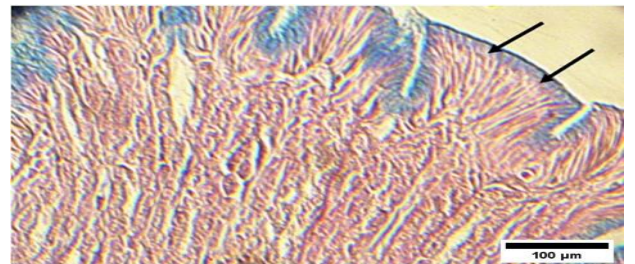
Kardiya bölgesinde (Şekil 22) reaksiyonun diğer bölgelere göre daha zayıf olduğu gözlemlendi. Fundus (Şekil 23) ve pylorus (Şekil 24) bölgelerinin ise lamina epitelyalinin uygulanan PAS/AB pH 2.5 kombine boyama yönteminde AB pH 2,5 boyanın PAS boyamaya göre daha baskın reaksiyon gösterdiği gözlemlendi.



Şekil 22. Kardiya. Lamina epitelyaliste nötr ve asidik mukosubstans (siyah oklar). PAS/AB pH 2.5; Bar 100 µm.



Şekil 23. Fundus. Lamina epitelyaliste nötr ve asidik mukosubstans (siyah oklar). PAS/AB pH 2.5; Bar 100 µm.



Şekil 24. Pylorus. Lamina epitelyaliste nötr ve asidik mukosubstans (siyah oklar). PAS/AB pH 2.5; Bar 100 µm.

Genel olarak uyguladığımız histokimyasal boyama yöntemleri karşılaştırıldığında midenin bütün bölgelerinde reaksiyon meydana geldiği gözlemlendi (Tablo 2).

Tablo 2. *Muraena helena* (Akdeniz müreni)'nin mide mukozasında histokimyasal boyama yöntemlerine karşı bölgelerdeki reaksiyon şiddetleri

Boyama metotları	Bölgeler		
	Kardiyaya	Fundus	Pilorus
AF	+++	++++	++++
KOH-PAS	+	+	+
AB pH 0.5	±	±	±
AB 0.3 M	-	-	-
AB 0.06 M	-	-	-
AB pH 2.5	++++	++++	++++
AF/AB pH 2.5	++++	++++	++++
PAS	±	++	+
AB pH 1.0	+	+	+
PAS/AB pH 2.5	++	+++	+++

Boyanma oranı: (-), reaksiyon vermedi; (±), çok zayıf; (+) zayıf; (++) orta; (+++), güçlü; (++++), çok güçlü.

Tablo 3. *Muraena helena* (Akdeniz müreni)'nin mide mukozasında yer alan bezlerin histokimyasal boyama yöntemlerine karşı reaksiyon şiddetleri

Boyama metotları	Bezler		
	Kardiyaya	Fundus	Pilorus
AF	++	++	+
KOH-PAS	++	++	++
AB pH 0.5	±	±	±
AB 0.3 M	±	±	±
AB 0.06 M	±	±	±
AB pH 2.5	±	±	±
AF/AB pH 2.5	++++	++++	++++
PAS	+	++	+
AB pH 1.0	±	±	±
PAS/AB pH 2.5	+	+	+

Boyanma oranı: (-), reaksiyon vermedi; (±), çok zayıf; (+) zayıf; (++) orta; (+++), güçlü; (++++), çok güçlü.

4. Tartışma ve Sonuç

4.1. Mide histolojisi

Farklı balık türlerinde yapılmış olan çalışmalarda midenin bölümleriyle ilgili olarak farklı görüşler öne sürülmüştür. Bazı araştırmacılar [16, 17], midenin sekal bölge-pilorik bölge veya kardiyaya-pilorus bölgeleri olmak üzere iki bölgeden oluştuğunu öne sürerken, diğer bazı araştırmacılar ise [18-23] midenin kardiyaya, fundus ve pilorus olarak üç bölgeden meydana geldiğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen histolojik bulgulara *Muraena helena*'nin midesinin üç farklı bölgeden meydana geldiği gözlemlenmiştir.

Diaz vd. [24] ve Aksoy [23] tarafından balıkların mide mukozalarının mukozal katlanmalara sahip olduğunu ve goblet hücresi içermeyen tek katlı prizmatik epitel ile örtülü olduğu ifade etmişlerdir. Bu çalışmada da *Muraena helena*'da mukozanın mide boyunca düzenli

katlanmalar yaptığı ve tek katlı prizmatik epitel ile örtülü olduğu gözlemlenmiştir.

Pedini vd. [25] ve Aksoy [23] bazı balık türlerinin mide bölgesinde lamina epitelyalisin hemen altında lamina propria ve submukoza tabakalarının yer aldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da *Muraena helena*'nın mide bölgesinde lamina epitelyalisin altında lamina propria ve submukoza tabakalarının yer aldığı belirlenmiştir. Bazı balık türlerinin mide mukozasında lamina propria ve submukoza bağ dokusu tabakasının arasında yoğun kollajen ipliklerden oluşan bir stratum kompaktum tabakasının yer aldığı belirtilmiştir [6, 23, 24, 26, 27.]. *Muraena helena*'nın mide mukozasında söz konusu bölgede bu tabakaya rastlanmamıştır.

Anarhichas lupus [28]; *Dentex dentex* [29] ve *Oncorhynchus mykiss* [23] türlerinin mide mukozaları üzerine yapılan çalışmalarda lamina propria ve submukoza bağ doku tabakaları içerisinde yoğun eozinofilik granüler hücrelerin yer aldıkları belirlenmiştir. Farklı balık türlerinin mide mukozalarının lamina propria ve submukoza bağ doku tabakaları içerisinde yerleşim gösteren mide bezlerinin lokalizasyonları hakkında farklı bulgular elde edilmiştir. Arellano vd. [21], *Solea senegalensis* türünde mide bezlerinin sadece fundus ve pilorus bölgelerinde yoğun olarak bulunduğunu, kardiyada ise bu bezlerin bulunmadığını ileri sürmüşlerdir. Fakat *Cynoscion guatucupa* [30] türünde mide bezlerinin, kardiyaya ve fundus bölgelerinde bulunduğu, pilorusda ise bulunmadığı bildirilmiştir. *Oncorhynchus mykiss*'te ise [23] mide bezlerinin sadece fundus bölgesinde bulunduğu kardiyaya ve pilorus bölgelerinde ise bulunmadığı bildirilmiştir. *Hippoglossus hippoglossus*'ta [1] mide bezlerinin mide mukozası boyunca yer aldığı bildirilmiştir. Bu çalışmada da bu görüşü destekleyen bulgular elde edilmiştir. Mide bezlerinin *Muraena helena* midesinin her üç bölgesinde de yer aldığı tespit edilmiştir.

Farklı balık türlerinde tunika muskularis katmanınının kalın sirküler ve dışta ince longitudinal olmak üzere iki katlı düz kas tabakasından meydana geldiği tespit edilmiştir [31, 32, 26, 23]. *Muraena helena*'da da tunika muskularisin aynı şekilde tabakalaştığı gözlemlendi.

4.2. Mide histokimyası

Umbrina cirrosa'da PAS/AB uygulamasında midede hem asidik hem de nötral mukosubstansın gözlemlendiği, asidik mukosubstansın yani AB boyanmasının daha baskın olduğu bildirilmektedir [31]. PAS/AB pH 2.5 boyaması sonucunda *Engraulis anchoita* [24] ve *Stizostedion lucioperca* [33] türlerinin kardiyaya, fundus ve pilorus bölgelerinde orta kuvvetlilikte reaksiyon gözlemlendiği bildirilmiştir. *Cyprinus carpio* [33] türünde ise oldukça güçlü reaksiyon olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ise kardiyada orta kuvvette fundus ve pilorusda ise güçlü kuvvette reaksiyon meydana geldiği gözlemlenmiştir.

KOH/PAS uygulamasında *Engraulis anchoita* [24] midesinde güçlü, *Micropogonias furnieri* [34] ve *Cyprinus carpio* [33] midesinde ise zayıf reaksiyon olduğu bildirilmiştir. *Stizostedion lucioperca* [33] türünde ise midede orta kuvvetlilikte bir reaksiyon olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada ise KOH/PAS kombine boya yönteminde *Muraena helena*'nın kardiya, fundus ve pilorus bölgelerinin zayıf reaksiyon gösterdiği gözlemlendi.

Streptomyces auratus mide epitel hücrelerinin sülfatlı asidik mukosubstans içerdiği ve AF boyama yöntemine karşı pozitif reaksiyon gösterdiği bildirilmiştir [35]. *Cyprinus carpio* ve *Stizostedion lucioperca*'da fundus ve pilorus epitel hücrelerinin sülfatlı asidik mukosubstans içeriğinin zayıf yoğunlukta olduğu bildirilmiştir [33]. Bu çalışmada ise *Streptomyces auratus* türü ile benzer şekilde *Muraena helena*' da AF boyama yöntemi ile kardiya, fundus ve pilorus bölgesinde ise çok güçlü reaksiyon verdiği gözlemlendi.

Chalcides chalcides midesinde AB pH 2.5 boyamasında reaksiyon gözlenmediği bildirilmiştir [36]. *Micropogonias furnieri* [34] midesinin tüm bölgelerinde asidik mukosubstans yoğunluğunun az olduğu, mide bölgeleri arasında yoğunluk açısından önemli bir farklılığın gözlenmediği, *Engraulis anchoita* [24] midesinde ise asidik mukosubstans yoğunluğunun orta düzeyde olduğu bildirilmiştir. *Stizostedion lucioperca* ve *Cyprinus carpio* [33] türlerinde midenin kardiya, fundus ve pilorus bölgelerinde güçlü reaksiyon olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada da *Muraena helena*'nın kardiya, fundus ve pilorus bölgelerinde *Stizostedion lucioperca* ve *Cyprinus carpio* [33] türleri ile benzer olarak AB pH 2.5 boyama yöntemi ile çok güçlü (++++) reaksiyon olduğu gözlemlendi.

Umbrina cirrosa [25] midesinde AB pH 1.0 uygulamasında oluşan reaksiyonun zayıf olduğu, *Engraulis anchoita*'da [24] ise reaksiyonun orta kuvvetlilikte olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada *Umbrina cirrosa* türü ile benzer olarak AB pH 1.0 uygulaması ile midenin üç bölümünde de zayıf (+) reaksiyon gözlemlendi.

Micropogonias furnieri [34]; *Stizostedion lucioperca*, *Cyprinus carpio* [33] ve *Umbrina cirrosa* [25] midelerinde AB pH 0.5 uygulamasında zayıf reaksiyon olduğu bildirilmiştir. *Micropogonias furnieri* [34] türünde AB pH 0.5 uygulamasında mide bölgeleri arasında önemli bir farklılığın olmadığı bildirilirken *Stizostedion lucioperca* [33] türünde yoğunluğun fundus bölgesinde daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada *Muraena helena*'da midenin üç bölgesinde de reaksiyonun çok zayıf (\pm) olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada *Muraena helena*' da midenin bölümlerinin histolojik yapısının farklılıklar gösterdiği gözlemlendi. Midenin kardiya, fundus ve pilorus olmak üzere üç kısımdan oluştuğu gözlemlendi. Mide epitelinin tek katlı prizmatik örtü epitelinden oluştuğu ve foveola

gastrikaların derinliğinin pilorusa doğru giderek arttığı gözlemlendi. Midenin bütün bölümlerinde mide bezlerine rastlandı. Mide mukozasındaki farklı karaktere sahip mukosubstansın yerleşimini tespit etmek için doku kesitlerine uygulanan boyama yöntemlerinde kardiya, fundus, pilorus bölgelerinin güçlü sülfatlı asidik, siyalik asitli, asidik, karboksilli asidik ve nötr mukosubstansa sahip olduğu tespit edildi. Çalışmamızda *Muraena helena*'nın midesinin bütün bölgelerinde lamina epitelyalisteki mukosubstans içeriğinin asidik karakterli olduğu ve asidik boyalarla lamina epitelyalis ve mide bezlerinin daha güçlü reaksiyon oluşturduğu gözlemlendi.

Teşekkür

Bu çalışma sürecinde çalışmalarına destek veren danışman hocam Doç. Dr. Mehmet Rüşü ÖZEN'e, laboratuvar olanaklarından faydalanmamı sağlayan değerli hocam Doktor Öğretim Üyesi Kenan ÇINAR'a ve araştırma materyali olan Akdeniz Müren balığının avlanması konusunda büyük desteğini gördüğüm değerli hocam Akdeniz Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet GÖKOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Etik Beyanı/Declaration of Ethical Code

Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.

Bu çalışmada kullanılan balıklar için gerekli olan izinler Tarım ve Orman Bakanlığı (15/08/2018 67852565-140.03.03- E.2410154; 30/01/2020 67852565-140.03.03- E.348181) ve Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (2020/1) alındı.

Kaynakça

- [1] Eschmeyer, W. N., Fong, J. D. 2015. Speciesbyfamily /subfamily (Erişim Tarihi: 26.09.2019). <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/speciesbyfamily.asp>. Electronic version accessed 31Mart 2015.
- [2] Sallami B., Bearez P., Salem M. B., 2016. Age and Growth of *Muraena helena* (Muraenidae) from the Northcoast of Tunisia. *Cybium* 40(2), 155-161.
- [3] Jimenez, S., Schoenhut, S., Lozano, I. J., Gonzales, J. A., Sevilla R. G., Diez, A., Bautista, J. M. 2007. Morphological, Ecological, and Molecular Analyses Separate *Muraena augusti* from *Muraena helena* As A Valid Species. *American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Copeia* 1, 101-113.
- [4] Matic-Skoko, S., Tutman, P., Petric, M., Skaramuca, D., Lusicic, D., Dikic, D., Skaramuca, B. 2011.

- Mediterranean morayeel *Muraena helena* (Pisces: Muraenidae): Biological Indices for Life History, Aquatic Biology, 13, 275-284.
- [5] Demirağ, Ö. 2013. Su Altında Ön Yargı: Akdeniz Mürenleri. [http2://dalalim.com/akdeniz-murenleri/](http://dalalim.com/akdeniz-murenleri/) (Erişim tarihi. 24.12.2018).
- [6] Bosi, G., DiGiancamillo, A., Arrighi, S., Domeneghini, C. 2004. An Immunohistochemical Study on The Neuroendocrine System In The Alimentary Canal of The Brown Trout, *Salmo trutta*, L., 1758. General and Comparative Endocrinology, 138(2), 166-81.
- [7] Bancroft, J. D. Stevens, A. 1996. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, Medical Div. Longman Group Ltd. Edinburgh, London and New York. 436 p.
- [8] Culling, C. F. A., Reid, P. E., Dunn, W. L., 1976. A new histochemical method for the identification and visualization of both side chain acylated and noacylated sialic acids. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 24, 1225-1230.
- [9] Luna, L. 1982. Manual of Histologic Staining Methods. American Registry of Pathology, McGraw-Hill Co. New York. p. 251.
- [10] Gomori, G. 1952. Gomori's Aldehyde Fuchsin stain. In: Cellular Pathology Technique. Butterworths, p. 238-240.
- [11] Lev, R., Spicer, S. S. 1964. Specific Staining of Sulphate Groups with Alcian Blue at low pH. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 12, 309.
- [12] Scott, J. E., Dorling, J. 1965. Differential Staining of Acid Glycosaminoglycans (Mucopolysaccharides) by Alcian Blue in Salt Solutions. Histochemie, 21, 277- 285.
- [13] Mayer, S. 1960. Aldehyde Fuchsin/Alcian Blue. In: Cellular Pathology Technique, Butterworths, p. 233.
- [14] McManus, J. F. A. 1948. Histological and Histochemical Uses of Periodic Acid. Stain Technology, 23, 99-108.
- [15] Mowry, R. W. 1956. Alcian Blue Techniques for The Histochemical Study of Acidic Carbohydrates. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 4, 407-408.
- [16] Al-Hussaini, A. H., Kholy, A.A., 1953. On The Functional Morphology of The Alimentary Tract of Some Omnivorous Fish. Proceedings of the Egyptian Academy of Sciences, 4, 17-39.
- [17] Murray, H. M., Wright, G. M., Goff, G. P. 1994. A Comparative Histological and Histochemical Study of The Stomach from Three Species of Pleuronectid, The Atlantic Halibut, *Hippoglossus hippoglossus*, The Yellowtail Flounder, *Pleuronectes ferruginea*, and The Winter Flounder, *Pleuronectes americanus*. Canadian Journal of Zoology, 72, 1199-1210.
- [18] Caceci, T., El-Haback, H. A., Smith, S. A., Smith, B. J., 1997. The Stomach of *Oreochromis niloticus* Has Three Regions. Journal of Fish Biology, 50 (5), 939-952.
- [19] Çınar, K., Diler, A., Boyacı, Ö., Bilgin, F. 1997. Histological Structure and Histochemical Characteristics of the Stomach of the *Salmo trutta macrostigma* and *Oncorhynchus mykiss*. Turkish Journal of Zoology, 21, 503-508.
- [20] Albrecht, M. P., Ferreira, M. F. N., Caramaschi, E. P. 2001. Anatomical Features and Histology of the Digestive Tract of Two Related Neotropical Omnivorous Fishes (Characiformes; Anostomidae). Journal of Fish Biology, 58, 419-430.
- [21] Arellano, J. M., Storch, V., Sarasquete, C. 2001. Histological and Histochemical Observations in The Stomach of The Senegal Sole. Histology and Histopathology, 16, 511-521.
- [22] Suiçmez, M., Ulus, E. 2005. A Study of the Anatomy, Histology and Ultrastructure of the Digestive Tract of *Orthrias angorae*, Steindachner, 1897. Foliabiologica (Kraków), 53(1-2), 95-100.
- [23] Aksoy, A. 2009. Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) sindirim kanalının postnatal gelişimi ve endokrin hücre kompozisyonu üzerinde histolojik, histokimyasal ve immunohistokimyasal çalışmalar. SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 101 s, Isparta.
- [24] Diaz, A. O., Garcia, A. M., Devincenti, C. V., Goldemberg, A. L. 2003. Morphological and Histochemical Characterization of the Mucosa of the Digestive Tract in *Engraulis anchoita*. Anatomia Histologia Embryologia, 32, 341-346.
- [25] Pedini, V., Scocco, P., Radaelli, G., Fagioli, O., Ceccarelli, P., 2001. Carbohydrate Histochemistry of The Alimentary Canal of The Shi Drum, *Umbrina cirrosa* L. Anatomia Histologia Embryologia, 30, 345-349.
- [26] Rodríguez, A., Gisbert, E., Rodríguez, G., Castelló-Orvay, F. 2005. Histopathological Observations in European Glass Eels (*Anguilla anguilla*) Reared Under Different Diets and Salinities. Aquaculture, 244(1-4), 203- 214.
- [27] Chatchavalvanich, K., Marcos, R., Poonpirom, J., Thongpan, A., Rocha, E. 2006. Histology of The Digestive Tract of The Freshwater Stingray *Himantura signifer* Compagno and Roberts, 1982 (Elasmobranchii, Dasyatidae). Anatomy and Embryology, 211(5), 507-518.
- [28] Hellberg, H., Bjerkas, I. 2000. The Anatomy of The Oesophagus, Stomach and Intestine in Common Wolffish (*Anarchichas lupus* L.): A Basis for

Diagnostic Work and Research. Acta Veterinaria Scandinavica, 41, 283-297.

- [29] Carrasson, M., Grau, A., Dopazo, L. R., Crespo, S., 2006. A Histological, Histochemical and Ultrastructural Study of The Digestive Tract of *Dentex dentex* (Pisces, Sparidae). Histology and Histopathology, 21(4-6), 579-593.
- [30] Díaz, A. O., Garcia, A. M., Figueroa, D. E., Goldemberg, A. L. 2008. Glycoconjugates in the mucosa of the digestive tract of *Cynoscion guatucupa*. A histochemical study. Acta Histochemica, 110, 76-85.
- [31] Grau, A., Crespo, S., Sarasquete, M. C., González de Canales M. L. 1992. The digestive tract of the amberjack *Seriola dumerili*, Risso: Light and Scanning lectronmicroscope Study. Journal of FishBiology, 41, 287-303.
- [32] Morrison, C. M., Wright, J. R. 1999. A Study of The Histology of The Digestive Tract of The *Nile Tilapia*. Journal of Fish Biology, 54, 597-606.
- [33] Şenol, N. 2009. Sazan (*Cyprinus carpio*) ve Sudak (*Stizostedion lucioperca*) Balıklarında Gastrointestinal Kanahın Histokimyasal Yapısı ve Bazı Peptidlerin Lokalizasyonu. SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD, Doktora Tezi 76 s. Isparta.
- [34] Diaz, A. O., Garcia, A. M., Figueroa, D. E., Goldemberg, A. L. 2008. The mucosa of digestive tract in *Micropogonias furnieri*: A light and electron microscope approach. Anatomia Histologia Embryologia, 37, 251-256.
- [35] Elbal, M. T., Agulleiro, M. T. 1986. An histochemical and ultrastructural study of the gut of *Sparus auratus* (Teleostei). Journal of Submicroscopic Cytology, 18, 2, 335-347.
- [36] Ferri, D., Liquori, G.E., Scillitani, G. 1999. Morphological and Histochemical Variations of Mucous and Oxynticopepticcells in the Stomach of the Seps, *Chalcides chalcides*. Journal of Anatomy, 194, 71-77.

Bu çalışmada kullanılan balıklar için gerekli olan izinler Tarım ve Orman Bakanlığı (15/08/2018 67852565-140.03.03- E.2410154; 30/01/2020 67852565-140.03.03- E.348181) ve Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (2020/1) alındı.