

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***AEROMONAS HYDROPHILA* İLE GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDA
(*ONCORHYNCHUS MYKISS* WALBAUM, 1792) OLUŞTURULAN
ENFEKSİYONUN PATOLOJİK YÖNDEN ARAŞTIRILMASI**

Sibel ŞİMŞEK KÖPRÜCÜ

E.C. YÜKSEK
DOKÜMANLAMA

114398

DOKTORA TEZİ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI

ELAZIĞ

2001

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***AEROMONAS HYDROPHILA* İLE GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDA
(*ONCORHYNCHUS MYKISS* WALBAUM, 1792) OLUŞTURULAN
ENFEKSİYONUN PATOLOJİK YÖNDEN ARAŞTIRILMASI**

Sibel ŞİMŞEK KÖPRÜCÜ

DOKTORA TEZİ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu Tez **28.09.2004** Tarihinde, Aşağıda Belirtilen Juri Tarafından Oybirliği/ ~~Oyçokluğu~~
İle Başarılı/ Başarısız Olarak Değerlendirilmiştir.



Prof. Dr. Mustafa SARIEYYÜPOĞLU
Danışman

Prof. Dr. Selçuk SEÇER
Üye



Prof. Dr. Harun ÖZER
Üye

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ÖZET**DOKTORA TEZİ**

***AEROMONAS HYDROPHILA* İLE GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDA (*ONCORHYNCHUS MYKISS* WALBAUM, 1792) OLUŞTURULAN ENFEKSİYONUN PATOLOJİK YÖNDEN ARAŞTIRILMASI**

Sibel ŞİMŞEK KÖPRÜCÜ

Fırat Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı

2001, Sayfa: 80

Bu araştırmada, toplam 80 adet gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanıldı. Bir kontrol ve üç deney grubu oluşturuldu. Deney gruplarındaki balıklar *Aeromonas hydrophila* ile solungaçlarına sürme, intraperitoneal ve intramusküler enjeksiyon yollarıyla enfekte edildi.

Histopatolojik olarak, üç deney grubunda da solungaçlarda hiperemi ve hemoraji; böbreklerde parankim dejenerasyonu, nekroz, bowman kapsülü epitelyumunda desquamasyon; karaciğerde yağ dejenerasyonu, nekroz ve kupffer hücre aktivasyonu; kaslarda ödem, dermiste hiperemi ve kollagen bantlarda lökosit infiltrasyonu ve konjesyon belirlendi. Mide, bağırsaklar ve pankreasta ise histopatolojik herhangi bir bulguya rastlanılmadı.

İmmunohistokimyasal olarak, kontrol ve deney gruplarında farklılık gözlenmedi. Glukagon immunoreaktivitesi pankreas ve ince bağırsakta; insülin immunoreaktivitesi pankreasta; substans P immunoreaktivitesi pilorik mide ve ince bağırsakta; gastrin

immunoreaktivitesi pilorik midede tespit edildi. Calbindin immunoreaktivitesi ise incelenen hiçbir organda belirlenemedi.

Elektron mikroskopik incelemelerinde ise, karaciğer hepatositlerinde büyük yağ damlacıkları, endoplazmik retikulumda dejenerasyon, membransal yapılar ve organelden yoksun açık boyanmış alanlar; iskelet kaslarında miyofibriller arasında ayrılmalar, sarkolemma altında miyofibrillerden yoksun alanlar, yer yer belirgin olmayan A, I ve Z bantları; böbrek tubulus epitel hücrelerinde büyük inklüzyonlar, membransal yapılar ve hücrenin bazal kısmında vakuol benzeri yapılar gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Gökkuşuğı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), *Aeromonas hydrophila*, histopatoloji, immunohistokimya, elektron mikroskop.

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF PATHOLOGY OF RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS* WALBAUM, 1792) INFECTED WITH *AEROMONAS HYDROPHILA*

Sibel ŞİMŞEK KÖPRÜCÜ

Fırat University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Aquaculture

2001, Page: 80

A total of eighty rainbow trout were used in this study. Three experimental and one control groups were made from those fishes. Experimental groups were infected with *Aeromonas hydrophila* by smearing on the gills, intraperitoneal and intramuscularly injections of bacterium.

Hyperemia and hemorrhage in the gills, paranchima degeneration, necrose, desquamation in epithelium of Bowman capsule in the kidneys, hyperemia, fatty degeneration, necrose and activation of kuppfer cells in the liver, edema, hyperemia in dermis, congestion, leucocytic infiltration in collagen bundles of dermis and skeletal muscles were observed in all experimental groups. No histopathologic change was seen in gastrointestinal organs of the experimental groups.

Immunohistochemical observation of gut hormones showed that no difference in between control and experimental groups. Glucagon immunoreactivity was seen in pancreas and small intestine. Insulin immunoreactivity was only localized in pancreas. Substans P immunoreactivity was seen in the pyloric region of stomach and small intestine.

Gastrin immunoreactivity was detected only localized in pyloric stomach. Calbindin immunoreactivity was not seen any organs examined.

In electron microscopic investigation; large lipid droplets, degeneration in the endoplasmic reticulum, membraneous bodies and light staining area were had not have any organelles were seen in the hepatosit of liver. Separation of myofibrils, lost of myofibrils under the sarcolemma were seen in the skeletal muscles. A, I and Z bands were not seen clearly in the skeletal muscles. Large inclusions and some membraneous bodies and large structures as vacuols near the basal parts of cells were seen in the kidney.

Key Words: Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aeromonas hydrophila*, histopathology, immunohistochemistry, electron microscopy.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hazırlanması ve yürütülmesinde değerli yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Mustafa SARIEYYÜPOĞLU'na ve ikinci tez danışmanım Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan sayın Yrd. Doç. Dr. Berrin GENCER TARAKÇI'ya, sayın Dr. Mine YAMAN'a, F.Ü. Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan sayın Prof. Dr. Harun ÖZER'e, sayın Yrd. Doç. Dr. İhsan YAMAN'a, F.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na, F.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan sayın Doç. Dr. Aysel KÜKNER'e, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Bölümü'nden sayın Prof. Dr. Selçuk SEÇER'e, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan sayın Doç. Dr. Candan ÖZOĞUL'a, sayın Elvan SOLMAZ'a, F.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'na, F.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Dekanlığı'na, F.Ü. Su Ürünleri Fakültesi'nden sayın Doç. Dr. Dursun ŞEN'e, sayın Dr. Kenan KÖPRÜCÜ'ye, ayrıca Cip Balık Üretim Tesisi personeline ve çalışmayı maddi yönden destekleyen Fırat Üniversitesi Araştırma Fonu (FÜNAF)'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ŞEKİLLER LİSTESİ	IX
TABLolar LİSTESİ	XVI
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	3
2.1. Gökkuşaklı alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i> Walbaum, 1792).....	3
2.2. <i>Aeromonas hydrophila</i>	4
2.2.1. Etkenin Virulens Faktörleri.....	5
2.2.2. <i>Aeromonas hydrophila</i> ile Enfeksiyonun Meydana Gelişi.....	6
2.2.3. Enfeksiyonun Patogenezi.....	7
2.3. Mide-Bağırsak ve Pankreatik Hormonlar.....	9
2.3.1. Mide-Bağırsak Hormonları.....	9
2.3.1.1. Gastrin.....	10
2.3.1.2. Substans P.....	11
2.3.2. Pankreatik Hormonlar.....	12
2.3.2.1. Glukagon ve Enteroglukagon.....	13
2.3.2.2. İnsülin.....	14
2.3.2.3. Calbindin-D 28 k.....	14
3. MATERYAL VE METOT.....	15
3.1. Materyal	15
3.1.1. Gökkuşaklı Alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	15
3.1.2. <i>Aeromonas hydrophila</i>	15
3.1.3. Kullanılan Malzemeler.....	16
3.1.4. Deney Havuzları.....	16
3.2. Metot	17
3.2.1. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın Balıklara Uygulanış Şekilleri.....	17
3.2.2. Doku Prosedürleri.....	18
3.2.3. Işık Mikroskopik ve İmmunohistokimyasal Prosedürler.....	18

3.2.3.1. Işık Mikroskopik Prosedür.....	18
3.2.3.2. İmmunohistokimyasal Prosedür.....	19
3.2.3.2.1. Avidin-Biotin Horseradish Peroksidaz Kompleks (ABC) Tekniği.....	19
3.2.3.2.2. Peroksidaz Anti Peroksidaz (PAP) Tekniği.....	19
3.2.4. Elektron Mikroskop Prosedürü.....	20
4. SONUÇLAR.....	21
4.1. Klinik Bulgular.....	23
4.1.1. Solungaçlarına Sürme Yolu İle Enfekte Edilen Alabalıklar.....	23
4.1.2. İntraperitoneal Enjeksiyon Yolu İle Enfekte Edilen Alabalıklar.....	24
4.1.3. İntramüsküler Enjeksiyon Yolu İle Enfekte Edilen Alabalıklar.....	24
4.2. Histopatolojik Bulgular.....	28
4.2.1. Işık Mikroskopik Bulgular.....	28
4.2.1.1. Kontrol Grubu.....	28
4.2.1.2. Solungaçlarına Sürme Yolu İle Enfekte Edilen Alabalıklar.....	34
4.2.1.3. İntraperitoneal Enjeksiyon Yolu İle Enfekte Edilen Alabalıklar.....	36
4.2.1.4. İntramüsküler Enjeksiyon Yolu İle Enfekte Edilen Alabalıklar.....	39
4.2.2. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	41
4.2.2.1. Kontrol Grubu.....	41
4.2.2.1.1. Glukagon.....	41
4.2.2.1.2. Gastrin.....	41
4.2.2.1.3. Substans P.....	42
4.2.2.1.4. İnsülin.....	42
4.2.2.1.5. Calbindin.....	42
4.2.2.2. Deney Grupları.....	45
4.2.3. Elektron Mikroskopik Bulgular.....	52
4.2.3.1. Kontrol Grubu.....	52
4.2.3.2. Deney Grupları.....	59
5. TARTIŞMA.....	64
KAYNAKLAR.....	70

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 3.1. Deney grupları için kurulan düzeneğin görünüşü.....	17
Şekil 4.1. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıkların solungaçlarına sürülmesi.....	22
Şekil 4.2. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi.....	22
Şekil 4.3. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi.....	23
Şekil 4.4. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyonu sonucunda anüs ve yüzgeçlerde görülen hemoraji.....	25
Şekil 4.5. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyonu sonucunda karaciğerde oluşan nekrotik odaklar ve iç organlardaki hemorajiler.....	26
Şekil 4.6. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyonu sonucunda deride meydana gelen hemorajili lezyon.....	26
Şekil 4.7. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyonu sonunda deride gözlenen kahverengimsi siyah lekelenmeler.....	27
Şekil 4.8. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyonu sonrasında deride görülen renk açılmaları.....	27
Şekil 4.9. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyonu sonrasında deri ve iç organlardaki hemorajiler.....	28
Şekil 4.10. Kontrol grubu alabalıklarından alınan mide kesiti, H&E, X100. a. tunika mukoza, b. tunika müskülaris, c. tunika seroza.....	30
Şekil 4.11. Kontrol grubu alabalıklardan alınan bağırsak kesiti H&E, X100. a. tunika mukoza, b. tunika müskülaris, c. tunika seroza.....	31
Şekil 4.12. Kontrol grubu alabalıklardan alınan karaciğer kesiti, H&E, X200. a. sinuzoidler, b. hepatositler.....	31

Şekil 4.13. Kontrol grubu alabalıklardan alınan pankreas kesiti, H&E, X200.	
a. pankreatik asinar hücreleri, b. yağ dokusu.....	32
Şekil 4.14. Kontrol grubu alabalıklardan alınan solungaç kesiti, Toludine blue, X200.	
a. kondrositler, b. mukus hücresi, c. plaster hücresi.....	32
Şekil 4.15. Kontrol grubu alabalıklarından alınan kas kesiti, Toludine blue, X200.	
a. enine kas fibrilleri, b. kas hücresi çekirdeği.....	33
Şekil 4.16. Kontrol grubu alabalıklarından alınan böbrek kesiti, Toludine blue, X200.	
a. tubulus, b. intersititiel bölge.....	33
Şekil 4.17. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıkların solungaçlarına sürme yolu ile enfekte edilmesi sonucunda solungaçların primer ve sekonder lamellalarında hemoraji, H&E, X200.....	34
Şekil 4.18. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıkların solungaçlarına sürme yolu ile enfekte edilmesi sonucunda böbrek tubulus epitellerindeki parankim dejenerasyonu ve nekrozu, H&E, x200.....	35
Şekil 4.19. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıkların solungaçlarına sürme yolu ile enfekte edilmesi sonucunda karaciğer hepatositlerindeki a. nekroz, b. yağ dejenerasyonu, H&E, X200.....	35
Şekil 4.20. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda kasın intersitisyel tabakasındaki mononükleer hücre infiltrasyonu, H&E, X200.....	36
Şekil 4.21. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda karaciğerde görülen a. kupffer hücre aktivasyonu, b. hiperemi, H&E, X200.....	37
Şekil 4.22. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda karaciğer hepatositlerindeki diffuz nekroz alanları, H&E, X200.....	37
Şekil 4.23. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda böbrek tubulus epitellerindeki a. parankim dejenerasyonu, b. desquamasyon, H&E, X200.....	38

Şekil 4.24. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda böbrek tubulus epitellerindeki hyalin damlacıkları, Toludine blue, X200.....	38
Şekil 4.25. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda myofibriller arasındaki yaygın ödem, H&E, X200.....	39
Şekil 4.26. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda karaciğer hepatositlerindeki kupffer hücre aktivasyonu, H&E, X200.....	40
Şekil 4.27. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda karaciğer hepatositlerindeki geniş nekroz alanları, H&E, X200.....	40
Şekil 4.28. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda böbreklerin tubulus epitellerindeki dejenerasyon ve nekroz, H&E, X200.....	41
Şekil 4.29. Kontrol grubu alabalıkların ince bağırsağındaki glukagon-immunoreaktif (IR) hücreleri, İHK, X400.....	42
Şekil 4.30. Kontrol grubu alabalıkların pankreas langerhans adacıklarında bulunan glukagon IR hücreleri, İHK, X400.....	43
Şekil 4.31. Kontrol grubu alabalıkların pilorik midesindeki gastrin IR hücreleri, İHK, X400.....	43
Şekil 4.32. Kontrol grubu alabalıkların pilorik midesindeki substans P IR hücreleri, İHK, X400.....	44
Şekil 4.33. Kontrol grubu alabalıkların ince bağırsağındaki substans P IR hücreleri, İHK, X400.....	44
Şekil 4.34. Kontrol grubu alabalıkların pankreasındaki insülin IR hücreleri, İHK, X400.....	45

Şekil 4.35. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıkların solungaçlarına sürme yolu ile enfekte edilmesi sonucunda ince bağırsaktaki glukagon IR hücreleri, İHK, X400.....	46
Şekil 4.36. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda ince bağırsaktaki glukagon IR hücreleri, İHK, X400.....	46
Şekil 4.37. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda ince bağırsaktaki glukagon IR hücreleri, İHK, X400.....	47
Şekil 4.38. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıkların solungaçlarına sürme yolu ile enfekte edilmesi sonucunda pankreasın langerhans adacıklarındaki glukagon IR hücreleri, İHK, X400.....	47
Şekil 4.39. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda pankreasın langerhans adacıklarındaki glukagon IR hücreleri, İHK, X400.....	48
Şekil 4.40. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda pankreasın langerhans adacıklarındaki glukagon IR hücreleri, İHK, X400.....	48
Şekil 4.41. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıkların solungaçlarına sürme yolu ile enfekte edilmesi sonucunda pilorik midedeki gastrin IR hücreleri, İHK, X400.....	49
Şekil 4.42. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda pilorik midedeki gastrin IR hücreleri, İHK, X400.....	49
Şekil 4.43. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda pilorik midedeki gastrin IR hücreleri, İHK, X400.....	50

Şekil 4.44. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıkların solungaçlarına sürme yolu ile enfekte edilmesi sonucunda pankreasın langerhans adacıklarındaki insülin IR hücreleri, İHK, X400.....	50
Şekil 4.45. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda pankreasın langerhans adacıklarındaki insülin IR hücreleri, İHK, X200.....	51
Şekil 4.46. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda pankreasın langerhans adacıklarındaki insülin IR hücreleri, İHK, X200.....	51
Şekil 4.47. Kontrol grubu alabalıkların karaciğer epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. nukleus, b. nukleolus, c. hücreler arası bağlantı, d. granüllü endoplazmik retikulum.....	53
Şekil 4.48. Kontrol grubu alabalıkların karaciğer epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X7000. a. mitokondrium, b. granüllü endoplazmik retikulum.....	54
Şekil 4.49. Kontrol grubu alabalıkların kas hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. A bandı, b. I bandı, c. Z bandı, d. sarkoplazma retikulum sisternaları, e. mitokondrium.....	54
Şekil 4.50. Kontrol grubu alabalıkların böbrek tubulus epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. nukleus, b. nukleolus, c. mitokondrium, d. granülsüz endoplazmik retikulum.....	55
Şekil 4.51. Kontrol grubu alabalıkların böbrek tubulus epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. mitokondrium, b. bazal membran, c. nukleus.....	55
Şekil 4.52. Kontrol grubu alabalıkların mide prizmatik epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. nukleus, b. endoplazmik retikulum, c. golgi kompleksi.....	56

- Şekil 4.53. Kontrol grubu alabalıkların mide bez epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. nukleus, b. nukleolus, c. salgı granülleri..... 56
- Şekil 4.54. Kontrol grubu alabalıkların mide bez epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. granülsüz endoplazmik retikulum, b. mitokondriyum, c. salgı granülleri..... 57
- Şekil 4.55. Kontrol grubu alabalıkların bağırsak prizmatik epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. mitokondriyum, b. dezmozom, c. mikrovillus..... 57
- Şekil 4.56. Kontrol grubu alabalıkların solungaç plaster hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. nukleus, b. mitokondriyum, c. çift katlı zar, d. granüllü endoplazmik retikulum..... 58
- Şekil 4.57. Kontrol grubu alabalıkların solungaç kondrosit hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. nukleus, b. mitokondriyum, c. granüllü endoplazmik retikulum..... 58
- Şekil 4.58. Kontrol grubu alabalıkların solungaçlarındaki eritrosit hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. nukleus, b. mitokondriyum..... 59
- Şekil 4.59. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıkların solungaçlarına sürme, intraperitoneal ve intramüsküler enjeksiyon yolları ile enfekte edilmesi sonucunda alabalıklardan alınan karaciğerin sinuzoidlerindeki yağ damlacığı X3000..... 60
- Şekil 4.60. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıkların solungaçlarına sürme, intraperitoneal ve intramüsküler enjeksiyon yolları ile enfekte edilmesi sonucunda alabalıklardan alınan karaciğer epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. yağ damlacıkları, b. membransal yapılar, c. organelden yoksun açık boyanmış alanlar..... 61

- Şekil 4.61. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıkların solungaçlarına sürme, intraperitoneal ve intramüsküler enjeksiyon yolları ile enfekte edilmesi sonucunda alabalıkların kas hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. miyofibriller arasındaki açılmalar, b. sarkolemma altındaki miyofibrillerden yoksun alanlar, c. sarkoplazma retikulum sisternalarındaki genişleme..... 61
- Şekil 4.62. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıkların solungaçlarına sürme, intraperitoneal ve intramüsküler enjeksiyon yolları ile enfekte edilmesi sonucunda alabalıkların kas hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X7000. a. sarkolemma altında miyofibrillerden yoksun alanlar, b. A, I ve Z bantlarındaki solgunluk..... 62
- Şekil 4.63. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıkların solungaçlarına sürme, intraperitoneal ve intramüsküler enjeksiyon yolları ile enfekte edilmesi sonucunda alabalıkların böbrek tubulus epitel hücreesindeki dev inklüzyonların elektron mikroskopik görünümü, X3000..... 62
- Şekil 4.64. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıkların solungaçlarına sürme, intraperitoneal ve intramüsküler enjeksiyon yolları ile enfekte edilmesi sonucunda alabalıkların böbrek tubulus epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. membransal yapılar, b. bazalde iri vakuoller..... 63

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 4.1. <i>A. hydrophila</i> 'nın morfolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	21



1. GİRİŞ

Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde son yıllarda gerek kaynak sularında yapılan kültür balıkçılığı ve gerekse de baraj göllerinde gerçekleştirilen kafes balıkçılığı, yöre insanının protein gereksinimini önemli ölçüde karşılamakta ve iş sahası bakımından da ülke ekonomisi için yadsınamayacak bir kaynak oluşturmaktadır.

Gelişen bu yoğun balık yetiştiriciliği hastalık sorunlarını da beraberinde getirmektedir. Balıklar, içerisinde bulundukları ortam nedeniyle sürekli olarak mikroorganizmalarla temas halindedir. Bu nedenle, bakteriyel hastalıklar yoğun balık yetiştiriciliğinin yapıldığı işletmelerde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu hastalıkların oluşmasında balığın doğal direncini kıran etkenler önemli rol oynamaktadır. Suyun fiziksel ve kimyasal kalitesindeki bozukluklar, dengesiz veya yetersiz beslenme ve strese neden olabilecek çeşitli faktörler bakteriyel hastalıkların ortaya çıkması için zemin hazırlamaktadır.

Balıklarda hastalık oluşturan bakteriyel etkenlere *Aeromonas*, *Pseudomonas* ve *Staphylococcus*'lar örnek olarak verilebilir.

Aeromonas hydrophila, Vibrionaceae familyasına dahil bir patojen olup farklı balık türleri üzerine olan etkisi mikrobiyolojik, histopatolojik ve fizyopatolojik yönlerden ele alınmıştır. Örneğin; *A. hydrophila*'nın *Carassius auratus* balığı üzerine olan etkisi fizyopatolojik (Brenden ve Huizinga, 1986), *Mugil cephalus* (Soliman ve diğ., 1989), *Ictalurus punctatus* (Ventura ve Grizzle, 1988; Grizzle ve Kiryu, 1993), *Cyprinus carpio* (Erer, 1983; Miyazaki ve Kaige, 1986; Timur, 1986; Ahmed ve diğ., 1995; Şimşek ve diğ., 1997), *Stizostedion lucioperca* (Timur ve Timur, 1985) ve *Clarias batrachus* (Angka, 1990) balıklarına etkisi ise histopatolojik ve mikrobiyolojik yönlerden araştırılmıştır.

Gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) *A. hydrophila*'nın oluşturduğu enfeksiyonun immünohistokimya, ışık ve elektron mikroskoplarına dayalı yapılmış komplike çalışmalara şimdiye kadar rastlanılmamıştır. Sadece bazı araştırmacılar gökkuşağı alabalığında bu etkenin virülensini, yayılmasını, meydana gelen enfeksiyonun tedavi yollarını incelemiş ve bazı organlara olan etkisini histopatolojik yönden ele almışlardır (Baran ve diğ., 1981; Lallier ve diğ., 1984; Peters ve diğ., 1988; Santos ve diğ., 1988; Candan, 1990; Paniagua ve diğ., 1990; Mateos ve diğ., 1992).

Bu araştırmada; *Aeromonas hydrophila*'nın deneysel olarak gökkuşağı alabalığına (*O. mykiss*) uygulanarak, enfeksiyonun inkübasyon süresi, prognozu, klinik semptomları, etkenin balığın bazı organlarına (karaciğer, böbrek, solungaç, kas, mide, bağırsak ve pankreas) olan etkisinin ışık ve elektron mikroskop düzeylerinde gözden geçirilmesi, etkenin sindirim kanalı (substance P, gastrin, calbindin, glukagon içeren endokrin hücreleri) ve pankreastaki (insülin ve glukagon içeren endokrin hücreleri) endokrin hücrelerine olan etkisinin ise immunohistokimyasal yönden ölkemizde ilk kez incelenmesi amaçlanmıştır.



2. LİTERATÜR BİLGİSİ

Bu çalışmada gökkuşağı alabalığında bir bakterinin deneysel olarak kullanımı ve oluşabilecek enfeksiyonun incelenmesi hedeflendiğinden, literatür bilgisinde gökkuşağı alabalığı, *Aeromonas hydrophila*, enfeksiyonun patogenesi ve immunohistokimyasal (İHK) konulara yer verilmiştir.

2.1. Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)

Salmonidae familyasına ait olan gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ince-uzun yapılı olup, sırt yüzgeci ile kuyruk yüzgeci arasında bir yağ yüzgeci taşırlar. Karnivor olan bu balıklar, soğuk, berrak, bol oksijenli akarsu, kaynak suları ve göllerde yaşarlar. Renk değişken olup, sırt koyu yeşilden kahve yeşile kadar değişir. Yanlar daha açık, karın gümüş beyazlığındadır. Baş, vücudun yan tarafları, sırt, kuyruk ve yağ yüzgeçlerinde birçok siyah benekler bulunur. Vücutlarının yan taraflarında gökkuşağını andıran renkli bir bant taşımasıyla bu adı almıştır. Cinsel olgunluğa 2-3 yaşında ulaşırlar. Uygun kültür koşullarında 1 yılda 250 g ortalama ağırlığa ulaşan bu balıklar 12 yıl kadar yaşayabilirler ve 15 kg ağırlık ile 150 cm boya kadar büyürler. Kuzey Amerika kökenli olan gökkuşağı alabalığı, ülkemiz doğal sularında bulunmamasına rağmen, kültür şartlarına kolay adaptasyonu ve hızlı büyüme oranı nedeniyle ithal edilmiştir. İçsu balıkları içerisinde ticari değeri yüksek olan, en lezzetli, sevilen, dünyada ve ülkemizde yetiştiriciliği en yaygın olarak yapılan alabalık türüdür. (Çelikkale, 1988; Ekingen, 1988).

Giderek yaygınlaşan balık yetiştiriciliği birçok sorunu da beraberinde getirmektedir. Bunlar arasında hastalıklar önemli bir yer tutmaktadır. Hemen hemen tüm canlılarda özellikle de balıklarda çeşitli semptomlar oluşturarak büyük ekonomik kayıplara neden olması ile bilinen bakteri türlerinden birisi de *A. hydrophila*'dır (Cipriano ve diğ., 1984; Austin ve Austin, 1987).

2.2. *Aeromonas hydrophila*

Vibrionaceae familyasına ait olan *Aeromonas* genusu ilk defa 1890 yılında *Bacillus punctatus* olarak isimlendirilmiştir. Sonraki yıllarda çeşitli kaynaklardan izole edilen etkenlere *Bacillus hydrophilus*, *Aerobacter liquefaciens*, *Achromobacterium punctatum* ve *Proteus hydrophilus* gibi adlar verilmiştir. Etken ilk kez 1943 yılında tek bir isim altında *A. hydrophila* olarak adlandırılmıştır (Arda ve diğ., 1997). Daha sonra, patojen aeromonaslar; *A. hydrophila* ve *A. sobria* şeklinde 2 farklı tür altında yeniden sınıflandırılmıştır (Popoff ve Vernon, 1976). Günümüzde aeromonas genusu iki temel gruba ayrılmaktadır. Psikrofilik ve hareketsiz olan suşlar *Aeromonas salmonicida*, “hareketli aeromonaslar” grubu olarak bilinen, mezofilik ve hareketli olan suşlar ise *A. hydrophila*, *A. sobria* ve *A. caviae* olarak isimlendirilirler (Arda ve diğ., 1997).

Aeromonas hydrophila gram negatif, çomak şekilli, 0.7-0.8 µm x 1.0-1.5 µm boyutlarında tek tek veya ikili olarak bulunurlar. Sporsuz ve kapsülsüzdürler. Hareketsiz olanları nadiren bulunmasına rağmen, tek bir polar flagellasıyla hareket etmektedirler. Nitekim flagellaların konumu elektron mikroskopta da belirlenmiştir (Soliman ve diğ., 1989). Fakültatif anaeropturlar. Optimum üreme sıcaklığı 28 °C’dir. Üremesi için görülen maksimum sıcaklık 38-41 °C, minimum sıcaklık ise 5 °C’dir. Nutrient agar içinde düzgün, yuvarlak kenarlı, konveks, pigmentsiz, 0.5-2.0 mm çaplı, S tipli koloniler oluştururlar. Çoğu suşlar kanlı agarda hemoliz oluştururlar, %3.5 NaCl içeren besi yerlerinde üreyebilirler, %5 NaCl içeren ortamlarda ise üreyemezler (Allen ve diğ., 1983; Popoff, 1984; Austin ve Austin, 1987; Arda ve diğ., 1997).

Biyokimyasal olarak *A. hydrophila* ve *A. caviae*’de, eskulin, histidin, arginin, salicin ve arabinoz pozitifdir. Halbuki, *A. sobria* bu bileşikleri kullanmaz (Lallier ve diğ., 1981; Cipriano ve diğ., 1984; Arda ve diğ., 1997). *Aeromonas hydrophila* ve *A. sobria* glukozdan gaz ve H₂S oluştururken, *A. caviae* bu özelliklere sahip değildir (Arda ve diğ., 1997). Bunun dışında *Aeromonas* üyelerinin enzimatik özellikleri birbirleriyle benzerlik göstermektedir (Waltman ve diğ., 1982; Cipriano ve diğ., 1984; Arda ve diğ., 1997).

2.2.1. Etkenin Virülens Faktörleri

Aeromonas hydrophila'nın virülensi ile bağlantılı birçok ekstrasellüler toksinler ve enzimler tanımlanmıştır. Bunlar hemolizinler, sitotoksinler, enterotoksinler, proteazlar ve dermonekrotik faktörlerdir (Miyazaki, 1980; Allan ve Stevenson, 1981; Lallier ve diğ., 1984; Kanai ve Takagi, 1986; Santos ve diğ., 1988; Angka, 1990; Mateos ve diğ., 1992; Rodriguez ve diğ., 1992; Arda ve diğ., 1997). Fakat bu etkenlerin *A. hydrophila* enfeksiyonlarındaki rolleri tam olarak açıklanmamıştır. Bazı araştırmacılar (Kanai ve Takagi, 1986) ekstrasellüler toksinlerin, bazıları (Leung ve Stevenson, 1988) ise proteazın başlıca virülens faktörü olduğunu belirtmişlerdir. Bununla beraber, aeromonaslardaki ekstrasellüler toksinlerin yapı ve sayısı tam olarak aydınlatılmamıştır.

Lallier ve diğ. (1981), *A. hydrophila* türlerinde dermonekrotik faktörlerin balık ölümleri üzerine etkili olduğunu belirtmiştir.

Keza, elastaz ve staphylolitik enzimler ile etkenin virülensi arasında pozitif bir ilişkisinin olduğu tespit edilmiş ve bu enzimlerin aktivasyonu *A. hydrophila*'da izlenmiş olmasına rağmen, diğer aeromonas türlerinde ise izlenememiştir. Bu enzimatik aktivite de enfekte balıklardaki *A. hydrophila*'nın tespiti için de önemli toksonomik bir kriter olmuştur (Santos ve diğ., 1987; Santos ve diğ., 1988).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise asetilkolinesteraz toksininin *A. hydrophila*'nın enfeksiyonlarını oluşturmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Nieto ve diğ., 1991; Rodriguez ve diğ., 1993).

Bilindiği üzere demir birçok aerob ve anaerob mikroorganizmaların yaşamaları ve çoğalmaları için çok gerekli bir elementtir. Bu nedenle ortamda demirin bulunması bakterilerin üremesi ve toksin sentezleri üzerine olumlu etkide bulunur (Arda, 1997). *Aeromonas* türleri tarafından siderofor (demiri bağlayan proteinlere bakterilerde siderofor adı verilir) üretildiği ve *A. hydrophila* türünün balıklar üzerindeki virülensinin üretilen siderofor miktarıyla ilgili olduğu bildirilmiştir (Santos ve diğ., 1988; Esteve ve Amaro, 1991).

2.2.2. *Aeromonas hydrophila* İle Enfeksiyonun Meydana Gelişi

Hareketli *Aeromonas* türlerinin doğal yaşam ortamları deniz ve tatlı sulardır (Allen ve diğ., 1983; Cipriano ve diğ., 1984; Paniaqua ve diğ., 1990). Bu etkenler lağım sularından kaynak sularına kadar her türlü su da bulunabilirler. *Aeromonas hydrophila*'ya daha çok temiz sularda rastlanır. Sularda hareketli *Aeromonas* oranı sıcak mevsimde yükselir, soğuk mevsimde ise düşer. Bu bakterinin gelişmesi için 25-37 °C'ler arasındaki sıcaklık gereklidir (Hazen, 1979; Huizinga ve diğ., 1979; Baran ve diğ., 1981; Erer, 1983; Cipriano ve diğ., 1984; Nieto ve diğ., 1985; Austin ve Austin, 1987; Arda ve diğ., 1997).

Ufak göl suları, hastalıklı balık ve kurbağalar, hastalığı atlatmış iyileşme döneminde olan balık ve kurbağalar enfeksiyonun bulaşma ve yayılmasında rol oynarlar (Kawakami ve Hashimoto, 1978; Cipriano ve diğ., 1984). Bazı algler (Kawakami ve Hashimoto, 1978) ve protozoonlar da (Chang ve Huang, 1981) *A. hydrophila*'nın taşıyıcısı olabilirler. Bu mikroorganizmalar, solunum sistemi, gastrointestinal sistem, mukoza ve derideki yaralar, yanıklar ile vücuda girerler. Enfeksiyon doğrudan bir organa veya sisteme yöneldiği gibi, lenfatik sistemden doğrudan kana da geçebilir. Etkenlerin kanda kalmaları geçici veya sürekli olabilir. Ancak, genellikle buradan çoğalabilecekleri uygun doku ve organlara yerleşerek enfeksiyonu oluştururlar (Erganiş ve İstanbulluoğlu, 1993). Normalde balıkların bağırsak florasında da bulunan bu bakteri stress faktörlerinin etkisiyle patojen hale geçebilir (Cipriano ve diğ., 1984; Austin ve Zehrani, 1988).

Enfeksiyonun genellikle balıkların inaktif olduğu kış aylarında şekillendiği ve hastalığın ilkbaharda olduğu tespit edilmiştir. Örneğin; Amerika'nın güney doğusunda ilkbaharda ve yazın başlangıcında bu bakteriler ılık su balıkları üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Meyer, 1970). Akvaryum balıklarında ise sıcaklık her zaman sabit olduğundan hastalık yılın herhangi bir zamanında şekillenebilir (Cipriano ve diğ., 1984).

Kanal yayın balığı, aynalı sazan ve yılan balığı *A. hydrophila*'ya duyarlı balıklar arasındadır. Salmonidler içerisinde ise gökkuşağı alabalığı hareketli aeromonas septisemisine karşı en hassas ve duyarlı olan türdür (Roberts, 1978; Huizinga ve diğ., 1979; Baran ve diğ., 1981; Erer, 1983; Cipriano ve diğ., 1984; Austin ve Austin, 1987; Peters ve diğ., 1988; Arda, 1997; Arda ve diğ., 1997).

Bu etken kabuklu hayvanların, amfibilerin bağırsak floralarında ve vücut yüzeylerinde de bulunur (Arda, 1974; Trust ve Sparrow, 1974; Roberts, 1978; Hazen, 1979; Allen ve diğ., 1983; Cipriano ve diğ., 1984). Aynı zamanda bu suş; sürüngenler, omurgasızlar ve insanların da dahil olduğu birçok memelide hastalık etkeni olarak da bildirilmiştir (Trust ve Sparrow, 1974; Roberts, 1978; Hazen, 1979; Cipriano ve diğ., 1984; Austin ve Austin, 1987; Grizzle ve Kiryu, 1993; Arda ve diğ., 1997).

2.2.3. Enfeksiyonun Patogenezi

Aeromonas hydrophila'nın balıklarda yapmış olduğu enfeksiyonlara hemorajik septisemi, dermatitis, enfeksiyöz dropsi, rubella hastalığı, tatlı su yılan balığı hastalığı, kızıl leke ve kızıl ağız hastalığı gibi çeşitli isimler verilmiştir (Snieszko ve Axelrod, 1971; Arda, 1974; Huizinga ve diğ., 1979; Miyazaki, 1980; Schulz, 1980; Baran ve diğ., 1981; Allen ve diğ., 1983; Cipriano ve diğ., 1984; Amin, 1985; Miyazaki ve Jo, 1985; Timur ve Timur, 1985; Cai ve Huang, 1986; Kumar ve Dey, 1986; Miyazaki ve Kaige, 1986; Rodriguez ve diğ., 1986; Panpit, 1988; Angka, 1990; Liu ve diğ., 1990; Subasinghe ve diğ., 1990; Sioutas ve diğ., 1991; Chien ve diğ., 1993; Ahmed ve diğ., 1995).

Hastalığın şiddeti; bakterinin türü, virulensi, miktarı, giriş yolu, yayılım şekli; konakçının fizyolojik kondüsyonu ve direnci gibi birbirleriyle bağlantılı olan birçok faktör tarafından etkilenmektedir. (Erganiş ve İstanbulluoğlu, 1993). Bunların yanı sıra, stres faktörleri olarak da bilinen; suyun çözünmüş oksijen düzeyi, sıcaklığı, pH'sı, organik ve inorganik madde içeriği, planktonik yapısı, tuzluluk derecesi ve aşırı kalabalıklık, dengesiz beslenme, kabaca yakalama sonucu pulların dökülmesi ve aşınmalar, ektoparazitler tarafından meydana getirilen lezyonlar da hastalık etkeninin yayılmasında önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, balıklarda immun sistem daha az bir gelişme gösterdiğinden, hastalık etkenlerinden korunmaları o derece az olmaktadır (Cipriano ve diğ., 1984; Arda, 1997; Arda ve diğ., 1997).

Aeromonas hydrophila'nın balıklarda oluşturduğu hastalığın inkübasyon periyodu balık türü ve direncine, ayrıca çevre koşulları ile mevsimlere bağlı olduğu bildirilmiştir (Snieszko ve Bullock, 1976). Bu süre doğal olarak meydana gelen

enfeksiyonlarda 2-4 gün, deneysel oluşturulan enfeksiyonlarda ise 8-48 saat arasında değişiklik göstermektedir. Buna rağmen doğal ve deneysel olarak şekillenen enfeksiyonlarda klinik bulguların birbirlerine benzediği bildirilmiştir (Snieszko ve Axelrod, 1971; Arda, 1974; Huizinga ve diğ. 1979; Schulz, 1980; Erer, 1983; Cipriano ve diğ., 1984; Amin ve diğ., 1985; Miyazaki ve Jo, 1985; Brenden ve Huizinga, 1986; Cai ve Huang, 1986; Kumar ve diğ., 1986; Rodriguez ve diğ., 1986; Ventura ve Grizzle, 1988; Soliman ve diğ., 1989; Candan, 1990; Sioutas ve diğ., 1991; Grizzle ve Kiryu, 1993; Chien ve Chien, 1994; Ergün ve diğ., 1996; Arda ve diğ., 1997).

Aeromonas hydrophila balıklarda akut, kronik ve latent enfeksiyonlara neden olmaktadır. Akut formu; eksoftalmus, renkte koyulaşma, karında sıvı birikimi ve şişkinlik, pullarda dikleşme ile hızla gelişen septisemiyle karakterizedir (Cipriano ve diğ., 1984; Amin ve diğ., 1985). Yine akut formda balıkların otopsilerinde, hedef organlar karaciğer ve böbreklerdir. Karaciğer solgun veya yeşil renkte görülmekte, böbrekler ise şişmiş ve yumuşak bir görünümündedir. Bu organlar bakteri toksinlerinin etkisiyle yapısal bütünlüklerini kaybetmektedirler (Huizinga ve diğ., 1979). Karaciğer ve böbreklerde son derece ciddi doku kaybı şekillense de kalp ve dalakta herhangi bir bozukluk görülmeyebilir. Bununla beraber, dalakta makrofajlar tarafından oluşturulan yoğun bir fagositik aktiviteye rastlanabilir (Bach ve diğ., 1978).

Aeromonas hydrophila enfeksiyonunun kronik formu, hastalığın ülser formu olarak da isimlendirilir. Buradaki başlıca semptomlar derideki ülserler, hemoraji ve yangılardır. Epidermis ve dermisin kaybolduğu, subdermal kaslarda şiddetli bir nekrozun meydana geldiği (Wolke, 1975; Michel, 1981; Amin ve diğ., 1985; Torres ve diğ., 1990; Subasinghe ve diğ., 1990; Rodriguez ve diğ., 1986), krater benzeri bir görünüm alan ülserlerin kenarlarındaki epidermisde hiperplazi olduğu saptanmıştır (Huizinga ve diğ., 1979; Erer, 1983; Subasinghe ve diğ., 1990; Şimşek ve diğ., 1997). İnternal olarak, periton ve kaslarda, bazen peteşilerin teşekkül ettiği görülmüş, bağırsak ve anüste genellikle şişme, yangı ve kanamalara bazen de prolapsusa rastlanmıştır (Erer, 1983; Amin ve diğ., 1985). Buna ilaveten bağırsakların boş olduğu ve yeşil-mukus benzeri bir maddeyle dolu olduğu gözlenmiştir (Erer, 1983; Cipriano ve diğ., 1984; Timur ve Timur 1985; Timur, 1986; Paniaqua ve diğ., 1990; Angka, 1990; Ahmed ve diğ., 1995).

2.3. Mide-Bağırsak ve Pankreatik Hormonlar

2.3.1. Mide-Bağırsak Hormonları

Omurgalı hayvanların sindirim kanalı epiteline dağılmış olan endokrin hücrelerinden, birçok hormonun sentezi ve salınımı sağlanır. Bu hücrelere Gut-Associated endokrin hücreleri veya enteroendokrin hücreler ismi verilir. Enteroendokrin hücrelerini, Hematoksilen-Eosin boyama yöntemi ile ayırmak oldukça güçtür. Fakat bazı gümüş boyaları ile yapılan boyamada salgı granüllerinin iyi boyanmasından ötürü daha net görülebilirler. Bu nedenle enteroendokrin hücreler “Arjentaflin veya Argyrofil hücre” olarak da isimlendirilirler. Buna rağmen tüm enteroendokrin hücrelerin ayırımı bu metotlarla yapılamaz. İmmunohistokimyasal metodlar kullanılarak gümüş boyama metoduna kıyasla çok daha fazla enteroendokrin hücre açıklanmış ve bu hücrelerin esas sekresyonları gösterilmiştir. Bu nedenle enteroendokrin hücrelerini tespit etmek için, deneysel gümüş boyama metodlarının yerini immunohistokimyasal metodlar almış durumdadır (Stevens ve Lowe, 1993).

Bu hormonların bazıları sadece sindirim kanalı organlarına bazıları ise vücuttaki tüm organlara etki etmektedir. Birçok sindirim kanalı hormonları tespit edilmiş fakat, bunların bir kısmının fizyolojik fonksiyonu tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Gastrik ve pankreatik salgıların düzenlenmesinin ve safra kesesinin kontraksiyonunun memelilerde gastrin, sekretin ve kolesistokinin (CCK) hormonları tarafından düzenlendiği yıllarca yapılan çalışmalar sonrasında belirlenmiştir. Bununla beraber son 10 yılda, çok miktarda ilave peptidler sindirim kanalı sinirlerinde ve endokrin hücrelerinde tespit edilmiştir. Bu durum aşağı omurgalılarda ve balıklarda tam olarak aydınlatılmamıştır. Tüm omurgalılarda sindirim kanalı aktivitesine ait kontrol mekanizmasının farklı olduğu belirtilmiştir (Matty, 1985). Enteroendokrin hücreler homojen bir yapıya sahip değildir. Ultrastrüktürel olarak 12 farklı yapı gösteren bu hücreler, 20’den fazla hormon ve nörotransmitter salgılar (Stevens ve Lowe, 1993).

Birçok balık türünün gastro-intestinal kanalındaki peptidlerin varlığı immunohistokimyasal olarak araştırılmıştır. Örneğin; *Oncorhynchus mykiss*’de substans P, gastrin/CCK, bombesin, somatostatin ve glukagon immunoreaktivitesi (IR) (Holmgreen ve diğ., 1982; Powell ve diğ., 1991; Beorlegui ve diğ., 1992), teleost

balıklarda, Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides (PACAP) ve helospectin IR (Olsson ve Holmgren, 1994), gastrin/CCK, glukagon, somatostatin, serotonin, secretin, neurotensin ve substans P (Abad ve diğ., 1987), gastrin ve glukagon (Rombout ve diğ., 1986a ve 1986b), *Carassius auratus* (Hımıck ve Peter, 1994) ve *Lampetra japonica* (Yui ve diğ., 1988)'da CCK/gastrin IR, immunohistokimyasal yöntemler uygulanarak tespit edilmiştir.

2.3.1.1. Gastrin

Gastrin, yüksek omurgalıların hormonu olarak bilinir ve gastrointestinal hormonların tümüne benzeyen bir peptiddir. Memelilerde farklı aminoasit uzunlukları ve dizilişleriyle çok sayıda formu bulunur. Fakat genel bir karboksil terminal pentopeptid ardışığı vardır. Gastrin kimyasal yapısı belirlenen ilk mide peptididir. Bu hormon G hücreleri olarak adlandırılan spesifik endokrin hücreleri tarafından üretilir. Gastrinin başlıca fizyolojik görevi midenin asit sekresyonunu uyarmaktır. Bunun yanı sıra özellikle midenin ve intestinal mukozanın gelişimini uyaran besinsel bir role de sahiptir (Matty, 1985; Solcia ve diğ., 1987). Asit sekresyonunun gastrin salgısını hem uyarıcı hem de engelleyici rolü vardır (Walsh, 1987).

Gastrin salgılarının klasik uyarıcısı sindirilen gıdalar ve bu gıdalardaki aminoasitler, küçük peptidler ve kalsiyum iyonları gibi spesifik besinler olup, bunlar G hücreleriyle birlikte direk etkileşime girerek gastrinin salgılanmasını uyarırlar (Dockray ve Gregory, 1989). Glikoz ve yağ gibi diğer besin maddeleri ise gastrin salgılanmasını uyarıcı bir etki yapmaz. Amino asitlerin (özellikle fenilalanin ve triptofan gibi aromatik aminoasitler) bireysel olarak büyük miktarlara ulaştığı tespit edildiği zaman, gastrin salgılanmasını uyaran en etkili uyarıcılar olduğu bulunmuştur (Taylor ve diğ., 1982).

Bazı hormonlar ve gastrin salgılayan polipeptid (GRP) gibi nörotransmitterler gastrin salgılanmasını uyarırken somatostatin gibi diğerleri GRP'in salgılanmasını engeller. GRP sinirleri, gastrinin salgılanmasında fizyolojik, G hücre hiperfonksiyonun olduğu hastalıklarda ise fizyopatoloji bir rol oynayabilir. Adrenerjik mekanizmalar gastrin salgısını hafifletir. Gastrin salgılanmasında parasempatik sinir sisteminin rolü ise komplekstir (Walsh, 1987).

Gastrin immünoreaktif hücreler teleost ve elasmobranşlarda tespit edilmiş ancak siklostomalarda bulunamamıştır. Örneğin; *Oncorhynchus kisutch* ve *Squalus acanthias* balıklarında gastrin immünoreaktivitesi identifiye edilmiş ancak, *Eptatretus stouti*'nin bağırsağında bulunamamıştır. Yine, teleostlardan *Sparus auratus* (Elbal ve Agullerio, 1986), *Lepomis macrochirus* ve elasmobranşlardan *Rhinobatus productus*'un (Matty, 1985) midesinde de tespit edilmiştir.

Genel bir kural olarak, besin maddesi alındığında önce salgılanan hormonlar sindirim kanalında yüksek miktarlarda bulunur. Örneğin; gastrik antrum ve duodenumdaki G hücrelerinde bulunan gastrin, hem midede besin varken hem de besinlerin sindiriminden sonra uyarıcı asit sekresyonu için hızlı bir şekilde salgılanır. Sekretin, CCK ve glukoz bağlayıcı insülin tropik peptidlerin (GIP) hepsi besin sindirilmesinden hemen sonra salgılanır (Matty, 1985).

2.3.1.2. Substans P

Substans P, 1931 yılında omurgalıların ince bağırsağında tespit edilmesine rağmen, aminoasit dizilişi 1971 yıllarına kadar belirlenememiştir (Chang ve diğ., 1971).

Substans P; beyin, spinal kord, periferik ve enterik sinir sistemlerinde geniş bir dağılım gösterir (Chang ve diğ., 1971; Walker ve Thompson, 1987). Gastrointestinal kanal içindeki substans P konsantrasyonu ince bağırsakta yüksektir. Buralardaki eksternal kas tabakaları içindeki sinir liflerinde bulunan ensefalin ile birlikte kolokelize olabilir (Walker ve Thompson, 1987). Nadir endokrin hücreleri substans P içinde tanımlanmıştır ve substans P'nin besin alındıktan sonra salgılandığı tespit edilmiştir. Bu gözlemlere göre, substans P'nin bir hormondan çok, bir nörotransmitter olarak fonksiyon yaptığı bildirilmiştir (Inverson, 1982; Walker ve Thompson, 1987).

Substans P, safra kesesi, bağırsak düz kasları ve bağırsak kasılmalarını uyaranların etkisinin azalmasına neden olur. Safraya ait salgıları ve bağırsak emilimini engeller. Fakat, bazal pankreatik ve bağırsak ekzokrin salgılarını uyarır. Substans P somatostatin salgılanmasını engeller. Düz kaslar üzerine direkt etki yapar ve asetilkolin salgılanmasını ise indirekt olarak etkiler. Merkezi sinir sistemi içindeki sinirlerden salgılanan asetilkolin, dopamin ve serotonin kontrol eden bir nöromodulator olarak

fonksiyon yapar. Periferik ve enterik sinir sistemlerinde acıyı algılamada önemli bir rol oynamaktadır (Inversion, 1982; Walker ve Thompson, 1987).

2.3.2. Pankreatik Hormonlar

Omurgalıların pankreası sindirim kanalının bir parçası olup, endokrin pankreas sindirimde görev alır. Balıklardaki pankreatik enzim ve gastrointestinal hormonlar (metabolizma ve gelişmeleriyle ilgili hormonlar) yüksek omurgalılarınkine göre oldukça farklıdır. Endokrin pankreas, tüm siklostoma ve balıklarda mevcut olup, anatomik, histolojik ve fizyolojik bazı değişikliklere sahiptir. İnsülin hormonu balıkların çoğunda varken, glukagon her balıkta olmayabilir (Matty, 1985).

Teleostların pankreasları; kompakt, lobuler, vücut boşluğu içerisine yayılmış veya küçük parçalar halinde dağılmış şekilde değişik formlarda olabilir (Matty, 1985). Örneğin; alabalıklarda pankreatik doku, pilorik sekayı çevreleyen adipoz doku boyunca yayılmıştır. Bunlar küresel gruplar halinde olup, morfolojik olarak tipik vertebralı pankreatik asinar hücrelerine benzemektedir. Bu piramit şeklindeki hücreler bazalde lokalizedir. Apikal sitoplazmasında belirgin çekirdek, çekirdekcik ve pekçok eosinofilik zimogen granüller vardır. Asinusu oluşturan hücrelerden salgılanan sindirim enzimleri bir seri kanallarla ince bağırsak içerisine taşınırlar. Sindirim enzimleri proteinler, yağlar ve karbonhidratların parçalanmasından sorumludur. Pankreasın endokrin dokusunu Langerhans veya Brockman olarak tanımlanan adacıklar oluşturur (Anderson ve Mitchum, 1974; Yasutake ve Wales, 1983; Baran ve Timur, 1983). Siklostomalar hariç bütün omurgalıların langerhans adacıkları fonksiyonları bakımından A, B, D ve F olmak üzere 4 hücre tipine sahiptir (Demir, 1992). Teleost balıkların pankreasının histolojik yapısı A, B ve D hücrelerinin varlığıyla elasmobranşların pankreasına benzemektedir. A hücrelerinde glukagonun, B hücrelerinde insülinin olduğu görülmüş ayrıca bunlardan başka D hücrelerinin (bazıları A1 hücresi olarak da isimlendirilir) bulunduğu da bildirilmiştir. A hücresi adacığın daha çok periferinde bulunur ve asidofilik özellik gösterir. B hücresi iyi boya almadıkları için açık renkli görülen bazofilik özelliktedir. D hücrelerine çok az sayıda rastlanır ve ince granülleri anilin boyası ile boyanır. Bunlar somatostatini salgırlar. B hücrelerindeki insülin rezervinin salgılanmasında da D

hücrelerinin düzenleyici rolü olduğu sanılmaktadır. Pekçok balıkta bu üç hücreden başka, hormon üreten 4. bir hücrenin (X-hücresi) varlığından bahsedilmiştir (Yasutake ve Wales, 1983).

Diğer canlılarda olduğu gibi birçok balık türünün pankreas dokusundaki peptidlerin varlığı immunohistokimyasal olarak araştırılmıştır. Örneğin; teleostlardan *Barbus conchonijs*, *Sparus auratus* (Abad ve diğ., 1987), *Notopterus chitala* ve *Gnathonemus petersii*'de (Al-Mahrouki ve Youson, 1999) insülin, glukagon ve somatostatin, *Oreochromis niloticus* (Yang ve diğ., 1999), *Belone belone* (Gruff ve Yaouson, 1997) ve *Blennius gattorugnia*'da (Maglio ve Putti, 1998) insülin, glukagon, somatostatin ve tyrosin, *Dicentrarchus labrax*'da insülin, glukagon ve somatostatin (Carillo ve diğ., 1986), *Chimaera monstrosa*'da ise insülin, glukagon, somatostatin, glisentin ve gastrin (Yui ve Fujita, 1986) immunoreaktiviteleri üzerine çalışmalar yapılmıştır.

2.3.2.1. Glukagon ve Enteroglukagon

Pankreatik glukagon, Langerhans adacıklarındaki alfa hücrelerinin bir ürünü iken, glisentin ve oksintomodulin bağırsaktaki L tipi hücreler tarafından üretilir. Enteroglukagon, L tipi hücrelerin subpopulasyonundaki peptid YY ile birlikte düzenlenmiştir. Normal olarak, bir besinin sindirimi enteroglukagondaki küçük bir artışla sağlanır. Sindirim yetersizliği rahatsızlıklarında önemli bir şekilde etki gösterir. Glukoz, enteroglukagonu uyarır. Fakat, pankreatik glukagon salgısını engeller. İntraluminal yağ ise her iki peptidin salgılanmasını uyarır (Walsh, 1987) .

Hernekadar pankreatik ve mide glukagonları sekretin familyasına ait ise de onların biyolojik etki spektrumları nisbeten farklıdır. Pankreatik glukagon glikogenolizis, lipolizis, glikoneogenezis ve ketogenezisi uyaran metabolik bir hormondur. Pankreatik glukagon, mide hareketliliği, bağırsak emilimi, gastrointestinal hareketlilik, pankreatik salgı ve daha düşük özefagal sfinkter tonüsünü engeller. Enteroglukagon muhtemelen ince bağırsağın gelişmesini sağlayan uyarıcı bir hormon olarak fonksiyon gösterir. Genel olarak pankreatik glukagon ile birlikte gastrik salgılanmasını ve gastrin yavaşça boşalmasını engeller (Walsh, 1987).

Enteroglukagon gibi peptidler ince bağırsakta da etkilidirler. Sindirimin yeterli düzeyde olması için ince bağırsağın emilim yüzeyini artırmaya yardımcı olurlar. Bütün nöropeptidler aynı bölgesel dağılıma sahip olmamalarına rağmen, peptid içeren sinirler eşit mesafede dağılım gösterir ve enterik sinir sisteminde birbirleriyle ilişki içindedirler (Walsh, 1987).

2.3.2.2. İnsülin

Teleost balıkların insülinindeki aminoasit dizilişi memelilerinkinden farklıdır. Bununla birlikte, teleostlarda insülinin iyi çalışması için kan şekeri oranının korunması gereklidir. Langerhans dokusunun yok olması, hiperglisemi, glükozüri ve karaciğerde lipid artışına yol açar. Alabalıklarda oldukça küçük hacimli ve geniş alanlara dağılım gösteren bu adacıkların cerrahi olarak kesilip alınması mümkün değildir. Balıklara ekzojen insülin verilmesinin hiperglisemik etkisi vardır. Genellikle kas ve karaciğerin glikojen içeriği artar. Bununla birlikte insülinle yapılmış çok sayıda çalışma vardır, ancak insülinin rolü tam olarak anlaşılamamıştır (Yasutake ve Wales, 1983; Matty, 1985; Taylor, 1989; Lozano ve diğ., 1991). Oysa bu peptidlerin hepatik glukoz üretimini engellemesi gibi metabolik role sahip olduğu ileri sürülmüştür (Taylor, 1989).

2.3.2.3. Calbindin-D 28 k

Calbindin-D 28k, bir kalsiyum bağlayan protein olup, 28000 molekül ağırlığına sahiptir (Christakos ve diğ., 1989).

Hücrelerarası iletişimde rol oynayan intracellular Ca^{+2} un etkisi, hücre içi Ca^{+2} u bağlayan proteinler tarafından düzenlenir (Christakos ve diğ., 1989; Darwin, 1991). Orjin olarak tavuk intestinal mukozasından izole edilmiştir (Wasserman ve Taylor, 1966). Kanatlı intestinal mukozasındaki lokalizasyonuna ilaveten Calbindin-D 28k, kuş ve memeli hayvanların periferik ve sentral sinir sisteminde rastlanmıştır (Philliphe ve Droz, 1988; Buchan ve Baimbridge, 1988; Christakos ve diğ., 1989; Tarakçı, 1995).

3. MATERYAL VE METOT

Araştırma, 1998-2001 yılları arasında yapıldı. Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üzerinde yapılması planlanan bu araştırmanın deneysel bölümü Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Cip Balık Üretim ve Yetiştirme Tesisi'nde, laboratuvar çalışmaları ise yine aynı üniversitenin Su Ürünleri Fakültesi ve Veteriner Fakültesi'nde gerçekleştirildi. Elektron mikroskopik inceleme ve fotoğraflama işlemleri ise Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı.

3.1. Materyal

3.1.1. Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)

Keban Alabalık Limited Şirketine ait tesisten 100 adet balık oksijen tüpü bağlı balık nakil tankıyla taşınarak, araştırmanın yapıldığı Elazığ'a 15 km uzaklıktaki Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Cip Balık Üretim ve Yetiştirme Tesisi'ne getirilerek stok havuzuna bırakıldı. Bu çalışma için; 28-35 cm uzunluğunda, 250-300 g ağırlığında ve 1,5 yaşında 20 kontrol, 60 deney olmak üzere toplam 80 adet gökkuşığı alabalığı (*O. mykiss*) kullanıldı. Çalışmaya başlayıncaya kadar geçen sürede balıkların adaptasyonu sağlandı. Deney sırasında ise balıklara yem verilmedi.

3.1.2. *Aeromonas hydrophila*

Gökkuşığı alabalığında enfeksiyon oluşturmada kullanılan referans *Aeromonas hydrophila* suşu Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edildi. Getirilen suş Tryptic Soy Agar, Gliserinli Nutrient Broth ve Kanlı Agar'a ekimleri yapılarak 22 °C'deki etüvde çoğalmaları sağlandı. Elde edilen kültürler buzdolabında +4 °C'de saklandı. Kültürün muhafazası için bu işlemler ayda bir tekrarlandı. Suşun özelliklerini koruyup korumadığını kontrol etmek için Popoff (1984)'a göre suşa ait bazı biyokimyasal ve fizyolojik testler (Gram boyama, 22 ve 37 °C'deki üremeleri, hareket muayenesi, Mac Conkey agarda üreme, O/F testi, glukoz, xyloz, laktoz, sukroz, mannitol, inositol, sorbitol, indol, voges-prescaure, metil red, H₂S, ureaz, hemoliz, sitokrom oksidaz, sitrat, katalaz) uygulandı. Buyyondaki bakteri

sayımı Mc Farland Standart tüpleri yardımıyla yapıldı. Deney hayvanları için 15×10^8 /ml hacminde, 18 saatlik taze kültürler hazırlandı.

3.1.3. Kullanılan Malzemeler

Araştırmada; lam, lamel, makas, petri kutusu, pens, bistüri, küçük cam şişeler, steril plastik enjektörler, operasyon eldiveni, plastik küvetler, eküvyon, deney tüpleri, baget, beher, erlen, pH metre, hassas terazi, otoklav, etüv, buzdolabı, sterilizasyon fırını, beton havuz, su motoru, plastik boru, ultraviyole lambalı su arıtma cihazı, mikrotom, embedding molds, rotator, ultramikrotom, bakır grid, grid kutusu, binoküler mikroskop, elektron mikroskobu, kryotom, fotoğraf makinesi, ışık ve elektron mikroskop filmlerinden yararlanıldı.

Ayrıca, kimyasal madde olarak da triptic soy agar, gliserinli nutrient broth, kanlı agar, mac conkey agar, pepton water, karbonhidrat fermentasyon besiyerleri, potasyum permanganat, %10'luk nötral tamponlu formalin, alkol, xylol, parafin, hematoksilen, eosin, aseton, iyot solüsyonu, fuksin, cristal violet, Oil red O, hidrojen peroksit, bovine serum albumin, jelatinli su, sodyum azid, fosfat buffer saline, mouse anti calbindin, biotinleştirilmiş horse anti mouse, streptavidin horserodish peroksidaz, glukoz oksidaz-DAB-nikel amonyum sülfat substratı, rabbit anti insülin, rabbit anti gastrin, rabbit anti glukagon, rabbit anti substans P, goat anti rabbit, horserodish peroksidaz, glutaraldehit, paraformaldehit, kakodilayt, ozmiyum tetroksit, uranil, propilen oksit, araldit CY 212, dodecenyl succinic anhydride, benzyldimetilamin, dibutyl phthalate, kurşun sitrat ve uranil asetat kullanıldı.

3.1.4. Deney Havuzları

Çalışmanın yapıldığı Cip Balık Üretim ve Yetiştirme Tesisi'nde; stok için 6x2x1 m, kontrol grubu için 3x2x1 m ve deney grupları için ise 3x2x1 m boyutlarındaki beton havuzlar kullanıldı. Havuza su devir daim yapan 2 adet su motoru monte edildi. Suyun %99 oranında bakteriyolojik arıtımını sağlayan UV lambalı su arıtma cihazı bu motorlara bağlandı (Şekil 3.1). Suyu havalandırarak oksijen temin etmek için de bu sisteme üzerinde delikler açılmış borular döşendi. Arıtma cihazından akan sudan

periyodik olarak alınan su örnekleri bakteriyolojik yönden incelendi. Stok ve kontrol havuzlarına tesisteki su bağlanarak, balıkların gıda gereksinimi karşılandı.

Aeromonas hydrophila'nın uygulanış şekillerine göre balıklar farklı zamanlarda deney havuzuna alındı. Her deney bitiminden sonra havuz suyu formalin ve KMnO_4 ile, su boşaltıldıktan sonra havuz ise KMnO_4 ile dezenfekte edildi.



Şekil 3.1. Deney grupları için kurulan düzeneğin görünüşü.

3.2. Metot

3.2.1. *Aeromonas hydrophila*'nın Balıklara Uygulanış Şekilleri

Alabalıkların *A. hydrophila* ile enfekte edilmesi; solungaçlara sürme, intraperitoneal ve intramüsküler olmak üzere 3 yolla yapıldı.

Deney balıklarına suş verilmeden önce fenoksiethanol (5 ml/L) ile genel anestezi uygulandı (Mattson ve Ripley, 1989). Deney süresince steril operasyon eldiveni kullanıldı.

Aeromonas hydrophila'nın alabalıkların solungaçlarına sürme yolu ile enfekte edilmesi: Uç kısmına pamuk sarılı steril eküvyonlar (20 adet) 18 saatlik taze hazırlanmış kültüre batırıldıktan sonra balıkların (20 adet) solungaç kapakları bir pens yardımıyla kaldırılarak sağ ve sol solungaçlarına sürüldü.

Aeromonas hydrophila'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi: Steril plastik enjektörler (20 adet) kullanılarak taze hazırlanmış 18 saatlik kültürden (titresi 15×10^8 /ml) 5 cc intraperitoneal olarak balıkların (20 adet) pelvik yüzgeçlerinin ön kısmından enjekte edildi.

Aeromonas hydrophila'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi: Yine steril enjektörler yardımıyla (20 adet) taze hazırlanmış 18 saatlik kültürden (titresi 15×10^8 /ml) 5 cc intramüsküler olarak balıkların (20 adet) dorsal yüzgecin hemen önünden laterale doğru kısmından enjeksiyon yapıldı.

Kontrol grubu: Ayı bir beton havuza 20 adet balık bırakıldı.

3.2.2. Doku Prosedürleri

Alabalıklara *A. hydrophila* suşunun çeşitli yollarla inokülasyonundan sonra, balıklar gözlem altında tutuldular. Ölen balıkların hemen dış ve iç organlarındaki klinik semptomları belirlendi. Bunun yanında ölmek üzere olan veya şüpheli olan balıklara ise genel anestezi altında usulüne uygun biçimde (Arda, 1974) otopsi yapılarak kardiak mide, pilorik mide, ince bağırsak, kalın bağırsak, pankreas, karaciğer, böbrek, solungaç ve kaslardan doku örnekleri alındı. Işık ve elektron mikroskopları ile immunohistokimyasal incelemeler için doku parçacıkları şu işlemlerden geçirildi.

3.2.3. Işık Mikroskopik ve İmmunohistokimyasal Prosedürler

Alınan doku örnekleri % 10'luk nötral tamponlu formalin (pH 7,2) solüsyonu içinde 24-26 saat süreyle tesbit edildi. Tesbit sıvısından arındırılmak üzere tesbit süresi kadar yıkamaya alındı. Dehidrasyon için alkol, parlatmak için xylol serilerinden geçirilip, parafine emdirildikten sonra yine parafinde bloklandı. Parafinli bloklardan Leica marka kızaklı mikrotomda 5-6 mikron kalınlığında kesitler alındı. Alınan doku örneklerinin bir kısmı da dondurularak kryotomda 1-2 mm kalınlığında kesildi (Luna, 1968).

3.2.3.1. Işık Mikroskopik Prosedür

Işık mikroskopik incelemeler için doku kesitlerine Hematoksilen-Eosine, Brown-Brenn ve Oil Red O boyamaları yapıldı (Luna, 1968). Hazırlanan preparatlar

nikon marka araştırma mikroskobunda değerlendirilerek bulgular mikrofotografi ile tespit edildi.

3.2.3.2. İmmunohistokimyasal Prosedür

İmmunohistokimyasal boyama avidin-biotin horseradish peroksidaz kompleks (ABC) tekniği veya peroksidaz anti peroksidaz (PAP) tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. Antijeniteyi artırmak ve parafini gidermek için kesitler her birinde 2'şer dakika olmak üzere xylol ve alkol serilerinden (xylol I, xylol II, %100 alkol I, %100 alkol II, %100 alkol III, %70 alkol) geçirildi. Daha sonra, endojenöz peroksidaz aktivitesini azaltmak için kesitler metanolle hazırlanmış % 0,08 hidrojen peroksidaz (H_2O_2) solüsyonunda 5 dakika bekletildi (Stenberger, 1986).

3.2.3.2.1. Avidin-Biotin Horseradish Peroksidaz Kompleks (ABC) Tekniği

Kesitler mouse monoklonal antiserumu (Mouse anti-Calbindin IgG) (Sigma) ile 16-20 saat 4 °C'de inkübe edildi. Antiserum içerisinde % 2,5 bovine serum albumin ve % 0,25 sodyum azid içeren phosphate buffer saline (PBS)'de 1:200, 1:500 ve 1:1000 oranlarında sulandırıldı. Daha sonra, biotinleştirilmiş horse anti-mouse IgG (Dako) ile ve bunu takiben biotinleştirilmiş streptavidin horseradish peroksidaz (Dako) kompleksi ile oda ısısında 1'er saat süreyle inkübe edildi. Her iki antiserum PBS içerisinde 1:50 oranında sulandırıldı. Kesitler, her inkübasyon öncesi 30 dakika süre ile PBS solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra, kesitler glukoz oksidaz-DAB-nikel amonyum sülfat (GDN) substratına (Shu ve diğ., 1988) daldırılıp su ile yıkanıp, eosin ile boyanarak ışık mikroskobunda incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.2.3.2.2. Peroksidaz Anti Peroksidaz (PAP) Tekniği

Kesitler rabbit poliklonal antiserum (Rabbit-anti İnsülin IgG, Rabbit-anti gastrin, Rabbit-anti Substans P-IgG veya Rabbit-anti Glucagon-IgG) (Sigma) ile 16-20 saat 4 °C'de inkübe edildi. Antiserumlar, içerisinde % 2,5 bovine serum albumin ve % 0,25 sodyum azid içeren PBS'de Rabbit anti insülin IgG 1:1000, Rabbit anti gastrin Ig 1: 10000, Rabbit anti glukagon Ig 1: 1500, Rabbit anti substans P Ig 1: 20000 oranlarında sulandırıldı. Kesitler daha sonra goat anti-rabbit IgG ile ve bunu takiben horseradish

peroksidaz ile oda sıcaklığında 1'er saat süreyle inkübe edildi. Her iki antiserum PBS içerisinde 1:50 oranında sulandırıldı. Kesitler, her inkübasyon öncesi 30 dakika süre ile PBS solüsyonu ile yıkandı. Bu işlemlerden sonra, kesitler GDN substratına (Shu ve diğ., 1988) daldırılıp su ile yıkayıp, eosin ile boyanarak ışık mikroskobunda incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.2.4. Elektron Mikroskop Prosedürü

Elektron mikroskobu incelemeleri için alınan doku örnekleri, % 25'lik glutaraldehit, paraformaldehit ve kakodilayt tamponundan (0,1 M, pH 7,4) oluşan ve pH'sı 7,2 ye ayarlanmış prefikzatif içerisinde 24 saat süreyle + 4 °C'de buzdolabında tespit edildi. Bu örnekler kakodilayt tamponuyla 3 saat süreyle yıkandı. Postfiksasyon için dokular kakodilayt tamponuyla hazırlanmış % 2'lik ozmiyum tetroksit tespit solüsyonu içerisinde 2-24 saat süreyle, oda sıcaklığında rotatorda döndürüldü. Aynı tamponla 20 dakikalık yıkama işleminden sonra 30°, 50° ve 70° lik alkol serilerinde 90 dakika bekletildi. Bu işleme 70° lik alkol içerisinde ağzı kapalı olarak 1 gece buzdolabında devam edildi. Buzdolabında 2 saat süren uranil boyamasını takiben 90°, 100° alkollerde ve propilen oksitte 1'er saat bırakıldı. Dokular Araldit CY 212'den 5 ml., dodocenyl succinic anhydride (DDSA)'den 5ml., benzyldimethylamine (BDMA)'den 0.2 ml ve dibutyl phthalate (DP)'den 0.2 ml alınarak taze olarak hazırlanmış ve aynı oranda propilen oksit ile sulandırılmış solüsyon içerisinde ağzı kapalı olarak buzdolabında 1 gece bekletildi. Ertesi gün dokular aynı oranlarda taze olarak hazırlanmış araldit karışımında 2 saat süreyle etüvde 35 °C'de rotatorda döndürüldü. Kalan araldit ile embedding molds'da bloklama yapıldı. Bloklar 1 gün süreyle etüvde 45 °C'de, 1 gün süreyle de 60 °C'ye ayarlanan etüvde bekletildi. Etüv kapatılarak kapağını açmadan kendi halinde soğumaya bırakıldı. Soğuyan bloklar embedding molds'dan çıkarıldı (Hayat, 1989). Daha sonra, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nın elektron mikroskop laboratuvarında, hazırlanan bloklardan yarı ince kesitler alınarak toluidine blue ile boyayıp Nikon marka araştırma mikroskobunda incelendi. Ultra mikrotom kullanılarak alınan 300-700 Å kalınlığındaki ince kesitler formvar kaplı bakır gridler üzerine yerleştirildi. Bu gridler kurşun sitrat ve uranil asetat ile boyandı. Hazırlanan gridler EM 9 Carl Zeiss elektron mikroskobunda incelenerek istenilen yerlerden fotoğraflama yapıldı.

4. SONUÇLAR

Balıklarda deneysel enfeksiyonu oluşturmada kullanılan *A. hydrophila* suşunun Tryptic soy agar üzerine yapılan ekiminden 24 saat sonra; 1-2 mm çapında, toplu iğne başı büyüklüğünde, yuvarlak, kenarları ve yüzeyi düzgün, konveks, kirli beyaz renkte koloniler, gliserinli nutrient buyon'da ise rengin bulanık olduğu ve üzerinde ince bir perde olduğu tespit edildi. Taze kültürden preparatlar hazırlanıp, gram boyama metodu ile boyanarak mikroskop altında incelendiğinde, etkenin gram (-) çomak ve hareketli bakteriler olduğu, kanlı agarda yapılan ekim sonrasında ise hemoliz meydana getirdiği gözlemlendi. Suşa ait morfolojik ve biyokimyasal testler Tablo 4.1' de verilmiştir.

Tablo 4.1. *A. hydrophila*'nın morfolojik ve biyokimyasal özellikleri.

Gram boyama	: (-)
Şekil	: Çomak
Hareket	: (+)
22 ve 37 °C'de üreme:	(+)
Mac Conkey	: (+)
O/F testi	: F
Glukoz (gaz)	: (+)
Xyloz (asid)	: (+)
Laktoz (asid)	: (+)
Sukroz (asid)	: (+)
Sitrat	: (+)
Mannitol (asid)	: (+)
İnositol	: (-)
Sorbitol (asid)	: (+)
Katalaz	: (+)
İndol	: (+)
V-P/ MR	: (+) / (-)
H ₂ S	: (+)
Ureaz	: (-)
Hemoliz	: (+)
Sitokrom oksidaz	: (+)

Aeromonas hydrophila suşu ile deneysel olarak solungaçlara sürme (Şekil 4.1), intraperitoneal (Şekil 4.2) ve intramüsküler (Şekil 4.3) olmak üzere 3 yolla enfekte edilen alabalıklarda aşağıdaki klinik ve patolojik bulgular saptandı:



Şekil 4.1. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıkların solungaçlarına sürülmesi.



Şekil 4.2. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi.



Şekil 4.3. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi.

4.1. Klinik Bulgular

4.1.1. Solungaçlarına Sürme Yolu İle Enfekte Edilen Alabalıklar

Bu yolla etken balıklara verildikten birkaç saat sonra tüm balıklarda durgunluk, bir gün sonra da hareketlerinde yavaşlama ve ara sıra da bazı balıklarda yan yüzme bazılarında ise kuyrukları yukarıda olmak üzere baş aşağı yüzme hareketi dikkati çekti. Yine bir kısım balıklar havuzun yüzeyinde bir kısmı ise havuzun köşelerinde hareketsiz veya çok az hareketli belirlendi. Bazı balıkların da 1-2 dakika baş aşağı kuyruk yukarı doğru durup çarpınma hareketi gösterdikten sonra tekrar yan pozisyona dönüp sonra düzelerek normal yüzme hareketi yaptığı görüldü. İlk ölüm olayı enfeksiyonun 4. gününde (3 adet balık) tespit edildi. Bunu takiben 8. gün (3 adet balık), 9. gün (2 adet) ve 16. günde (1 adet balık) ölüm olayları gözlemlendi. Bunun yanı sıra 2. gün (2 adet balık), 4. gün (2 adet balık), 5. gün (2 adet balık), 9. gün (1 adet balık), 10. gün (1 adet balık), 13. gün (2 adet balık) ve 16. günde (1 adet balık) ölmek üzere olan balıklar hemen havuzdan çıkarılıp anesteziye alındı ve otopsis yapıldı.

Otopside, bazı balıklarda solungaçlar oldukça koyu kırmızı, bazılarında ise açık bir renkte ve 8., 9. ve 16. günlerde ölen balıklar ile 5. günde ölmek üzere olan balıkların karaciğerinde renk açılmaları gözlemlendi.

4.1.2. İntraperitoneal Enjeksiyon Yolu İle Enfekte Edilen Alabalıklar

Intraperitoneal enjeksiyondan birkaç saat sonra alabalıklarda durgunluk, hareketlerinde yavaşlama, havuzun dip köşe kenarlarına yönelme ve hızlı soluma görüldü. Enjeksiyondan 12 saat sonra solunumu iyice yavaşlamış, yan dönmüş, ölmek üzere olan 2 adet, 16 saat sonra aynı durumda 3 adet, 18 saat sonra ise 2 adet balık belirlendi. Bu balıklar hemen havuzdan çıkarılarak, anestezi uygulandı ve ardından otopsisi yapıldı. Ayrıca, 24 saat sonra 9 adet, 2. gün 3 adet, 3. gün ise 1 adet balık ölü olarak tespit edildi. Gerek ölmek üzere olan ve gerekse de ölen balıkların vücut yüzeyi enjeksiyon yerinden dorsal yüzgece kadar olan bölgede hemorajili lezyonlar belirlendi. Ayrıca, bazı balıkların anüs ve ventral yüzgeçlerinin tabanında hemorajilere (Şekil 4.4) ve 2 balıkta ise anüste prolapsusa rastlandı.

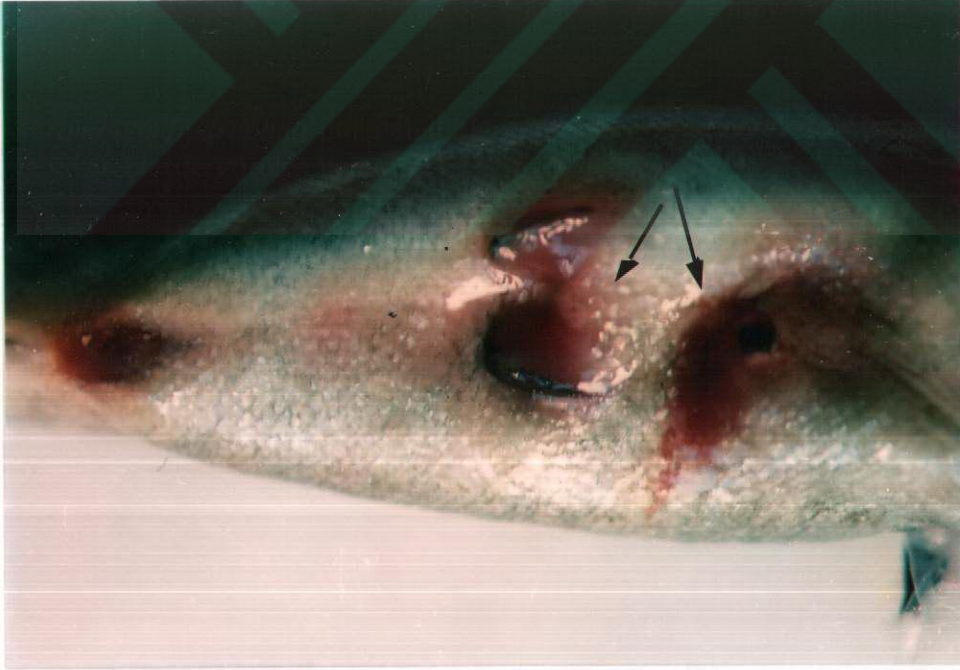
Otopsisi yapılan balıklarda karın boşluğunda ve bağırsak içeriğinde kötü kokulu, sarımsak-yeşilimsi renkte, kanlı bir sıvının bulunduğu, karaciğerde çeşitli büyüklüklerde açık renkli nekrotik bölgelerin şekillendiği, karaciğer, gonadlar, ince ve kalın bağırsak ile midenin kardiak ve pilorik bölgeleri arasındaki dorsale doğru olan alanlarda hemorajiler gözlemlendi (Şekil 4.5). Yine bazı balıkların böbreklerinin yumuşak bir kıvamda olduğu tespit edildi.

4.1.3. İntramüsküler Enjeksiyon Yolu İle Enfekte Edilen Alabalıklar

Intramüsküler enjeksiyondan birkaç saat sonra balıklarda durgunluk, hareketlerinde yavaşlama, hızlı soluma ve genellikle havuz kenarında durdukları gözlemlendi. Enjeksiyondan 36 saat sonra solunumu iyice yavaşlamış, yan dönmüş, ölmek üzere olan 1 adet, 47 saat sonra aynı durumda 2 adet, 3. gün 2 adet ve 4. gün 3 adet balık belirlendi. Bu balıklar hemen havuzdan çıkarılarak, anestezi uygulandı ve ardından otopsisi yapıldı. Ayrıca, 36 saat sonra 4 adet, 45 saat sonra 1 adet, 3. günde 6 adet, 4. günde ise 1 adet balık ölü olarak tespit edildi. Enjeksiyondan 16 saat sonra deney balıklarının hepsinin yan taraflarında hemorajili lezyonlar göze çarptı (Şekil 4.6). Bu hemorajili bölgenin etrafında ise kahverengimsi-siyah lekeler tespit edildi (Şekil 4.7). Bu lezyonların görülmesinden 20 saat

sonra bazı balıklarda lezyonlu bölgenin daha genişlediği ve şiştiği dikkati çekti. Bazı balıkların derisinde renk açılmaları gözlemlendi (Şekil 4.8). Ölen ve ölmek üzere olan balıkların büyük çoğunluğunda abdomen ve anüs kenarlarında kızarıklık tespit edildi. Balıkların çoğunda solungaçların açık pembe renkte, bazı balıkların ise ventral yüzgeçlerinin tabanında peteşiler olduğu göze çarptı.

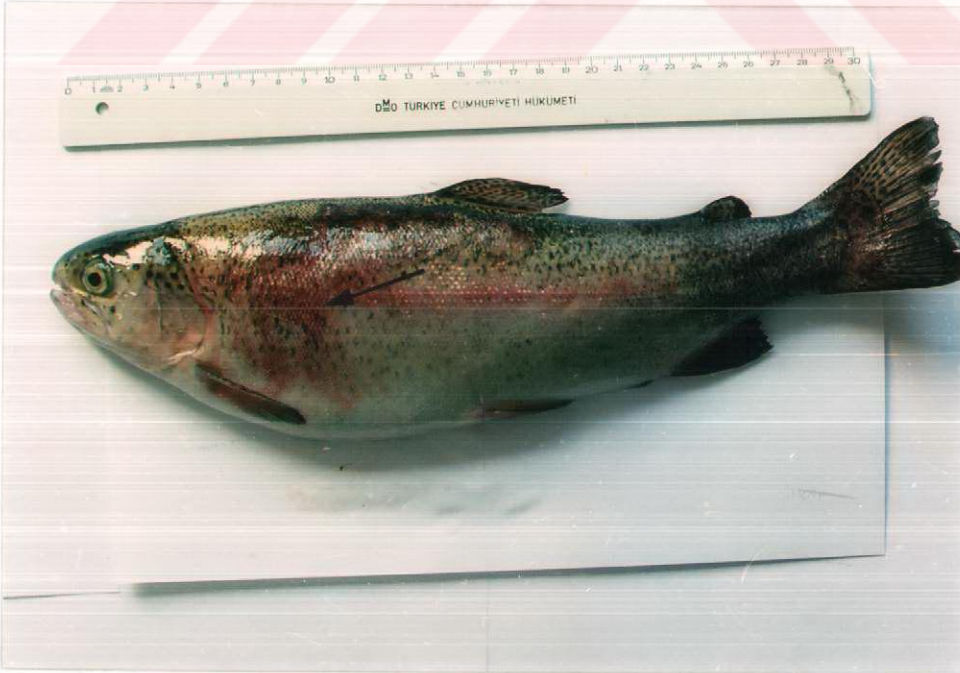
Otopsis yapılan balıkların enjeksiyon alanında oluşan lezyonlu bölgenin deri altı kanlı, irinli bir sıvıyla dolu olduğu ve bu bölgedeki kasların kesilirken parçalandığı saptandı. Vücut boşluğunda kötü kokulu, sarımtırak-yeşilimsi renkte, kanlı bir sıvının bulunduğu tespit edildi. Balıkların çoğunda karaciğerde çeşitli büyüklüklerde açık renkli nekrotik bölgeler bulundu. Bunun yanı sıra karaciğer, ince ve kalın bağırsak ile midede hemorajiler dikkati çekti (Şekil 4.9). Yine bazı balıkların böbreklerinin yumuşak bir kıvamda olduğu gözlemlendi.



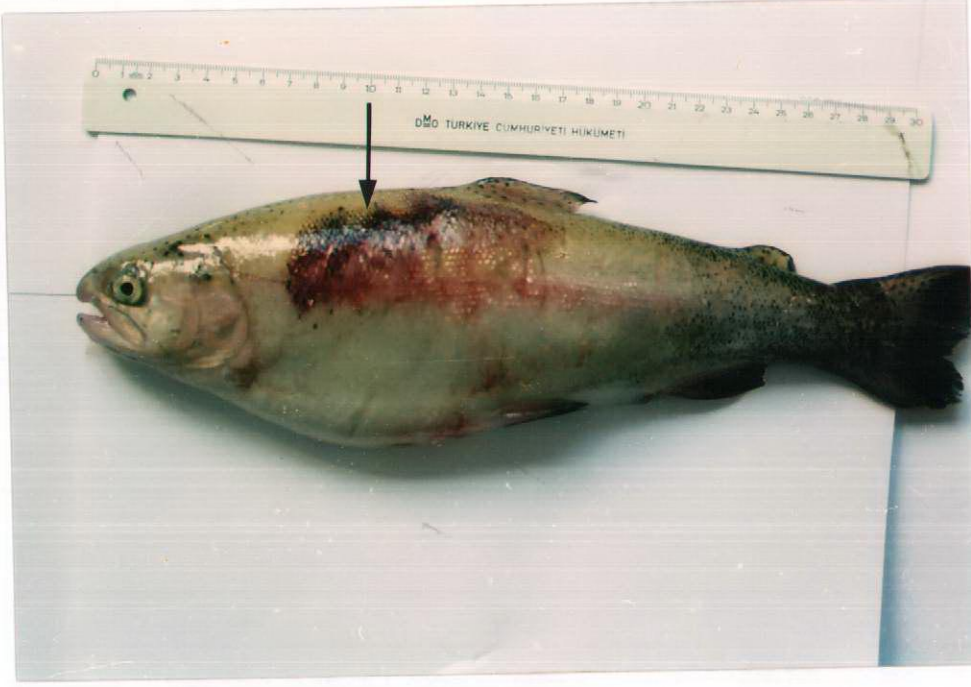
Şekil 4.4. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyonu sonucunda anüs ve yüzgeçlerde görülen hemoraji.



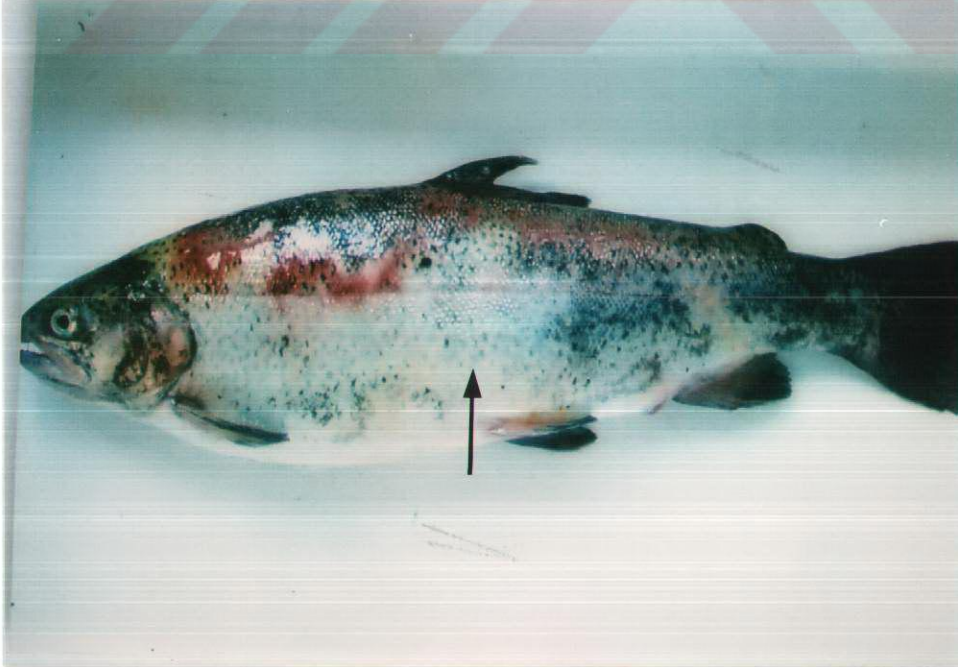
Şekil 4.5. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyonu sonucunda karaciğerde oluşan nekrotik odaklar ve iç organlardaki hemorajiler.



Şekil 4.6. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyonu sonucunda deride meydana gelen hemorajili lezyon.



Şekil 4.7. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyonu sonucunda deride gözlenen kahverengimsi-siyah lekelenmeler.



Şekil 4.8. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyonu sonrasında deride görülen renk açılmaları.



Şekil 4.9. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyonu sonrasında deri ve iç organlardaki hemorajiler.

4.2. Histopatolojik Bulgular

4.2.1. Işık Mikroskopik Bulgular

4.2.1.1. Kontrol Grubu

Midenin tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika seroza tabakaları belirgindi (Şekil 4.10). Sekonder ve primer kıvrımlarla spiral bir yapı gösteren tunika mukozanın lumeninde çok sayıda epiteliyal kript vardı. Bunlar; midenin tunika mukoza tabakasında bazal membran üzerine oturmuş olan tek katlı prizmatik epitel hücreleri ve bu epitel hücreleri arasında salgı yapan kadeh hücrelerinden meydana gelen lamina epiteliyalis, bunun hemen yanında bazal membran altında çoğunluğu bağ dokudan oluşmuş lamina propriya, ardından kalın kollagen iplikler topluluğundan meydana gelmiş olan stratum kompaktum ve granüler

halinde olan stratum granulozum katmanları ile gevşek bağ doku ve kan damarlarını içeren submukoza tabakaları belirgin bir şekilde görüldü.

Tunika mükülarisin iç tarafında sirküler kas katmanı, dış tarafında ise longitudinal kas katmanı belirlendi. Bu kasların düz kaslardan oluştuğu ve sirküler katmanın longitudinal katmandan daha kalın olduğu tespit edildi.

Tunika serozanın gevşek bağ dokudan ibaret, ince bir tabaka halinde olduğu gözlemlendi.

Kardiak mide bölümünün lamina propriyasında çok sayıda seröz kardiak bezler gözlendi. Her bir bezin bir lumeni ve lumen etrafında salgı yapan, çekirdekleri ortada yer alan basit prizmatik hücreler vardı. Tunika mükülaristeki sirküler tabaka longitudinal tabakadan 2 kat kadar daha kalındı.

Pilorik midede ise bazı kesitlerde pilorik bezler (mukus bezleri) saptandı. Bu bezlerin de yine bir lumeni ve etrafında prizmatik hücreleri bulunmaktaydı. Ancak hücre çekirdekleri yassılaşmış ve bazale doğru itilmiş durumdaydı. Pilorik midedeki epiteliyal kriptlerin, kardiak mideninkinden daha uzundu. Tunika mükülaristeki sirküler tabaka longitudinal tabakadan 4-5 kat daha kalın olduğu tespit edildi (Şekil 4.10).

Bağırsaklarda da yine tunika mukoza, tunika mükülaris ve tunika seroza katmanları belirlendi (Şekil 11). Tunika mukozanın lumene bakan yüzeyinde bulunan lamina epiteliyaliste, tek katlı prizmatik epitel hücreleri mevcuttu. Bağırsak boyunca bu epitel hücrelerin arasında çok sayıda ve dağınık bir şekilde kadeh hücreleri yer almaktaydı. Bu hücrelerin kalın bağırsak bölümünde daha az sayıda olduğu belirlendi. Lamina epiteliyalisin altında yer alan ve bağ dokudan oluşan lamina propriya epitelyumun içine doğru çok sayıda kıvrımlar yaptığı tespit edildi. Lamina propriyanın altında kollagen iplik topluluğu olan stratum kompaktum ve granüler haldeki stratum granulozum belirgindi.

Tunika mükülarisde sirküler ve longitudinal kas tabakalarının bulunduğu ve sirküler kas katmanının longitudinal kas katmanından 2 kat kadar daha kalın olduğu saptandı.

Tunika seroza ise ince bir gevşek bağ dokudan ibaretti.

Karaciğerde dallanmış tünel şeklindeki sinuzoidlerin bağlayıcı dokular arasında girintili çıkıntılı bir halde yayıldığı gözlendi (Şekil 4.12). Hücre duvarının iki kat hücreden oluştuğu ve lobüllerin dış hatlarının belirgin olmadığı saptandı. Hepatik parankim hücreleri ise çok şekilliydi.

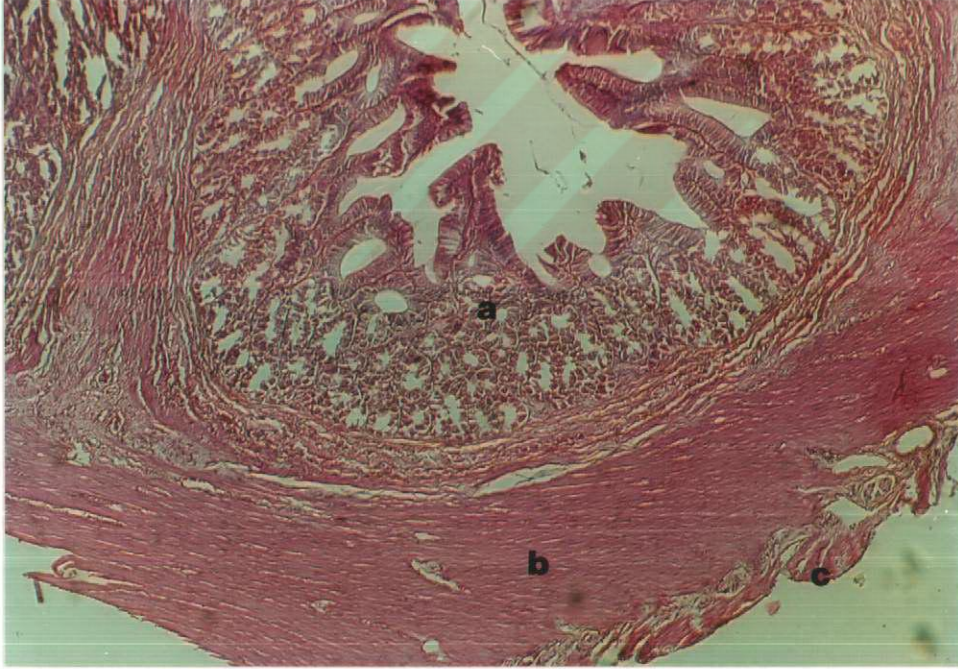
Pankreas dokusunun önemli bir kısmını piramit şeklindeki asinar hücrelerinin, oluşturduğu görüldü (Şekil 4.13). Pankreasın endokrin bölümünün ise bir araya toplanmış

glanduler hücre demetleri halinde ve doku içinde dağılmış durumda bulunan Langerhans adacıklarının meydana getirdiği belirlendi.

Solungaçların her bir filamentinde primer ve sekonder lamellalar tespit edildi (Şekil 4.14). Lamella üzerinde chlorid hücreleri, mukus hücreleri ve epitel hücreleri görüldü Mukus hücreleri, lamellanın yüzeyinde ve içleri boş bir vakuol şeklinde gözlemlendi. Klorid hücreler lamellar epitelyum boyunca ve özellikle de lamellanın proksimal bölgesinde çok sayıda bulundu. Her bir lamella pilaster hücreleri tarafından çevriliydi.

Vücut kaslarının çizgili kaslardan meydana geldiği ve her bir hücrede çeşitli longitudinal myofibrillerin bulunduğu belirlendi (Şekil 4.15).

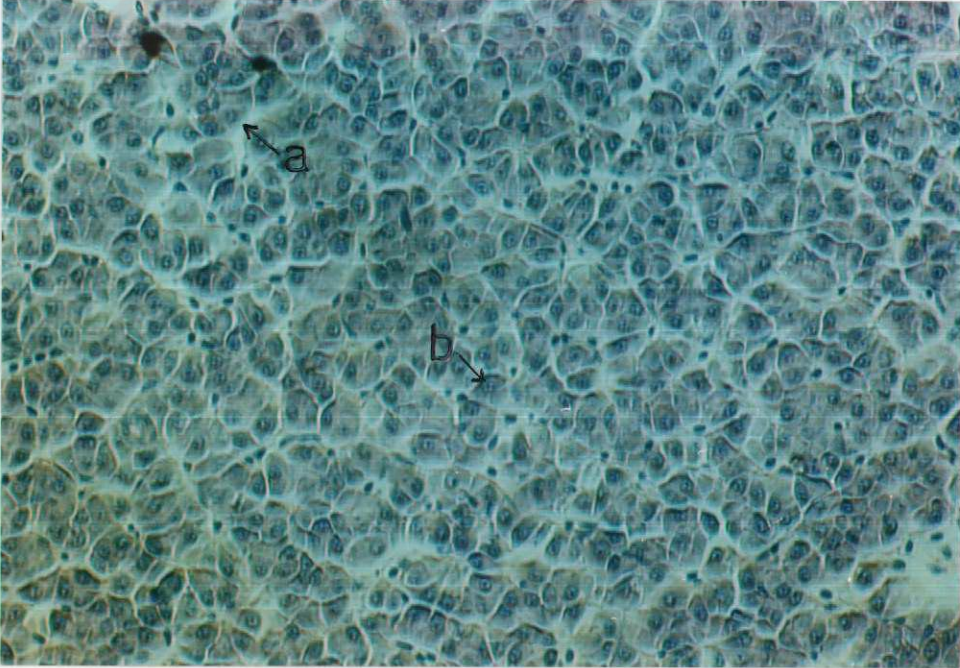
Böbreklerdeki glomerulusun etrafını saran bowman kapsülünün dış yaprağını yassı epitel hücrelerinin oluşturduğu saptandı. Böbrek tubülüslerini meydana getiren epitellerin prizmatik hücrelerden meydana geldiği tespit edildi (Şekil 4.16).



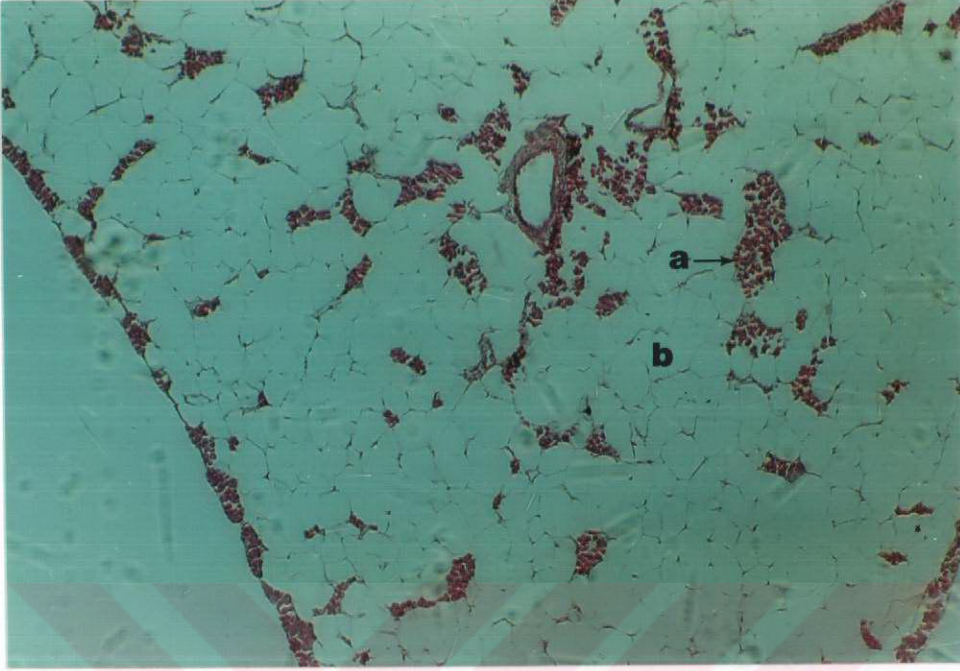
Şekil 4.10. Kontrol grubu alabalıklarından alınan mide kesiti, H&E, X100. a.tunika mukoza, b. tunika mükülaris, c.tunika seroza.



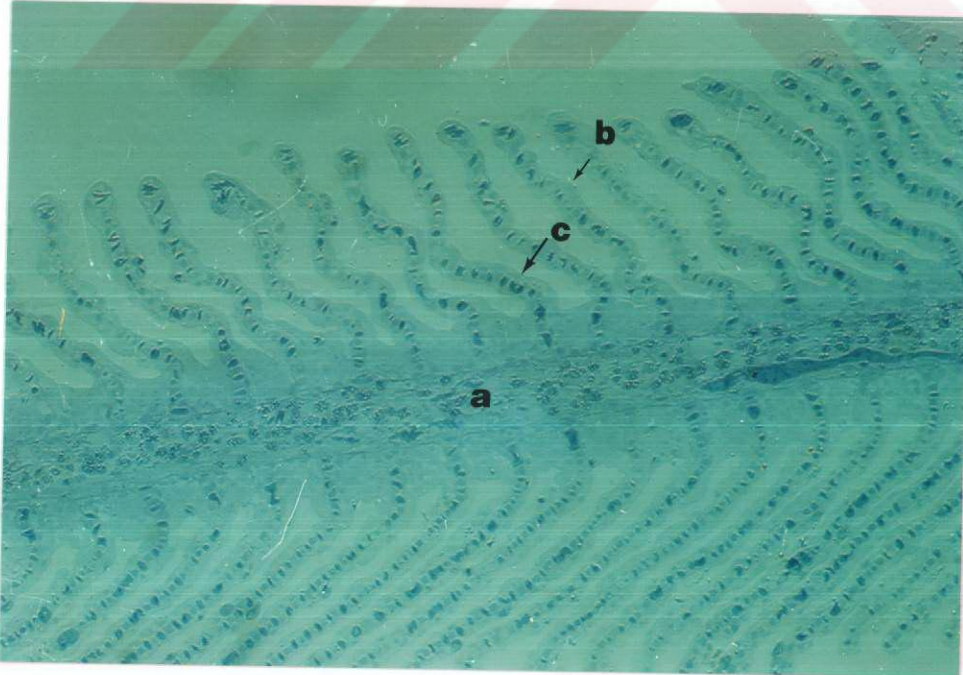
Şekil 4.11. Kontrol grubu alabalıklardan alınan bağırsak kesiti H&E, X100. a.tunika mukoza, b. tunika mürskölaris, c.tunika seroza.



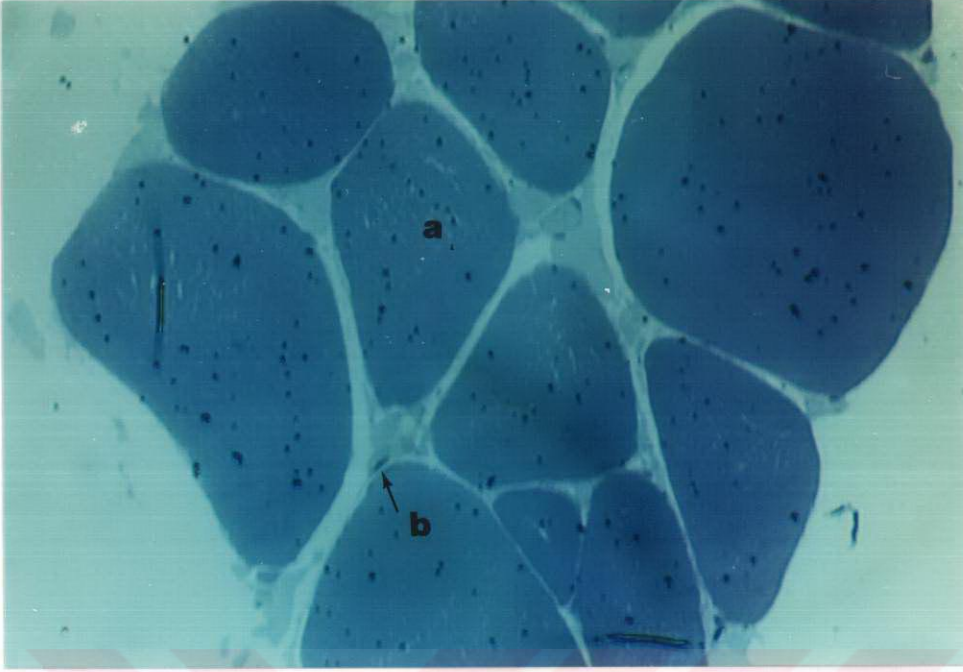
Şekil 4.12. Kontrol grubu alabalıklardan alınan karaciğer kesiti, H&E, X200.a. sinüzoidler, b. hepatositler



Şekil 4.13. Kontrol grubu alabalıklardan alınan pankreas kesiti, H&E, X200.a.pankreatik asinar hücreleri, b. yağ dokusu.



Şekil 4.14. Kontrol grubu alabalıklardan alınan solungaç kesiti, Toluidine blue, X200.a. kondrositler, b. mukus hücresi, c.plaster hücresi.



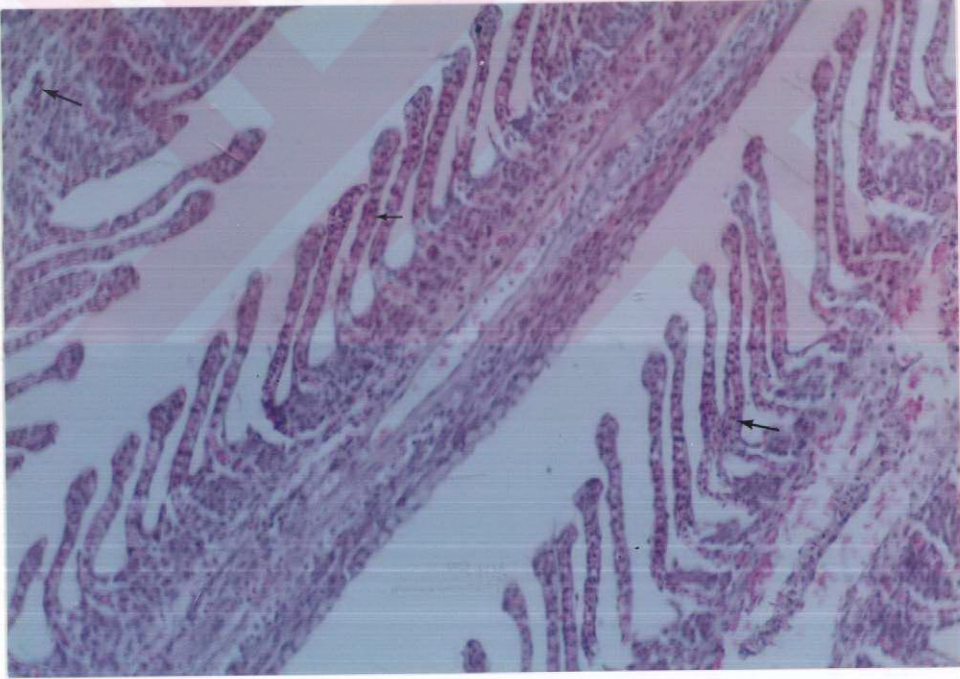
Şekil 4.15. Kontrol grubu alabalıklarından alınan kas kesiti, Toluidine blue, X200. a. enine kas fibrilleri, b. kas hücresi çekirdeği.



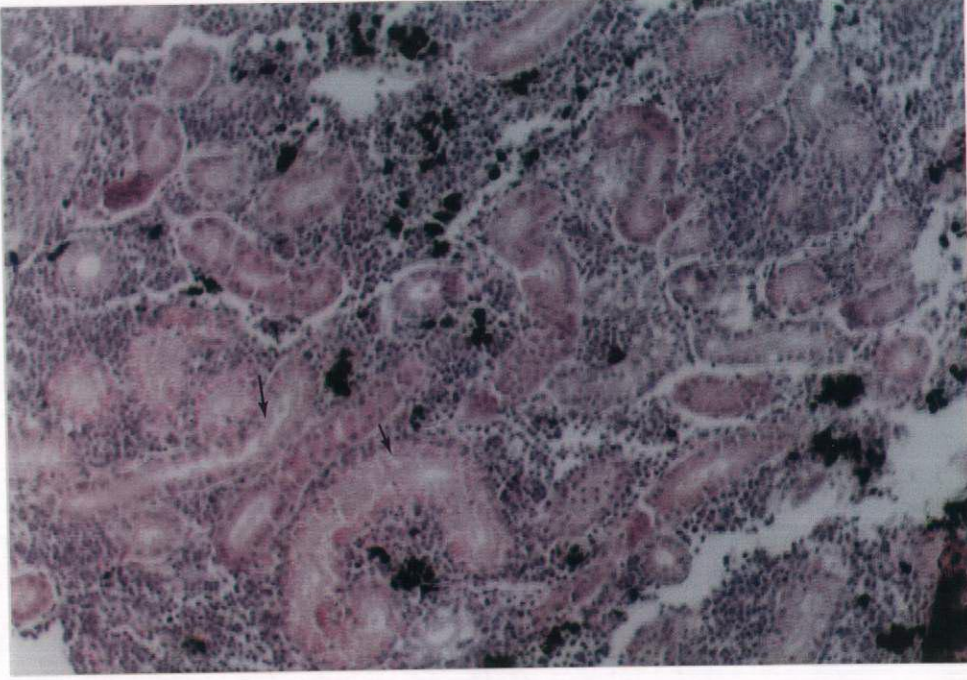
Şekil 4.16. Kontrol grubu alabalıklarından alınan böbrek kesiti, Toluidine blue, X200. a. tubulus, b. intersititiel bölge.

4.2.1.2. Solungaçlarına Sürme Yolu İle Enfekte Edilen Alabalıklar

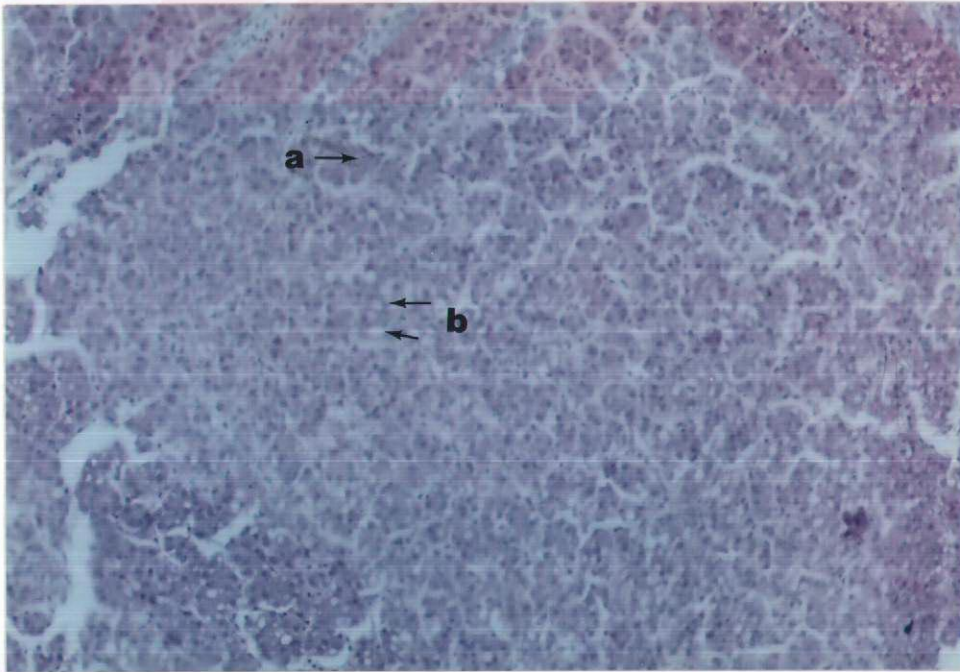
Solungaçların primer ve sekonder lamellalarında hiperemi ve hemoraji, bazı bölgelerinde hafif yangısal hücre infiltrasyonları dikkati çekti (Şekil 4.17). Böbrek tubulus epitellerinde parankim dejenerasyonu, nekroz ve bowman kapsülünün epitelyumunda desquamasyon gözlemlendi (Şekil 4.18). Karaciğerde hiperemi, sinuzoidlerde genişleme ve içlerinin eritrositlerle dolu olduğu belirlendi. Hepatositlerde yağ dejenerasyonu, nekroz ve kuppfer hücre aktivasyonu tespit edildi (Şekil 4.19). Pankreas, bağırsak ve midede mikroskobik olarak önemli herhangi bir patolojik bulguya rastlanılmadı.



Şekil 4.17. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıkların solungaçlarına sürme yolu ile enfekte edilmesi sonucunda solungaçların primer ve sekonder lamellalarında hemoraji, H&E, X200.



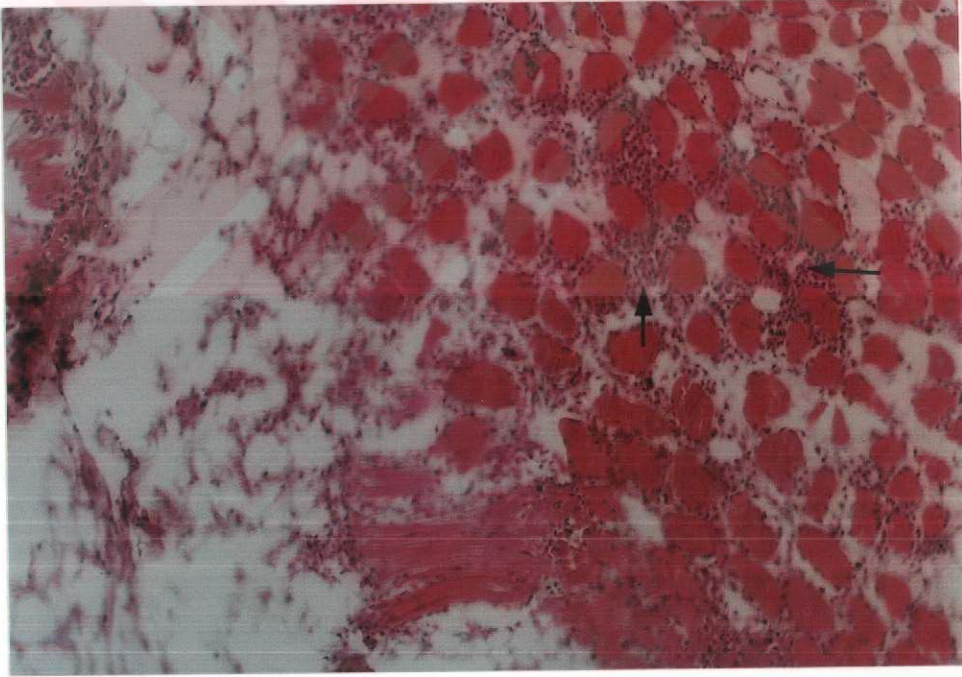
Şekil 4.18. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıkların solungaçlarına sürme yolu ile enfekte edilmesi sonucunda böbrek tubulus epitellerindeki parankim dejenerasyonu ve nekrozu, H&E, X200.



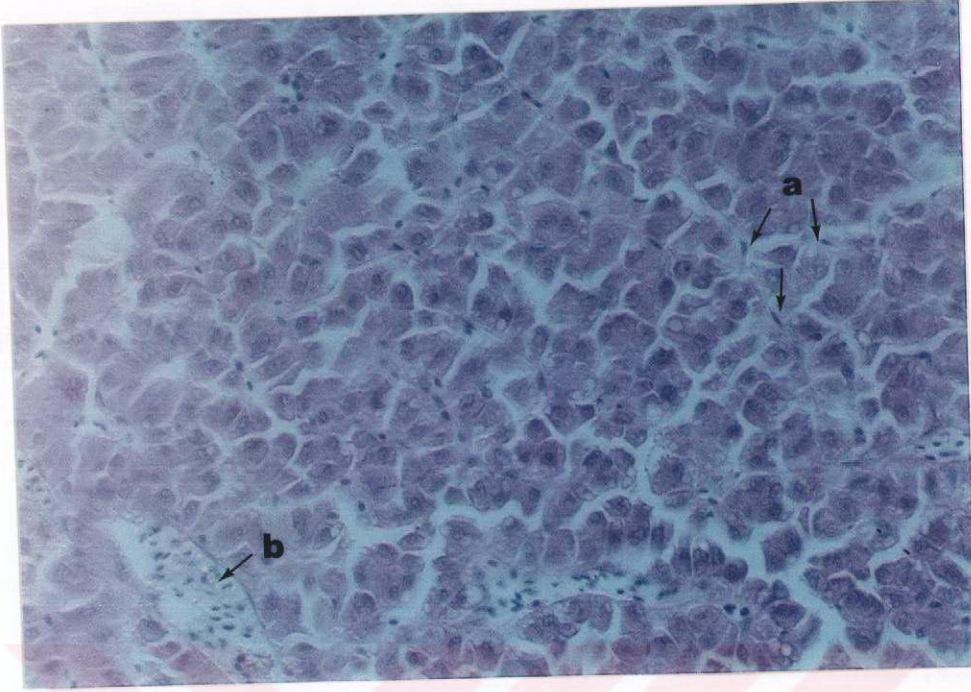
Şekil 4.19. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıkların solungaçlarına sürme yolu ile enfekte edilmesi sonucunda karaciğer hepatositlerindeki a. nekroz, b. yağ dejenerasyonu, H&E, X200.

4.2.1.3. İntraperitoneal Enjeksiyon Yolu İle Enfekte Edilen Alabalıklar:

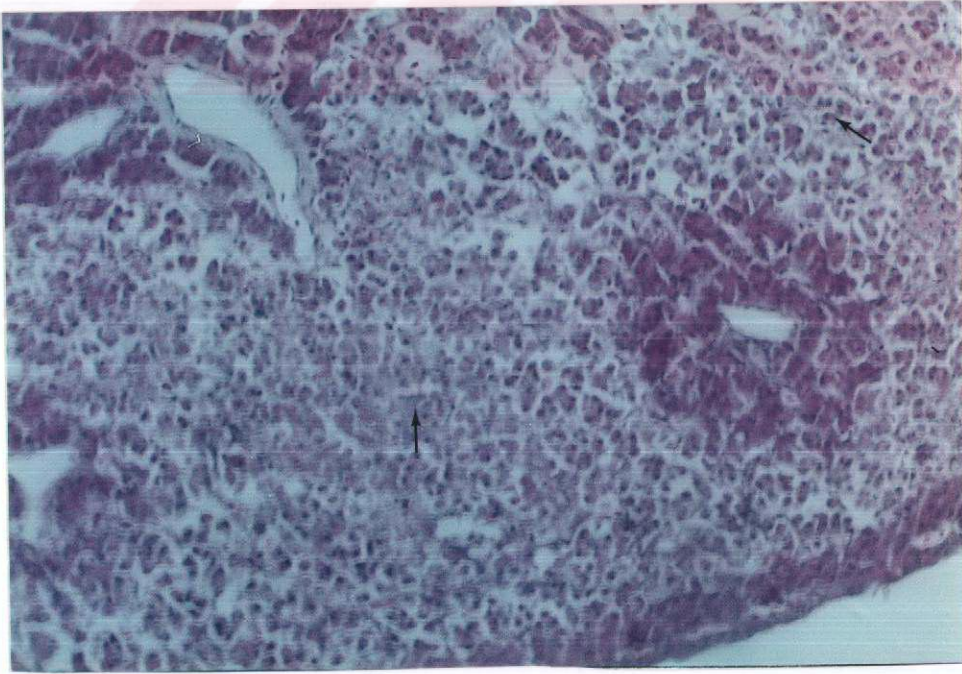
Kasta ve derinin epidermal tabakasında ekstrasellüler ödem, dermiste hiperemi, konjesyon ve intersitisyel tabakada mononükleer hücre infiltrasyonu gözlemlendi (Şekil 4.20). Karaciğer parankiminde fokal veya diffuz nekroz alanları ile bu alanların çevresinde fibroblast ve kuppfer hücre aktivasyonu saptandı (Şekil 4.21). Bazı balıklarda hiperemi yine bazı balıkların karaciğerinde de portal damarlar çevresinde lenfosit infiltrasyonları tespit edildi. Hepatositlerde yağ dejenerasyonu ve koagulasyon nekroz belirlendi (Şekil 4.22). Böbrek tubulus epitellerinde vakuolar dejenerasyon, nekroz ve yer yer desquamasyon (Şekil 4.23), bazı tubulus epitellerinde ise hyalin damlacıkları bulundu (Şekil 4.24). Pankreas, bağırsak ve midede mikroskopik olarak önemli herhangi bir bulguya rastlanılmadı.



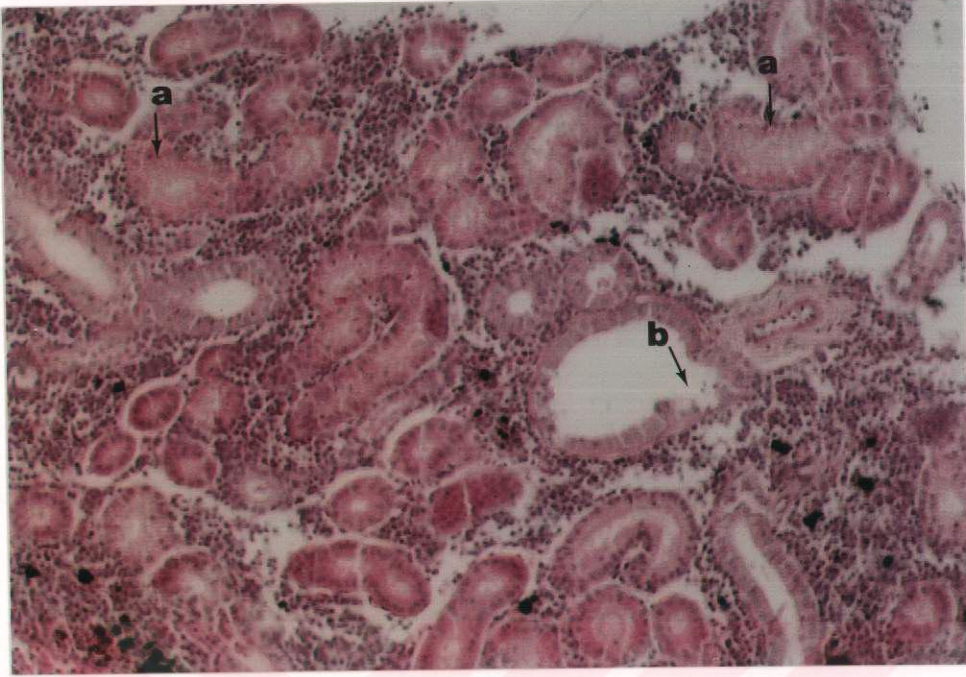
Şekil 4.20. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda kasın intersitisyel tabakasındaki mononükleer hücre infiltrasyonu, H&E, X200.



Şekil 4.21. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda karaciğerde görülen a. kuppfer hücre aktivasyonu, b. hiperemi , H&E, X200.



Şekil 4.22. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda karaciğer hepatositlerindeki diffüz nekroz alanları, H&E, X200.



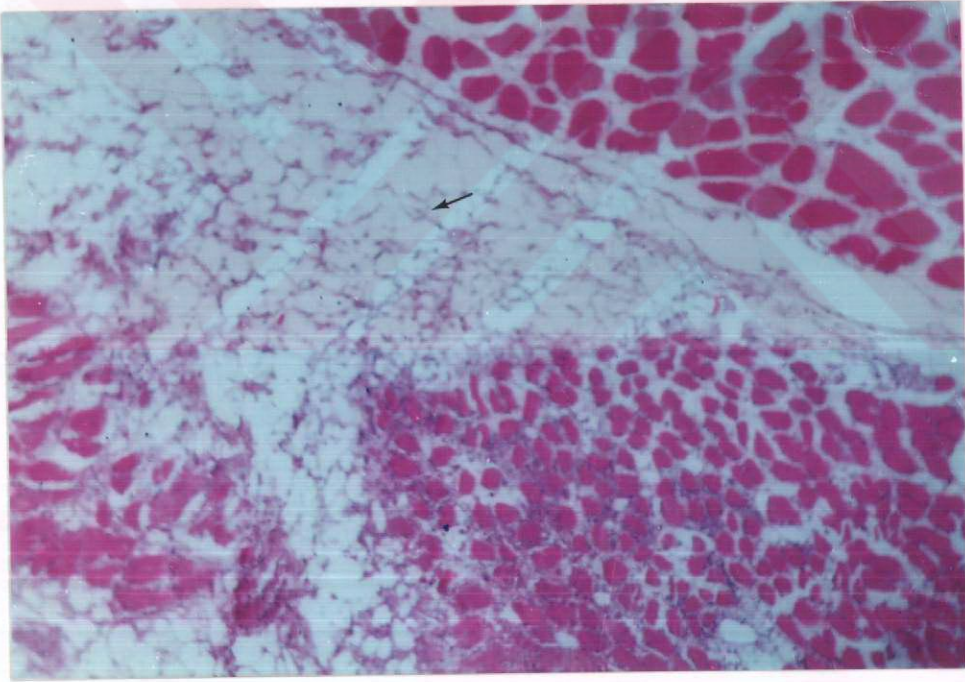
Şekil 4.23. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda böbrek tubulus epitellerindeki a. parankim dejenerasyonu, b. desquamasyon, H&E, X200.



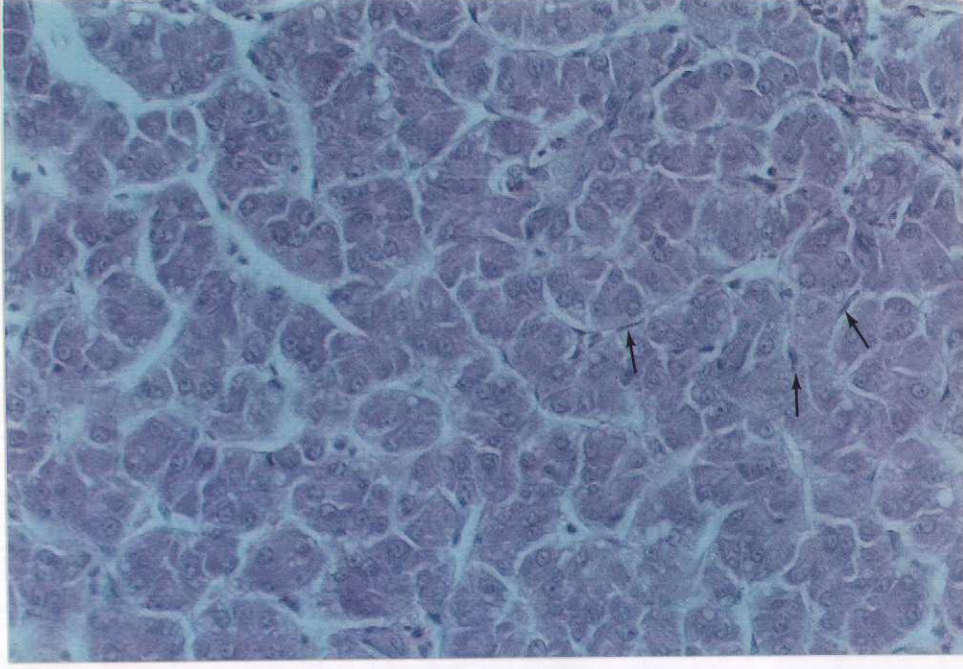
Şekil 4.24. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda böbrek tubulus epitellerindeki hyalin damlacıkları, Toluidine blue, X200.

4.2.1.4. İntramüsküler Enjeksiyon Yolu İle Enfekte Edilen Alabalıklar:

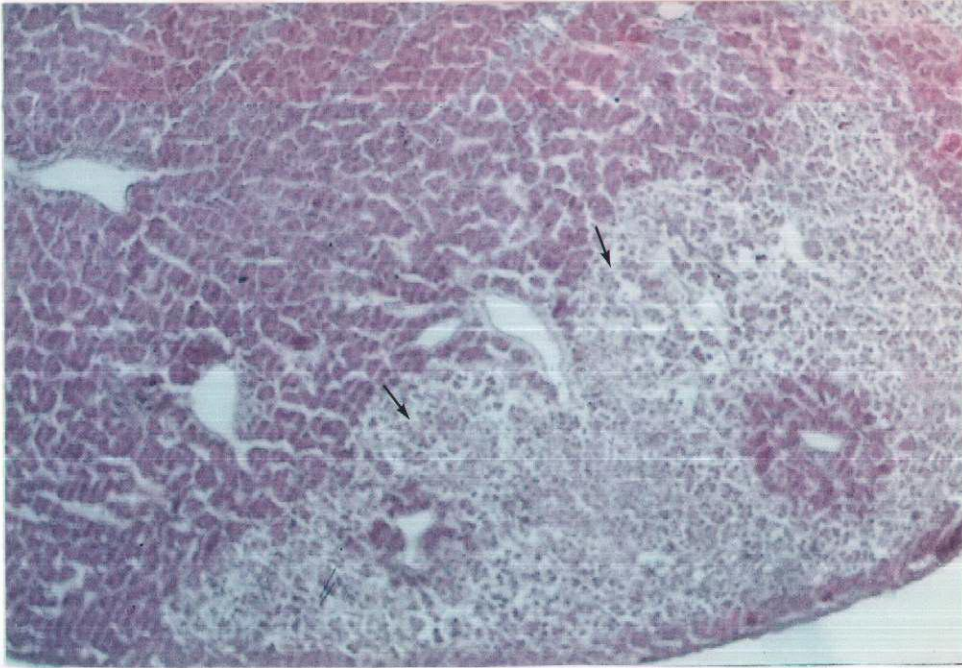
İntramüsküler enjeksiyonda balıkların subdermal kas demetlerinin nekroza uğradığı, myofibriller arasında yaygın ödem ve kanamayla birlikte yangısal hücre infiltrasyonlarının olduğu tespit edildi. Aynı bölgede bazı kas gruplarında dejenerasyon ve nekroz belirlendi (Şekil 4.25). Karaciğerde hiperemi, sinuzoidal dilatasyon ve hemoraji gözlemlendi. Hepatositlerde yağ dejenerasyonu, nekroz ve kuppfer hücre aktivasyonu göze çarptı (Şekil 4.26, Şekil 4.27). Böbreklerin tubulus epitellerinde dejenerasyon, nekroz ve desquamasyon dikkati çekti (Şekil 4.28). Pankreas, bağırsak ve midede önemli bir patolojik bulgu saptanamadı.



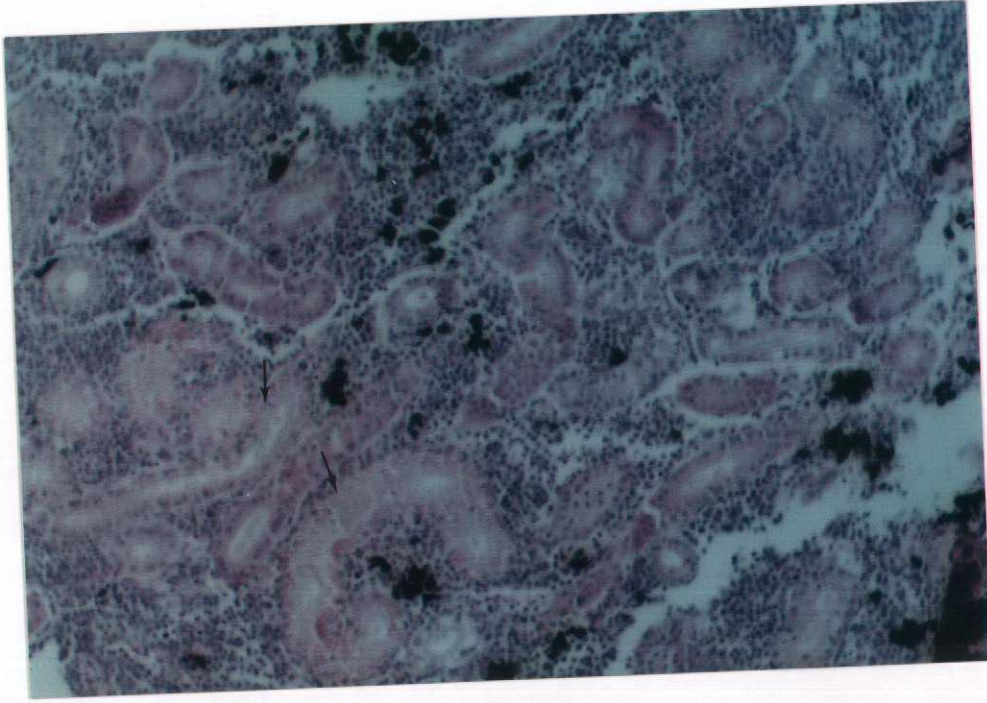
Şekil 4.25. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda myofibriller arasındaki yaygın ödem, H&E, X200.



Şekil 4.26. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda karaciğer hepatositlerindeki kuppfer hücre aktivasyonu, H&E, X200.



Şekil 4.27. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda karaciğer hepatositlerindeki geniş nekroz alanları, H&E, X100.



Şekil 4.28. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda böbreklerin tubulus epitellerindeki dejenerasyon ve nekroz, H&E, X200.

4.2.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.2.2.1. Kontrol Grubu

4.2.2.1.1. Glukagon

Glukagon-immunoreaktif (IR) hücelere midede rastlanılmadı. İnce bağırsak ve pankreasta glukagon taşıyan endokrin hüceleri belirlendi. Bu hücrelerin ince bağırsağın epitel kıvrımlarında lamina epiteliyalisin lateral yüzeylerinin ve bazale yakın bölgelerinde, prizmatik epitel hücrelerin de bazale doğru bölümünde yer aldığı saptandı (Şekil 4.29).

Pankreastaki glukagon içeren hücreler langerhans adacıklarında gözlemlendi (Şekil 4.30).

4.2.2.1.2. Gastrin

Gastrin içeren endokrin hücelere sadece midenin pylorik bölgesinde rastlandı. Bu hücreler, genellikle epitel kıvrımların lamina epiteliyalisinin lateral ve dip kısımlarına doğru ve epitel oluşturulan prizmatik hücrelerin lateralinde belirlendi. Bazen lamina propriyadaki bezlerde de tespit edildi. Bezlerdeki gastrin IR gösteren hücreler, bezi meydana getiren

prizmatik hücrelerin bazaline doğru yerleşti (Şekil 4.31). Gastrin IR hücelere bağırsak ve kardiak midede rastlanmadı.

4.2.2.1.3. Substans P

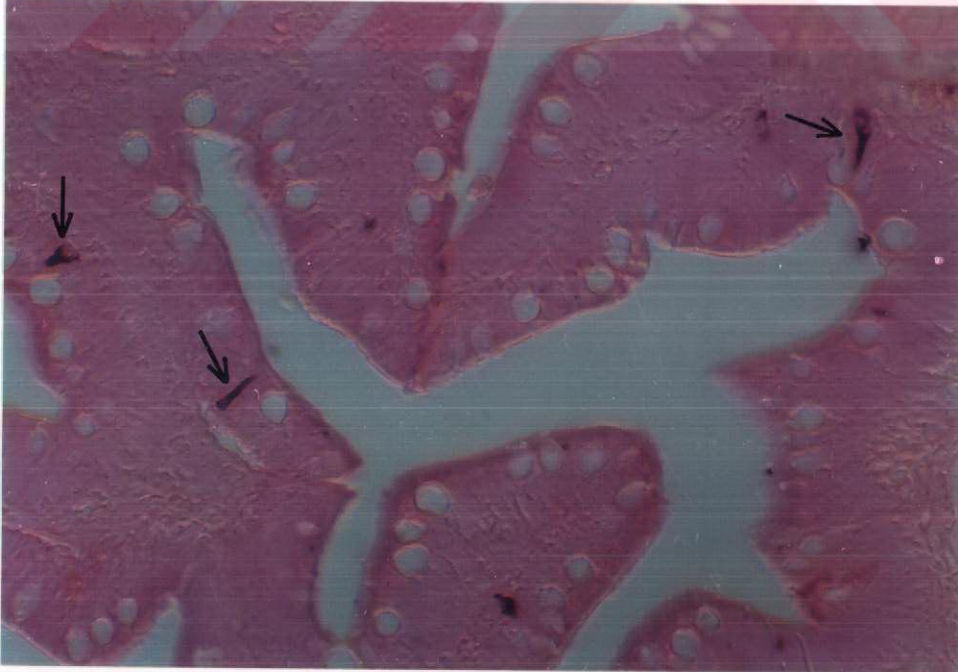
Midenin pilorik bölümünde (Şekil 4.32) ve ince bağırsakta (Şekil 4.33) substans P immunoreaktivitesi gösteren endokrin hücelere rastlandı. Bu hücreler de epiteliyal kıvrımların lamina epiteliyalisinin bazal kısımlarına doğru olan bölümlerinde, epiteli oluşturan hücrelerin arasında tespit edildi. Bazen epiteliyalisin altındaki lamina propriyada bulunan bezlerde de substans P immunoreaktivitesi gözlemlendi.

4.2.2.1.4. İnsülin

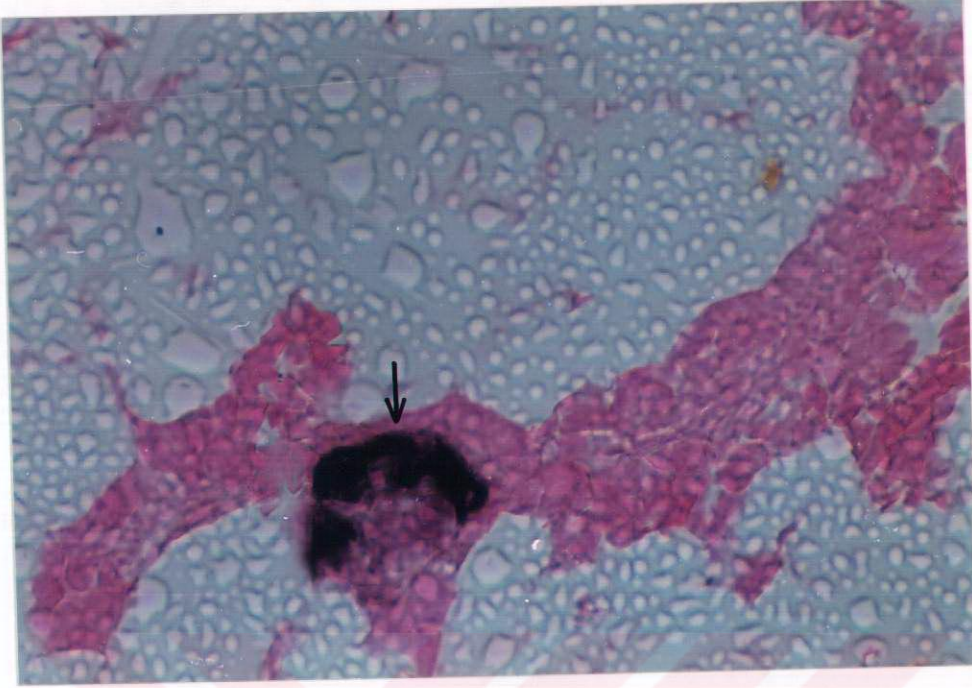
İnsülin içeren endokrin hüceleri sadece pankreasta belirlendi (Şekil 4.34). Mide ve bağırsaklarda insülin IR'ne rastlanılmadı.

4.2.2.1.5. Calbindin

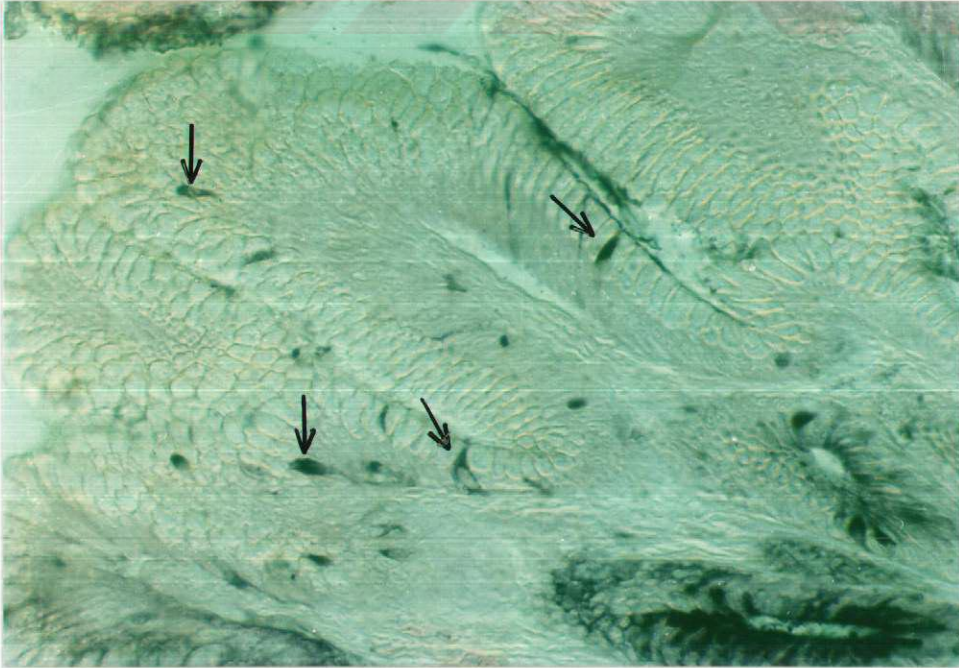
Calbindin immunoreaktif endokrin hücelere mide, bağırsak ve pankreasta tespit edilemedi.



Şekil 4.29. Kontrol grubu alabalıkların ince bağırsağındaki glukagon immunoreaktif (IR) hücreleri, IHK, X400.

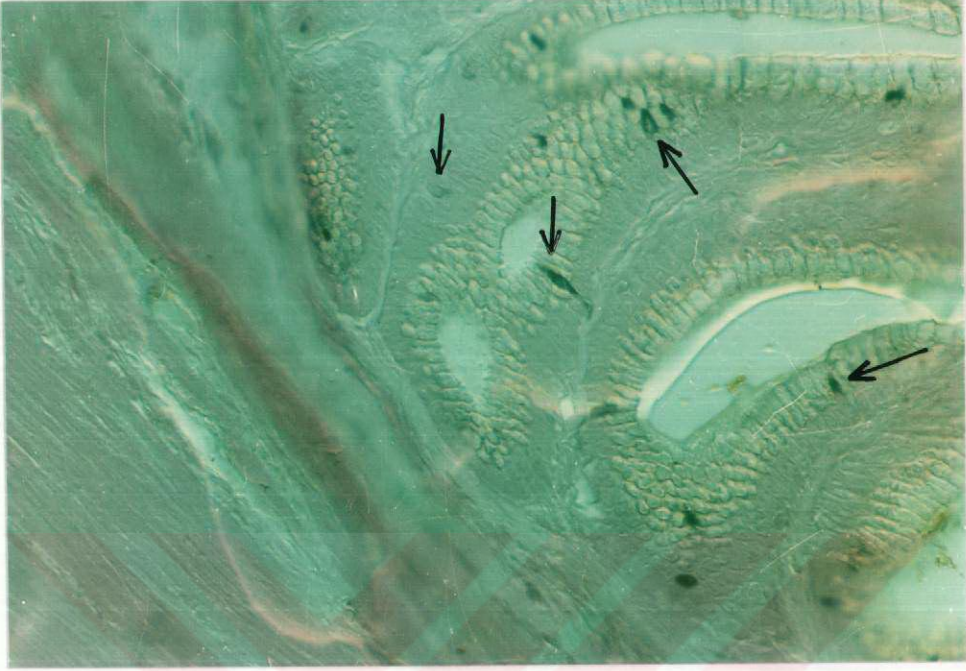


Şekil 4.30. Kontrol grubu alabalıkların pankreas langerhans adacıklarında bulunan glukagon IR hücreleri, İHK, X400.

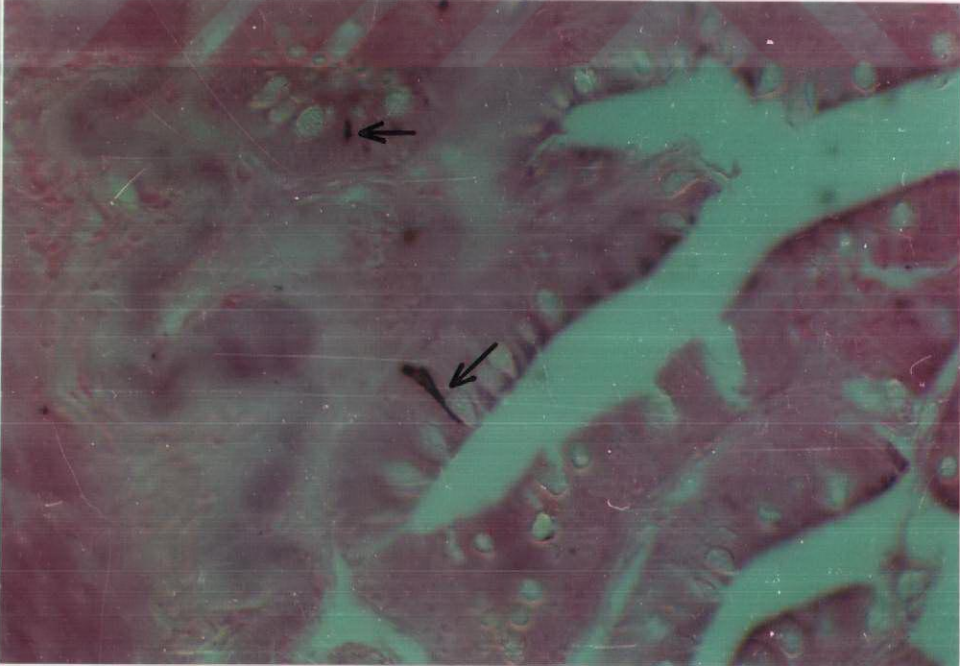


Şekil 4.31. Kontrol grubu alabalıkların pilorik midesindeki gastrin IR hücreleri, İHK, X400.

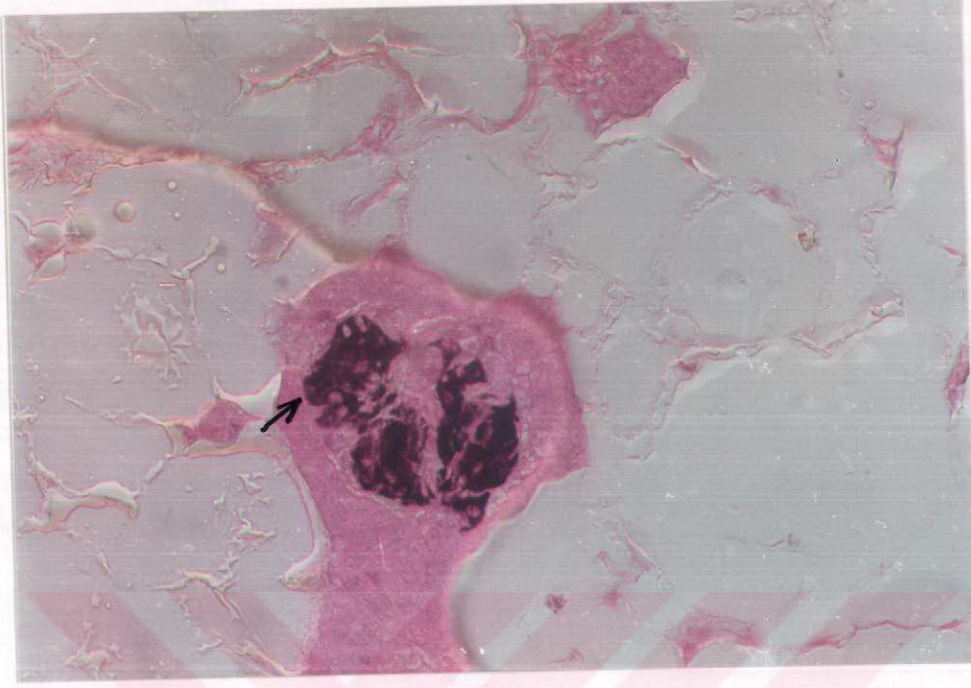
T.C. VİKESTİ
DOĞUŞU



Şekil 4.32. Kontrol grubu alabalıkların pilorik midesindeki substans P IR hücreleri, İHK, X400.



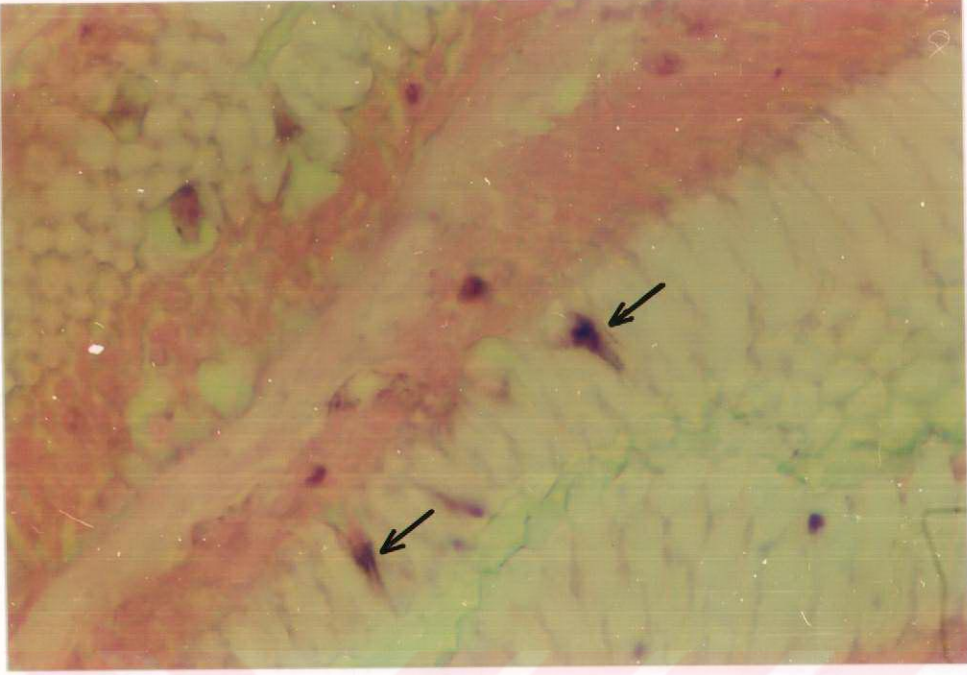
Şekil 4.33. Kontrol grubu alabalıkların ince bağırsağındaki substans P IR hücreleri, İHK, X400.



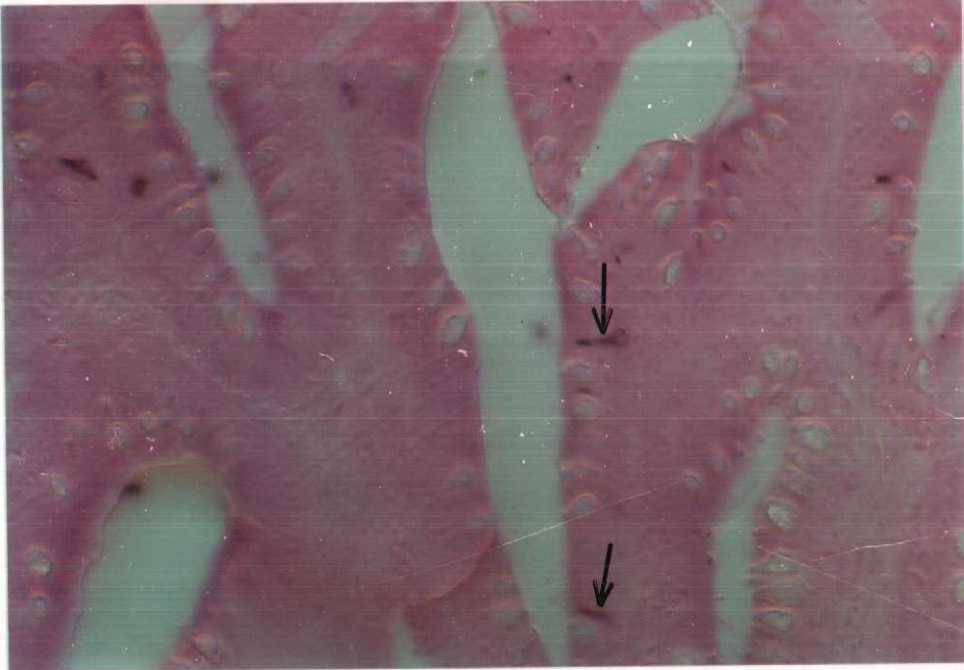
Şekil 4.34. Kontrol grubu alabalıkların pankreasındaki insülin IR hücreleri, İHK, X400.

4.2.2.2. Deney Grupları

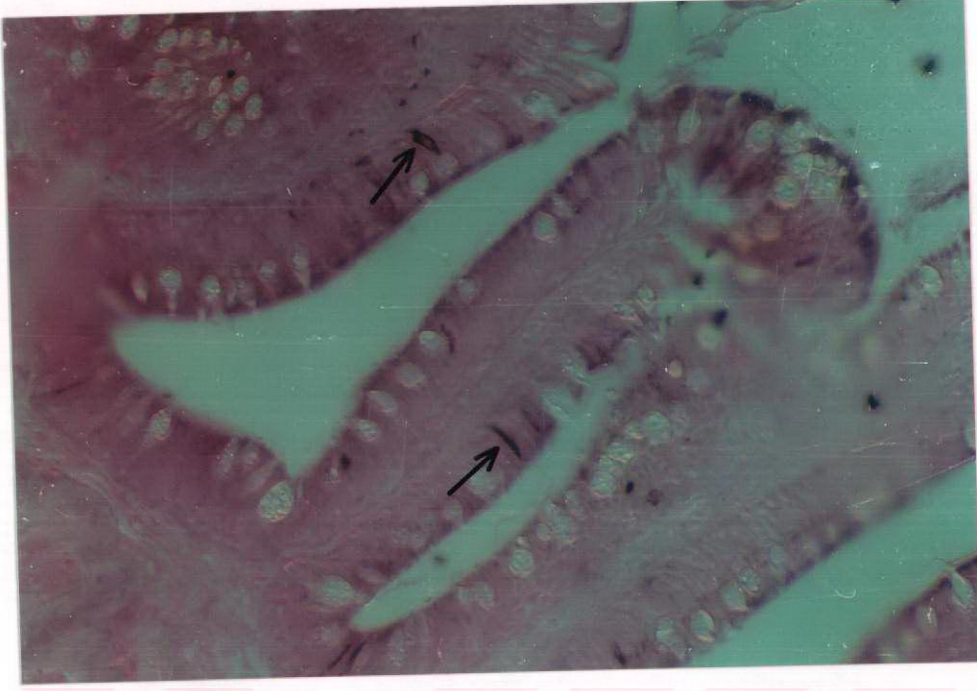
Solungaçlarına sürme, intraperitoneal ve intramüsküler enjeksiyon yolu ile enfeksiyon oluşturulan alabalık gruplarının mide, bağırsak ve pankreasında gözlemlenen glukagon immunoreaktif (IR) (Şekil 4.35-4.40), gastrin IR (Şekil 4.41-4.43) ve insülin IR'si (Şekil 4.44-4.46) kontrol grubundaki bulgularla aynı bulundu. Fakat kontrol grubundaki Pilorik mide ve ince bağırsakta belirlenen substans P IR deney gruplarında saptanamadı.



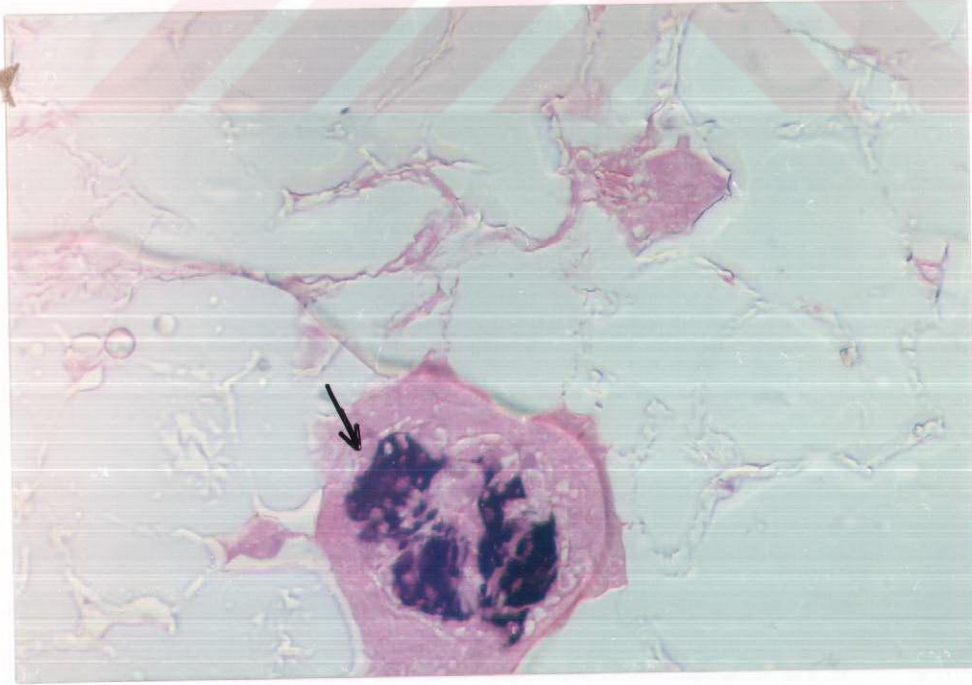
Şekil 4.35. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıkların solungaçlarına sürme yolu ile enfekte edilmesi sonucunda ince bağırsaktaki glukagon IR hücreleri, İHK, X400.



Şekil 4.36. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda ince bağırsaktaki glukagon IR hücreleri, İHK, X400.



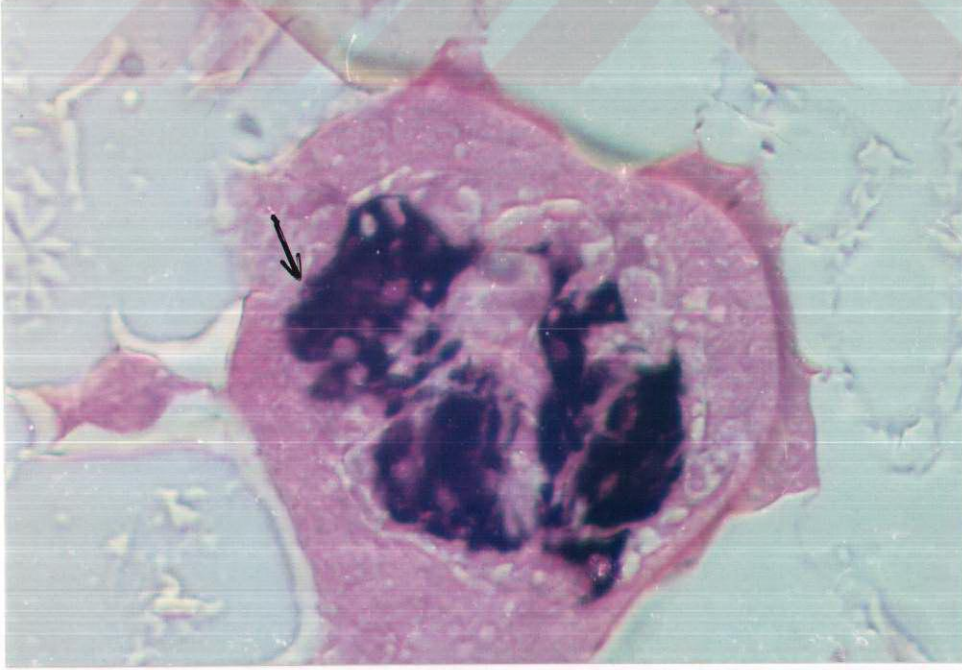
Şekil 4.37. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda ince bağırsaktaki glukagon IR hücreleri, İHK, X400.



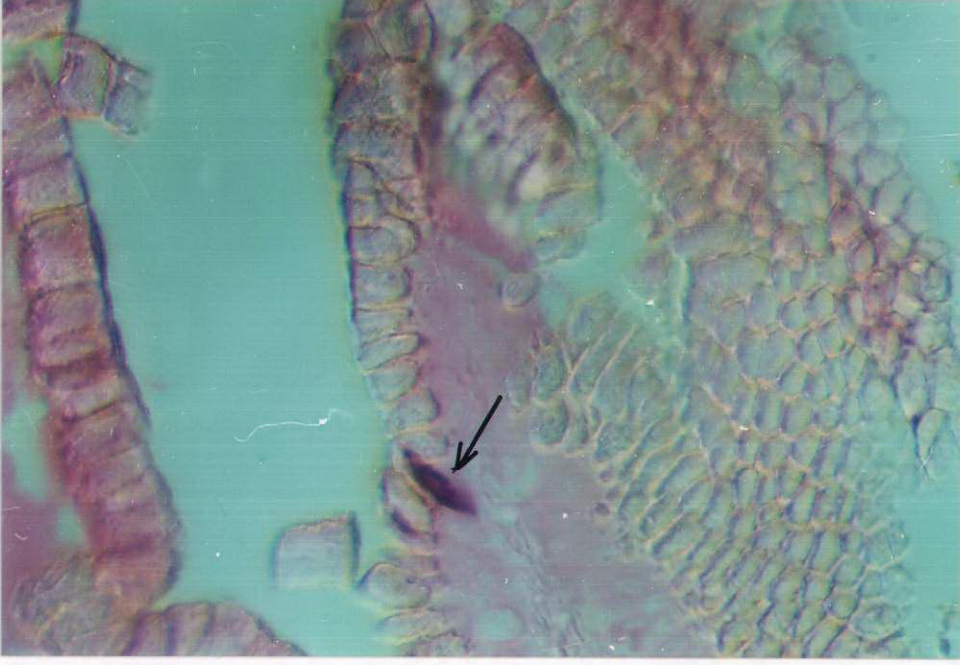
Şekil 4.38. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıkların solungaçlarına sürme yolu ile enfekte edilmesi sonucunda pankreasın langerhans adacıklarındaki glukagon IR hücreleri, İHK, X400.



Şekil 4.39. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda pankreasın langerhans adacıklarındaki glukagon IR hücreleri, İHK, X400.



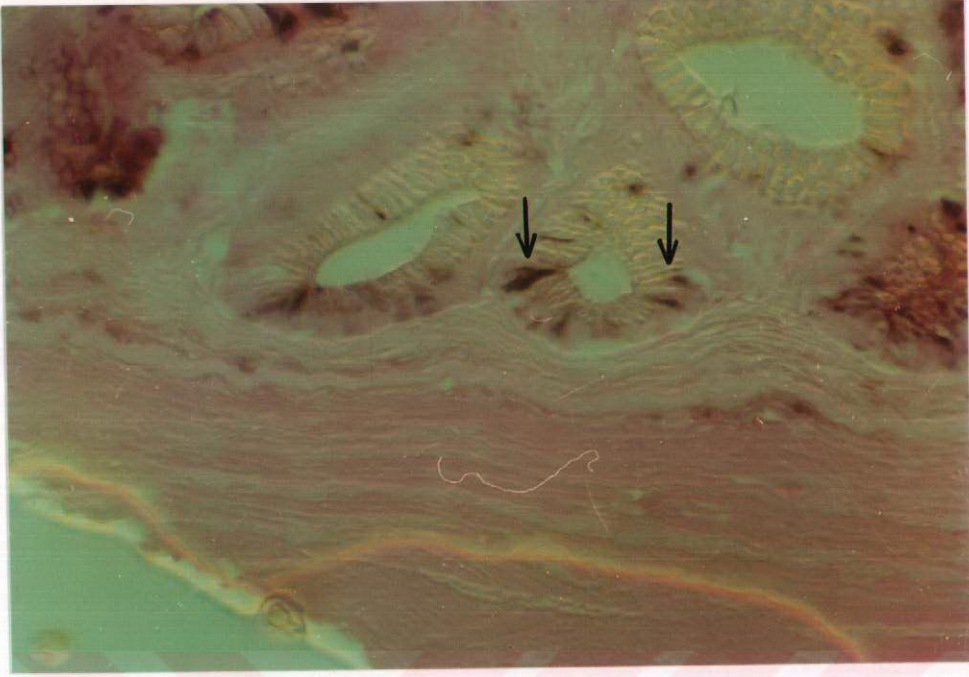
Şekil 4.40. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda pankreasın langerhans adacıklarındaki glukagon IR hücreleri, İHK, X400.



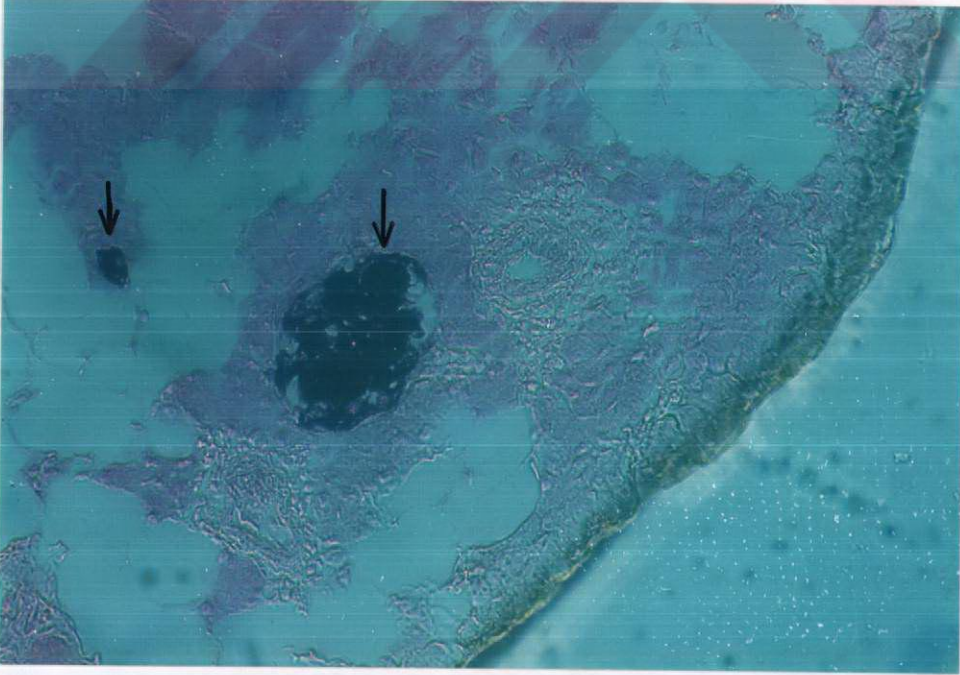
Şekil 4.41. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıkların solungaçlarına sürme yolu ile enfekte edilmesi sonucunda pilorik midedeki gastrin IR hücreleri, İHK, X400.



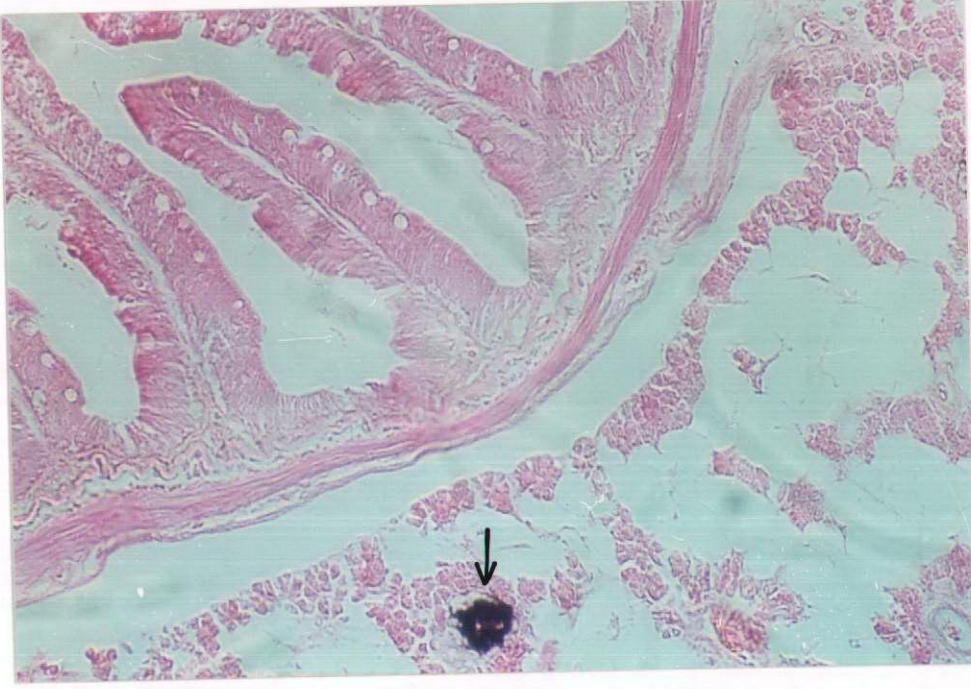
Şekil 4.42. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda pilorik midedeki gastrin IR hücreleri, İHK, X400.



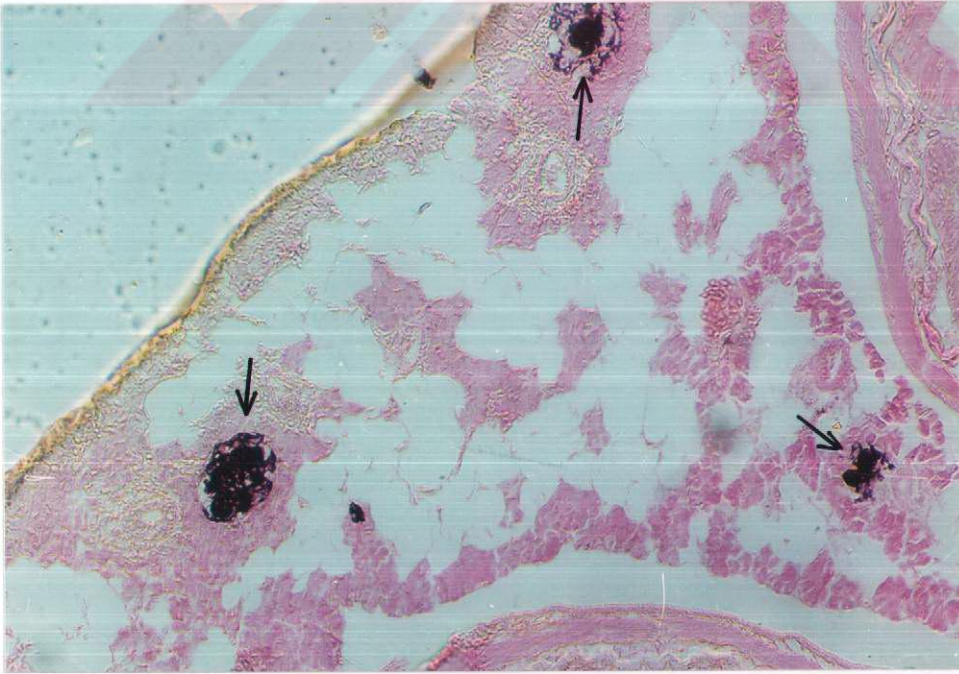
Şekil 4.43. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda pilorik midedeki gastrin IR hücreleri, İHK, X400.



Şekil 4.44. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıkların solungaçlarına sürme yolu ile enfekte edilmesi sonucunda pankreasın langerhans adacıklarındaki insülin IR hücreleri, İHK, X400.



Şekil 4.45. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intraperitoneal enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda pankreasın langerhans adacıklarındaki insülin IR hücreleri, İHK, X200.



Şekil 4.46. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıklara intramüsküler enjeksiyon yolu ile enfekte edilmesi sonucunda pankreasın langerhans adacıklarındaki insülin IR hücreleri, İHK, X200.

4.2.3. Elektron Mikroskopik Bulgular

4.2.3.1. Kontrol Grubu

Karaciğer hücresinde nukleusun iri ve hücrenin ortasında yer aldığı ve sitoplazmanın önemli bir kısmını işgal ettiği belirlendi. Nukleusun etrafında çift katlı bir zar yapısı mevcuttu. Nukleus içinde diffuz kromatin dağılımı ve nukleolus tespit edildi (Şekil 4.47). Oval şekilli mitokondriyumlar sitoplazma içine dağılmış durumda görüldü. Sitoplazma içinde bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum az miktarda da granülsüz endoplazmik retikulumun yer aldığı saptandı (Şekil 4.48). Hücreler arası bağlantıların düzgün olduğu gözlemlendi (Şekil 4.47).

Kas hücresinde sarkoplazma retikulumu sisternler halinde mevcuttu. Miyozin flamanlarından oluşan A bandları oldukça koyu renkli ve dar bir alanı kaplamıştı. I bandları, A bandlarına kıyasla daha açık renkli ve daha büyük bir alanı içermekteydi. Z bandları ise I bandlarının orta kısmında ve I bandına göre daha koyu bir çizgi halinde gözlemlendi. Büyük mitokondriyumlar belirgindi. Miyofibrillerin ise sarkolemmaya kadar düzgün bir şekilde devam ettiği tespit edildi (Şekil 4.49).

Böbrek hücresinde hücreler arası bağlantıların düzgün olduğu, nukleusun hücrenin ortasına doğru yerleştiği ve sitoplazmanın büyük bir bölümünü kapladığı görüldü (Şekil 4.50). Nukleus zarının çift katlı bir yapısı olduğu dikkati çekti. Nukleusta diffuz kromatin dağılımı ve ortasına doğru nukleolus saptandı. Uzun, yuvarlağımsı ve oval şekilli bol miktarda mitokondriyumlar mevcuttu. Granülsüz endoplazmik retikulum yapıları granüllü endoplazmik retikulum yapılarına göre daha belirgindi (Şekil 4.50). Tubulus epitelinin bazal yüzeyinin bazal membran üzerine düzgün bir şekilde oturduğu görüldü (Şekil 4.51).

Midede prizmatik epitel hücresinin ortasında büyük bir nukleus ve nukleusta diffuz kromatin yapısı belirlendi (Şekil 4.52). Oval biçiminde büyük mitokondriyumların bulunduğu tespit edildi. Sitoplazma içinde endoplazmik retikulum yapıları gözlemlendi. Ayrıca, nukleusa yakın bölgede golgi kompleksinin varlığı dikkati çekti.

Midenin bez epitel hücresinde, nukleusun hücrenin bazaline doğru yerleştiği, çift kat zar yapısına sahip olduğu gözlemlendi. Nukleusta diffuz kromatin yapısı saptandı. Nukleusun ortasına doğru bir nukleolus mevcuttu (Şekil 4.53). Sitoplazma içinde granülsüz endoplazmik retikulum iyi gelişmiş ve belirgindi (Şekil 4.54). Oval ve yuvarlağımsı şekilde bol miktarda mitokondriyumlar vardı. Hücrenin apikal kısmına doğru yerleşmiş çok sayıda salgı

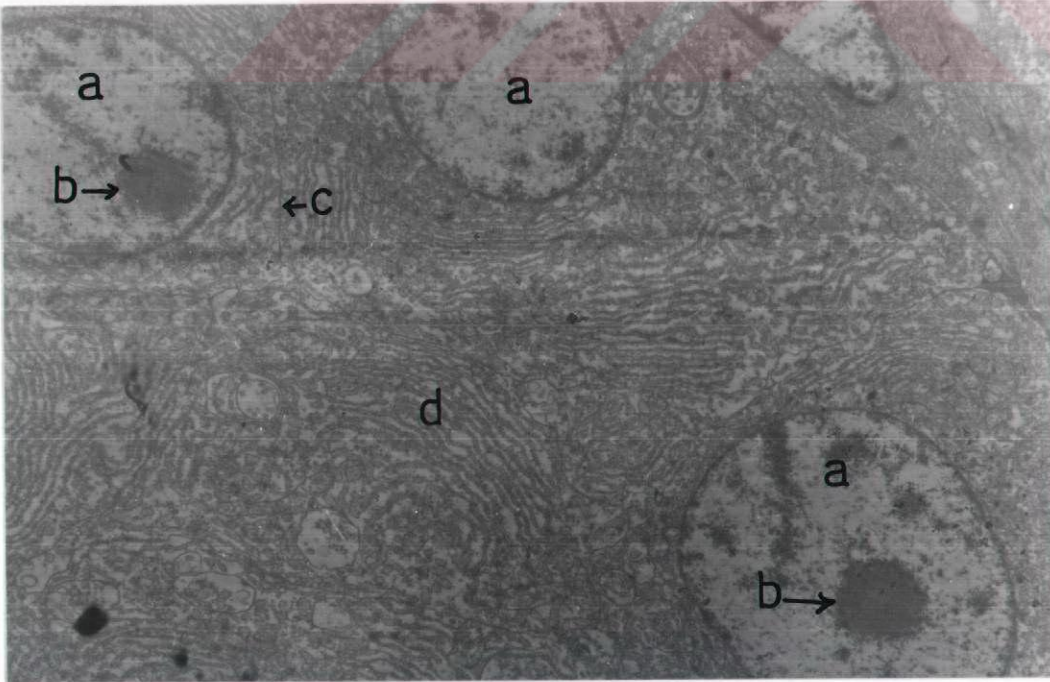
granüllerinin varlığı belirlendi (Şekil 4.53, Şekil 4.54). Ayrıca, hücrenin bazal sınırlarının düzgün olduğu görüldü (Şekil 4.53).

Bağırsak prizmatik epitel hücresinde uzun, oval ve yuvarlağımsı şeklindeki mitokondriyum yapılarının sitoplazmanın büyük bir bölümünü işgal ettiği dikkati çekti (Şekil 4.55). Hücreler arası lateral yüzeyler düzgündü ve bu yüzeylerde dezmozom yapıları mevcuttu. Sitoplazma içerisinde endoplazmik retikulum yapıları tespit edildi. Ayrıca hücrenin apikal kısmında mikrovillus yapıları oldukça belirgin olarak gözlemlendi.

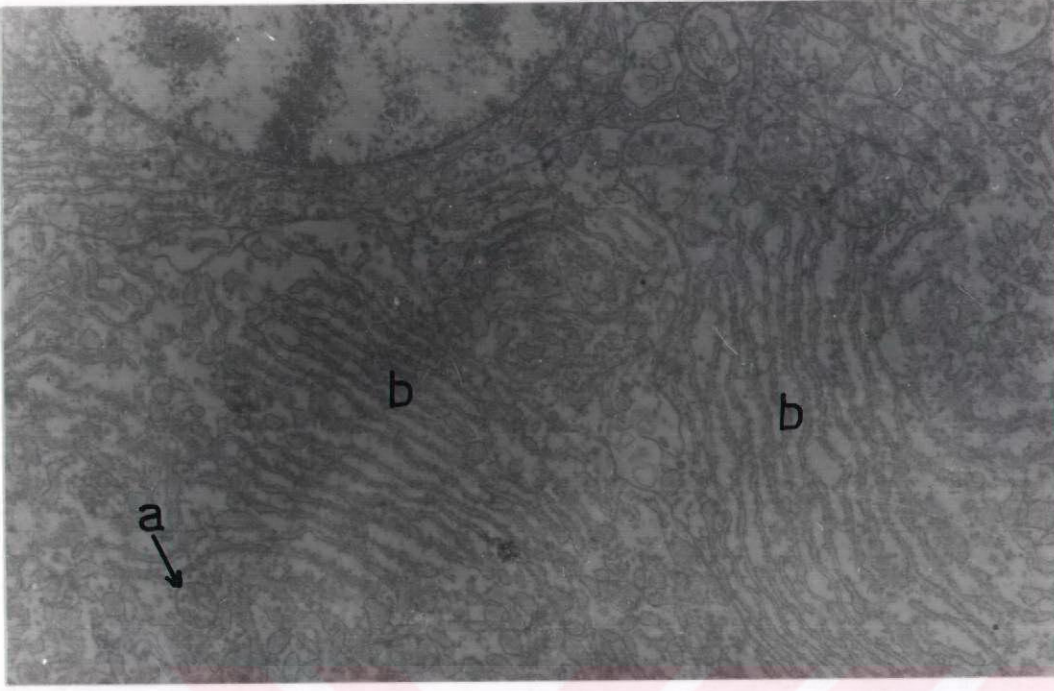
Solungaç pilaster hücrelerinin ortasında koyu renkli iri bir nukleus mevcuttu (Şekil 4.56). Sitoplazmada içinde oval ve yuvarlağımsı mitokondriyumlara rastlandı. Nukleus etrafında granüllü endoplazmik retikulum gözlemlendi. Hücrenin bazal membrandan çift katlı bir zar ile ayrıldığı tespit edildi.

Solungaç kondrosit hücrelerinde nukleusun oldukça büyük, hücrenin önemli bir kısmını oluşturduğu ve etrafında çift katlı bir zar içerdiği görüldü. Nukleusta diffuz kromatin yapısı belirgindi. Sitoplazma içinde oval irili ufaklı mitokondriyumlara tesadüf edildi. Yine, sitoplazma içerisinde granüllü endoplazmik retikulum yapılarının yaygın olduğu gözlemlendi (Şekil 4.57).

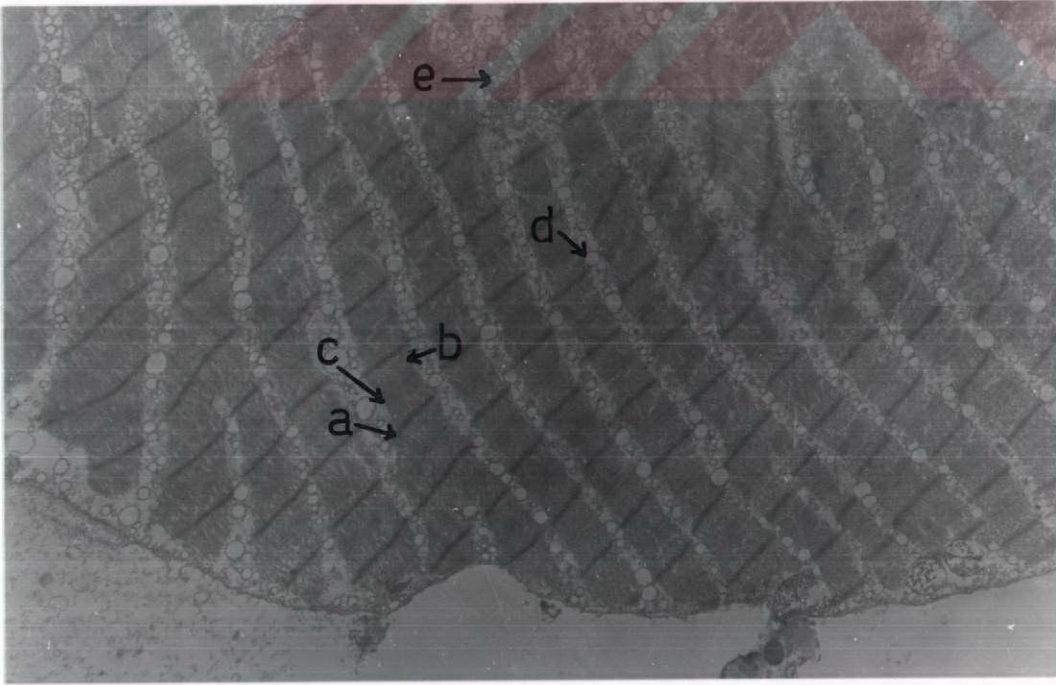
Solungaçta belirlenen diğer bir hücre olan eritrositte de hücrenin ortasında büyük bir nukleusun bulunduğu tespit edildi. Nukleusun diffuz kromatin yapısına sahip olduğu belirgindi. Sitoplazma içinde birkaç adet mitokondriyuma rastlandı (Şekil 4.58).



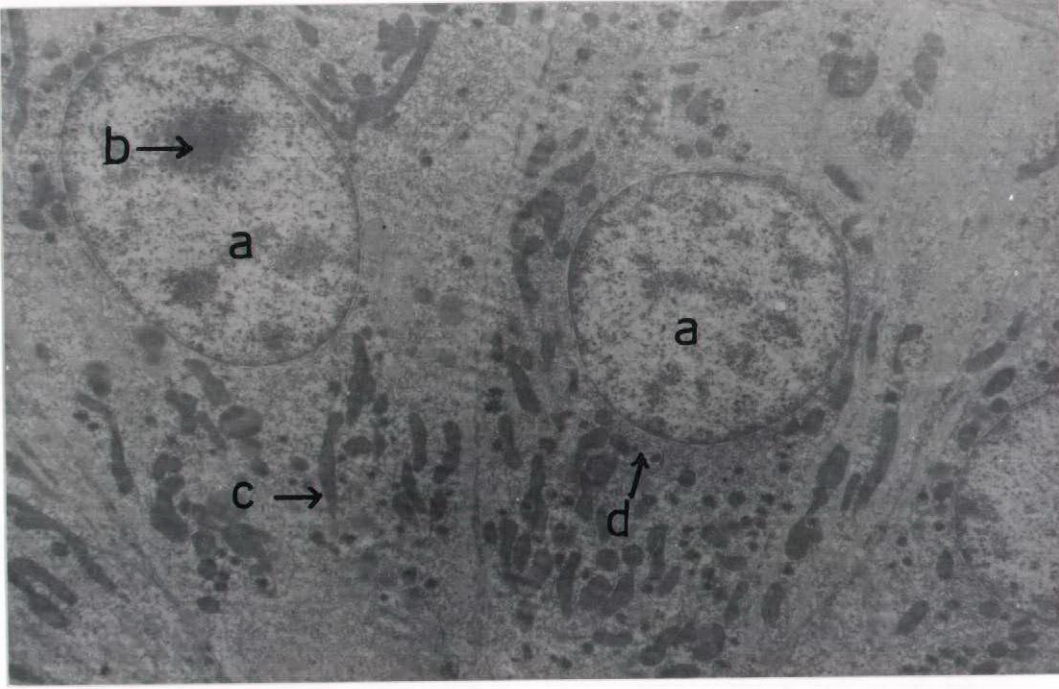
Şekil 4.47. Kontrol grubu alabalıkların karaciğer epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. nukleus, b. nukleolus, c. hücreler arası bağlantı, d. granüllü endoplazmik retikulum.



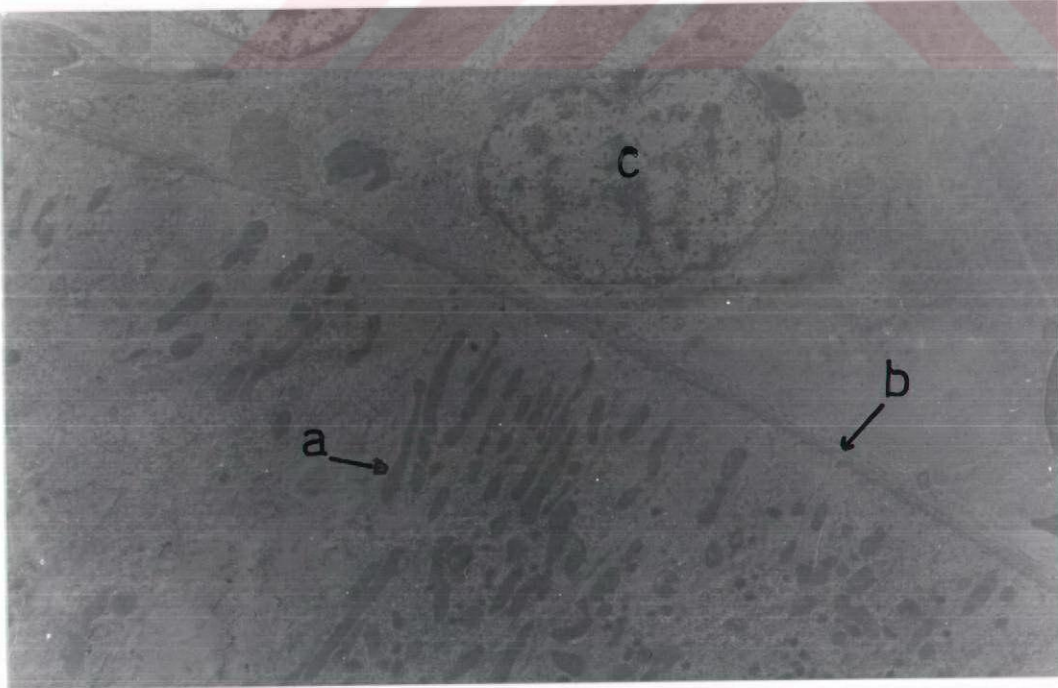
Şekil 4.48. Kontrol grubu alabalıkların karaciğer epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X7000. a. mitokondriyum, b. granüllü endoplazmik retikulum.



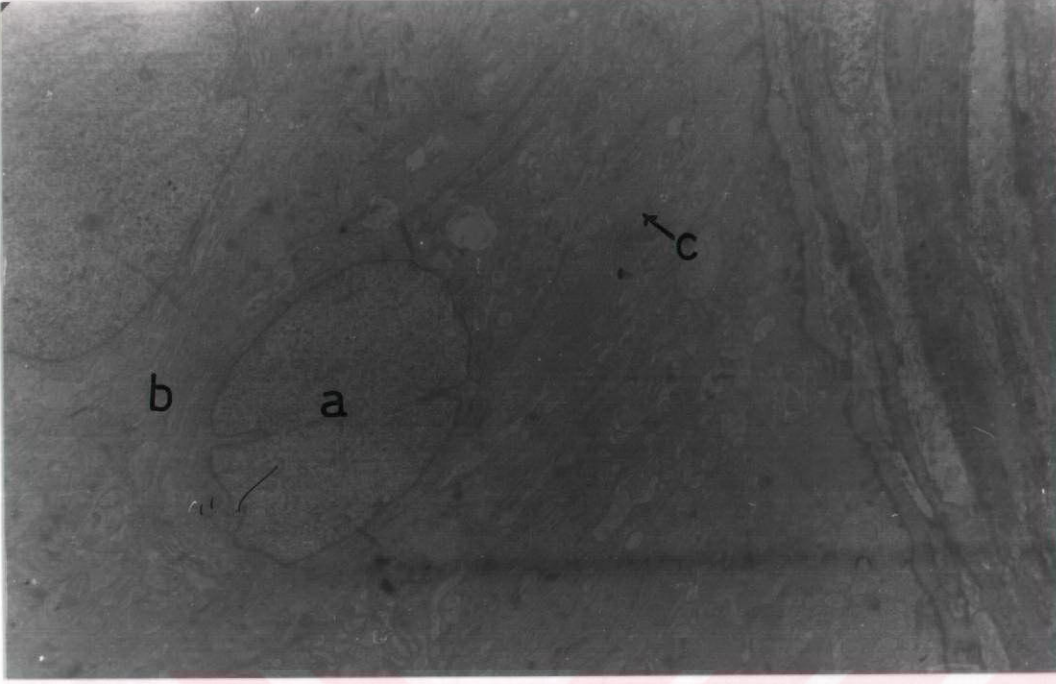
Şekil 4.49. Kontrol grubu alabalıkların kas hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. A bandı, b. I bandı, c. Z bandı, d. sarkoplazma retikulum sisternaları, e. mitokondriyum.



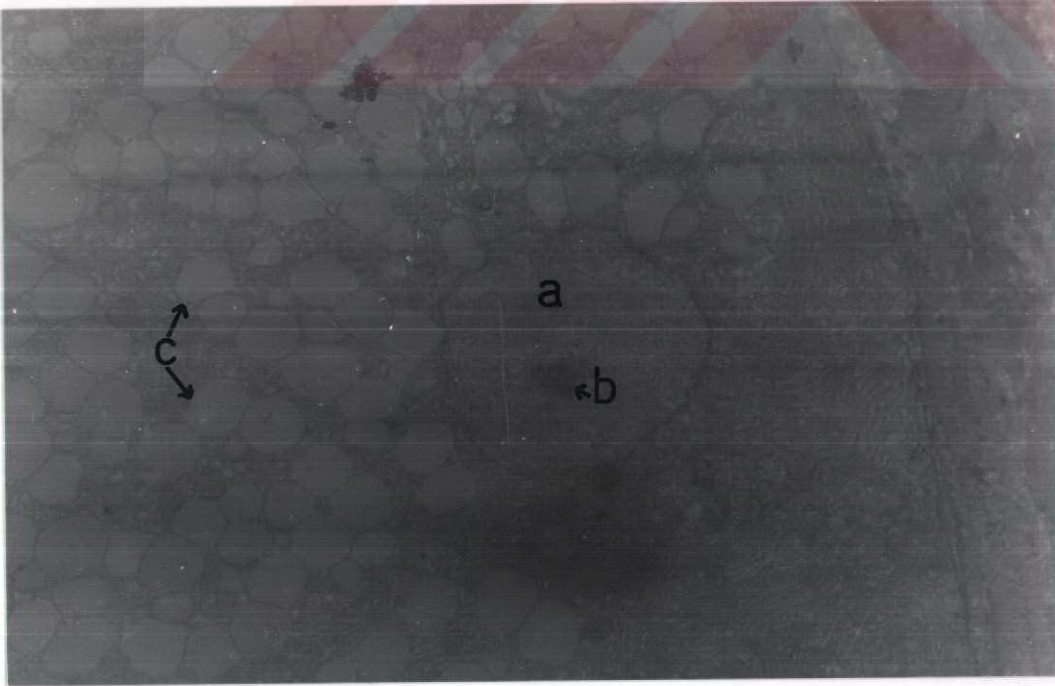
Şekil 4.50. Kontrol grubu alabalıkların böbrek tubulus epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. nukleus, b. nukleolus, c. mitokondriyum, d. granülsüz endoplazmik retikulum.



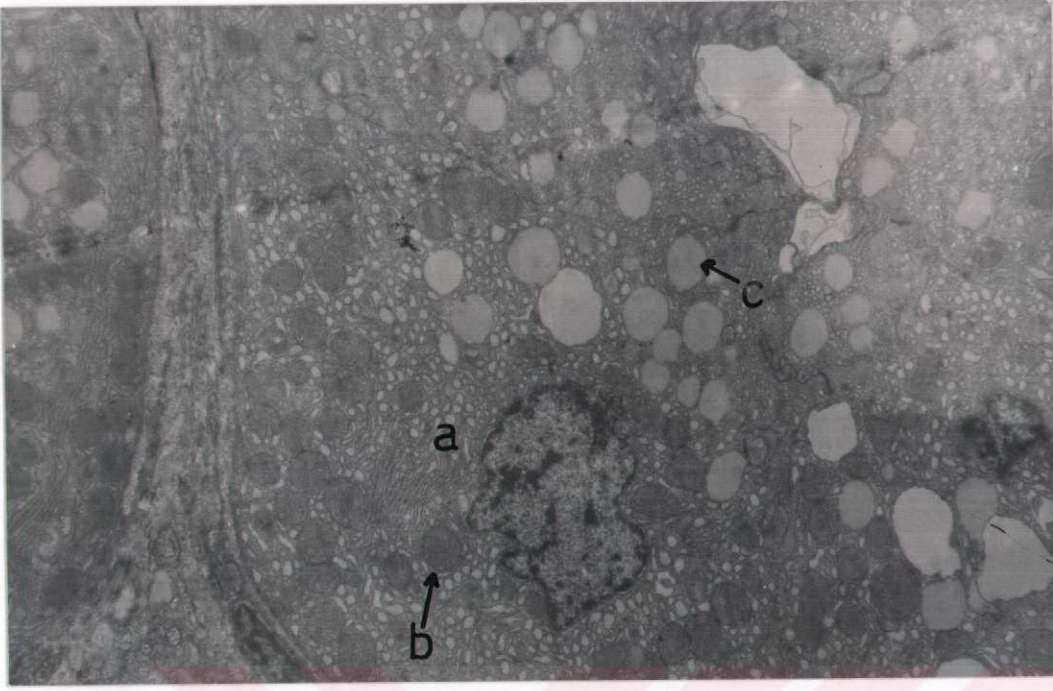
Şekil 4.51. Kontrol grubu alabalıkların böbrek tubulus epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. mitokondriyum, b. bazal membran, c. nukleus.



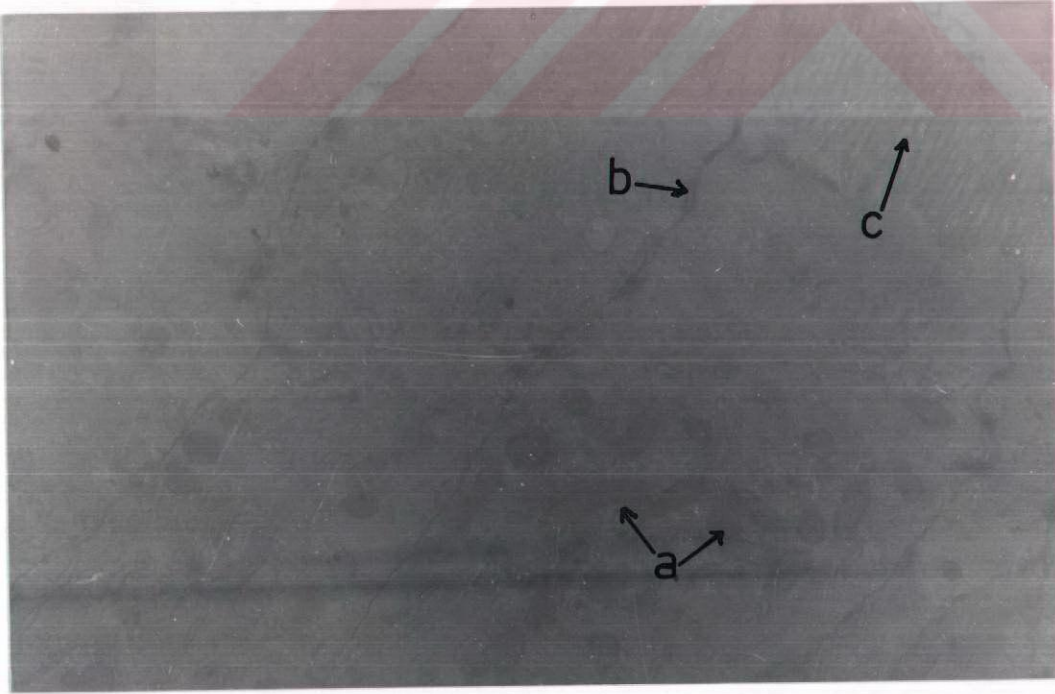
Şekil 4.52. Kontrol grubu alabalıkların mide prizmatik epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. nukleus, b. endoplazmik retikulum, c. golgi kompleksi.



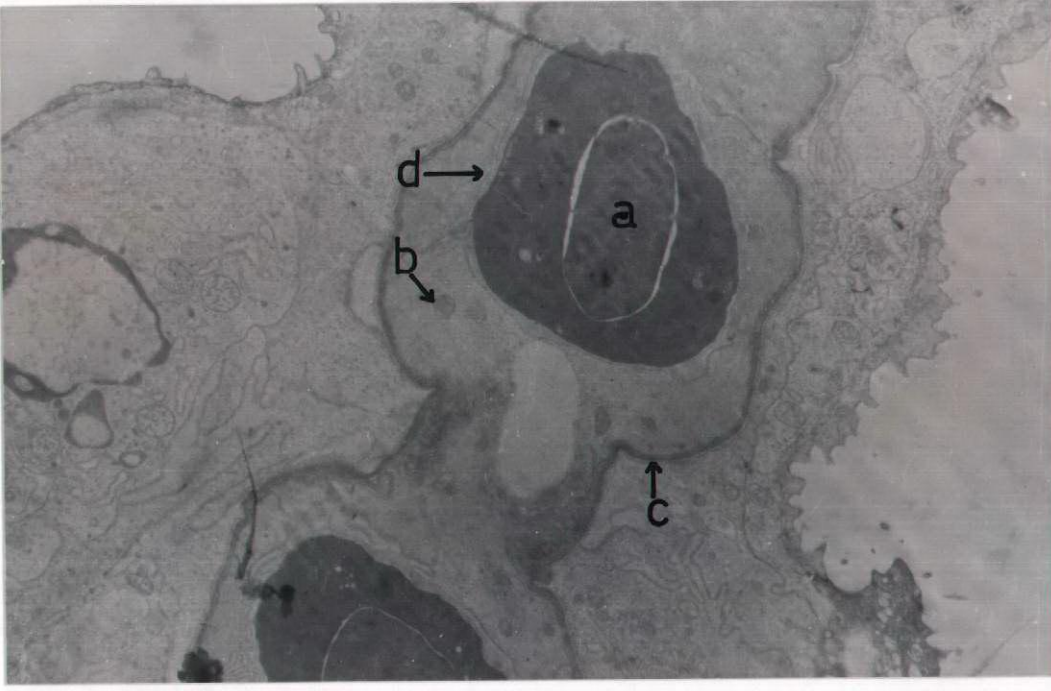
Şekil 4.53. Kontrol grubu alabalıkların mide bez epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. nukleus, b. nukleolus, c. salgı granülleri.



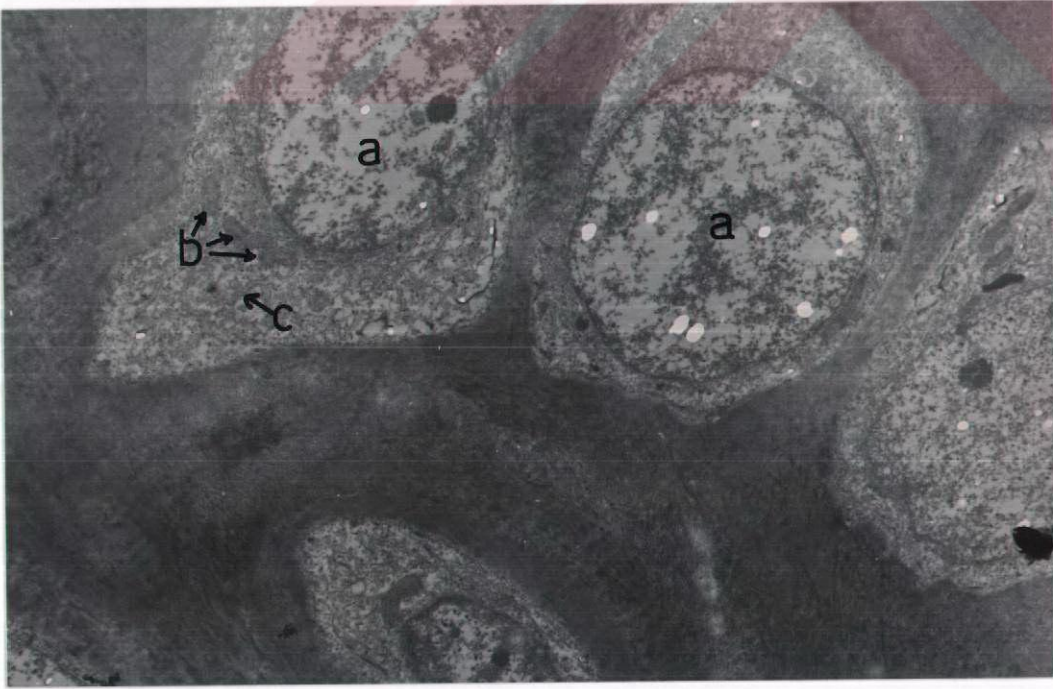
Şekil 4.54. Kontrol grubu alabalıkların mide bez epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. granülsüz endoplazmik retikulum, b. mitokondriyum, c. salgı granülleri.



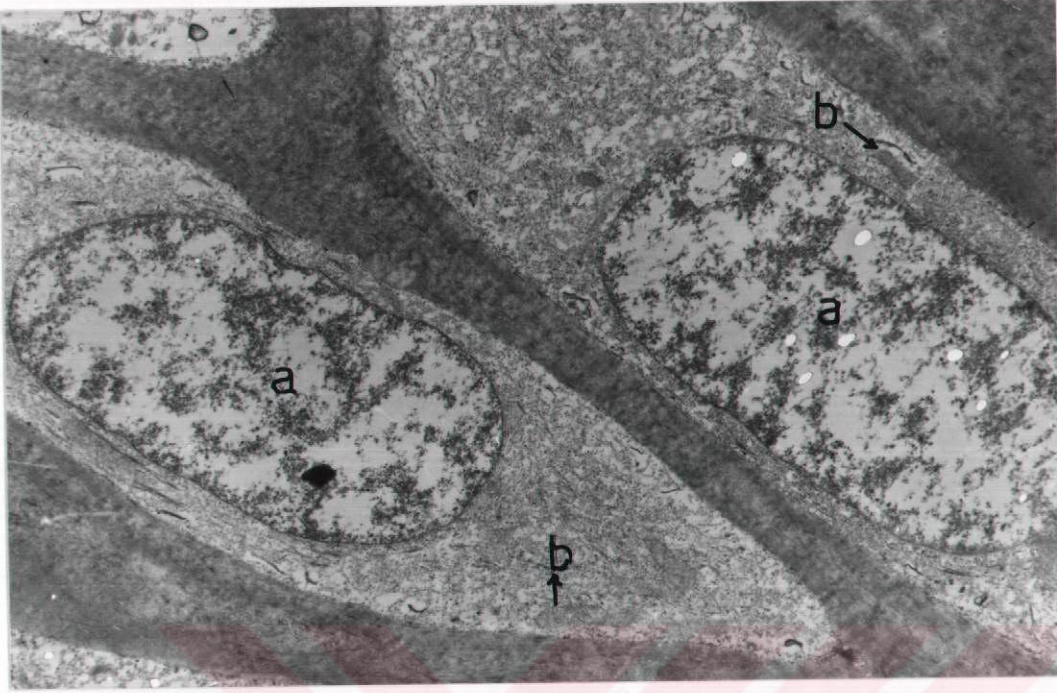
Şekil 4.55. Kontrol grubu alabalıkların bağırsak prizmatik epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. mitokondriyum, b. dezmozom, c. mikrovillus.



Şekil 4.56. Kontrol grubu alabalıkların solungaç plaster hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. nukleus, b. mitokondriyum, c. çift katlı zar, d. granüllü endoplazmik retikulum.



Şekil 4.57. Kontrol grubu alabalıkların solungaç kondrosit hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. nukleus, b. mitokondriyum, c. granüllü endoplazmik retikulum.



Şekil 4.58. Kontrol grubu alabalıkların solungaçlarındaki eritrosit hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. nukleus, b. mitokondriyum.

4.2.3.2. Deney Grupları

Solungaçlarına sürme, intraperitoneal ve intramüsküler enjeksiyon yolları ile enfeksiyon oluşturulan alabalık gruplarının karaciğer, kas, böbrek, mide, bağırsak ve solungaçlarının elektron mikroskopunda yapılan incelemeleri sonunda kontrol grubundakinden ayrı olarak aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

Deney gruplarındaki balıkların karaciğerinde büyük yağ damlacıklarına rastlandı (Şekil 4.59). Sitoplazma içinde endoplazmik retikulum sisternalarında genişlemeler ve bozulmalar görüldü. Yine sitoplazma içinde membransal yapılar ve organelden yoksun daha açık boyanmış alanlar tespit edildi (Şekil 4.60).

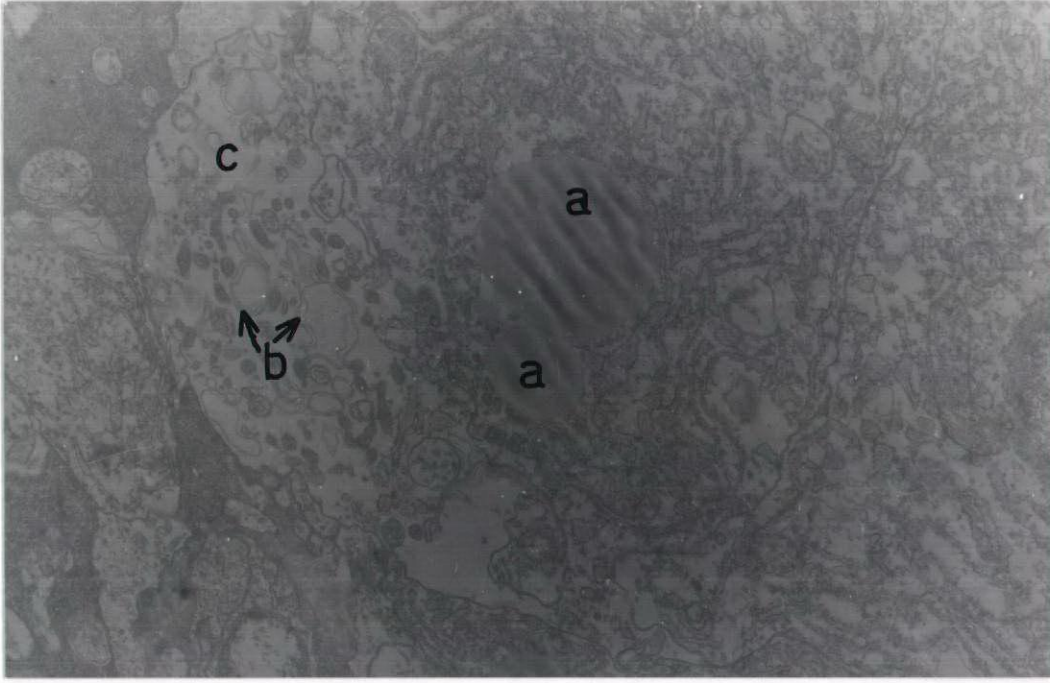
Kasta miyofibriller arasında açılmalar (Şekil 4.61) ve sarkolemma altında miyofibrillerden yoksun alanlar dikkati çekti (Şekil 4.61, Şekil 4.62). Sarkoplazma retikulumunda sisternalarında genişlemeler gözlemlendi (Şekil 4.61). A, I ve Z bandlarının yer yer daha solgun olduğu belirlendi (Şekil 4.61, Şekil 4.62).

Böbrekte sitoplazma içerisinde dev inklüzyonların varlığı göze çarptı (Şekil 4.63). Yine, sitoplazma içerisinde membransal yapıların olduğu gözlemlendi. Ayrıca, hücrenin bazaline doğru vakuol benzeri genişlemiş yapıların mevcut olduğu görüldü (Şekil 4.64).

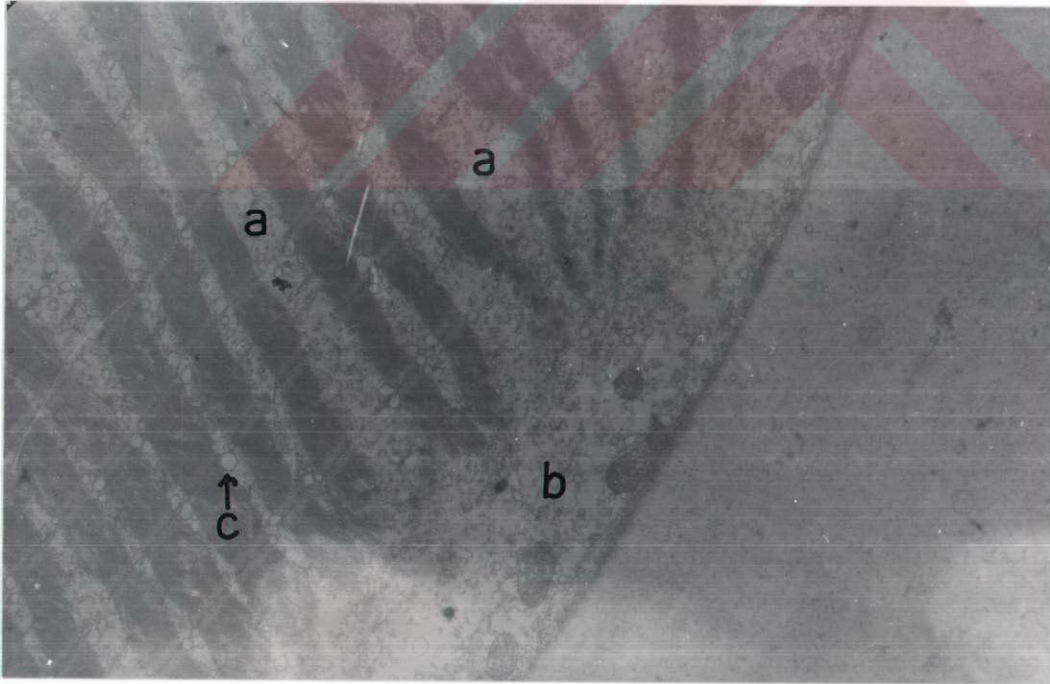
Deney grubunun mide, bağırsak ve solungaçlarının organel düzeyindeki incelemelerinde herhangi bir bulguya rastlanmadı.



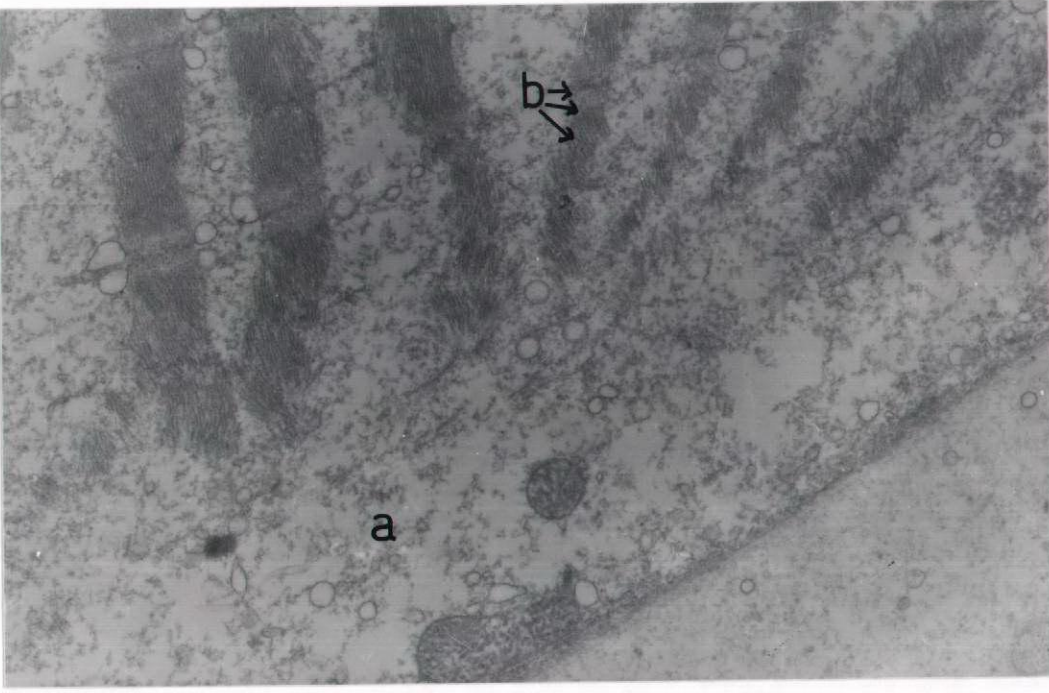
Şekil 4.59. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıkların solungaçlarına sürme, intraperitoneal ve intramüsküler enjeksiyon yolları ile enfekte edilmesi sonucunda alabalıklardan alınan karaciğerin sinuzoidlerindeki yağ damlacığı X3000.



Şekil 4.60. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıkların solungaçlarına sürme, intraperitoneal ve intramüsküler enjeksiyon yolları ile enfekte edilmesi sonucunda alabalıklardan alınan karaciğer epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. yağ damlacıkları, b. membransel yapılar, c. organelden yoksun açık boyanmış alanlar.



Şekil 4.61. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıkların solungaçlarına sürme, intraperitoneal ve intramüsküler enjeksiyon yolları ile enfekte edilmesi sonucunda alabalıkların kas hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. miyofibriller arasındaki açılmalar, b. sarkolemma altındaki miyofibrillerden yoksun alanlar, c. sarkoplazma retikulum sisternalarındaki genişleme.



Şekil 4.62. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıkların solungaçlarına sürme, intraperitoneal ve intramüsküler enjeksiyon yolları ile enfekte edilmesi sonucunda alabalıkların kas hücrelerinin elektron mikroskopik görünümü, X7000. a. sarkolemma altında miyofibrillerden yoksun alanlar, b. A, I ve Z bantlarındaki solgunluk.

Şekil 4.63. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıkların solungaçlarına sürme, intraperitoneal ve intramüsküler enjeksiyon yolları ile enfekte edilmesi sonucunda alabalıkların böbrek tubulus epitel hücreesindeki dev inklüzyonların elektron mikroskopik görünümü, X3000.

Şekil 4.64. *Aeromonas hydrophila*'nın alabalıkların solungaçlarına sürme, intraperitoneal ve intramüsküler enjeksiyon yolları ile enfekte edilmesi sonucunda alabalıkların böbrek tubulus epitel hücresinin elektron mikroskopik görünümü, X3000. a. membransel yapılar, b. bazalde iri vakuoller.

5. TARTIŞMA

Çalışmada kullanılan *A. hydrophila* suşuna ait bazı morfolojik ve biyokimyasal özellikler diğer araştırmacıların (Robert, 1978; Baran ve diğ., 1981; Cipriano ve diğ., 1984; Popoff, 1984; Timur ve Timur, 1985; Timur, 1986; Soliman ve diğ., 1989; Arda, 1997; Arda ve diğ., 1997) bu suşa ait belirttikleri özelliklerle aynı olduğu ve farklı zamanlarda bu suşun yapılan morfolojik ve biyokimyasal testlerinde özelliklerini koruduğu görülmüştür.

Yapılan bu çalışmada, gökkuşağı alabalıklarına 3 yolla *A. hydrophila* inoküle edilmiş balıkların hepsinde de bakteri enfeksiyonundan sonra ilk alarm olarak; denge bozukluğu, solunum hareketlerinde düzensizlik, ani yüzme hareketleri, balıkların çoğunluğunda 24-48 saat gibi kısa sürede ölüm olaylarının meydana geldiği ve ölen balıkların hepsinin enjeksiyon yapılmış sahalarında yaygın hemoraji ve nekrozlar belirmiştir. Bütün bunlara bakteri tarafından üretilen toksinin neden olabileceği düşünülmektedir ve bu düşüncüyü destekleyen birçok araştırma yapılmıştır. Gökkuşağı alabalığında (*O. mykiss*) yapılmış bir çalışmada *A. hydrophila* tarafından üretilen asetilkolinesteraz toksininin etkisi araştırılmış ve bakteri balığa enjekte edildikten kısa bir süre sonra balıkta denge bozukluğu, düzensiz solunumlar ve ani yüzme hareketleri gözlenmiş ve yaklaşık 9 saat sonra da ölüm olayları meydana gelmiştir (Rodriguez ve diğ., 1993). Aynı balık üzerinde yapılan diğer bir çalışmada (Santos ve diğ., 1987; Santos ve diğ., 1988) ise *Aeromonas* türlerinin virülens özellikleri ve enterotoksin üretimleri incelenmiş ve *Aeromonas* tarafından üretilen ekstraselüler toksini balığa enjekte edildikten 24-48 saat sonra ölüm olaylarının olduğu ve ölü balıkların hepsinde de enjeksiyon yapılan sahalarda yaygın olarak hemoraji ve nekrozlar gözlenmiştir. Yine *Cyprinus carpio* balıklarında yapılan bir başka çalışmada (Kanai ve Takagi, 1986), balığın kasına ayrı ayrı olarak taze *A. hydrophila* kültürü ve *A. hydrophila*'nın ürettiği alfa-hemolitik toksin enjekte edilmiş ve her ikisinde de kısa bir sürede kızarıklık ve şişkinlik şeklinde aynı bulgular saptanmıştır. Bunlardan ayrı olarak, *Anguilla japonica* (Miyazaki, 1980) ve *Clarias batrachus* (Angka, 1990) balıklarında *A. hydrophila* tarafından meydana getirilen patolojik bulgulara bakteri tarafından üretilen toksinlerin sebep olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada *A. hydrophila* ile gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) solungaçlarına sürme yolu, intraperitoneal ve intramüsküler enjeksiyonlarla oluşturulan enfeksiyon sonucunda gözlenen dengesiz yüzme, havuz kenar ve köşelerine yakın bulunma, durgun görünme, solunumda düzensizlik ve ani yüzme hareketleri şeklindeki klinik belirtilerin, *Oncorhynchus mykiss* (Rodriguez ve diğ., 1993), *Mugil cephalus* (Soliman ve diğ., 1989), *Salmo gairdneri irideus* (Baran ve diğ., 1981), *Cyprinus carpio* (Erer, 1983;

Timur, 1986; Sioutas ve diğ., 1991; Ahmed ve diğ., 1995) ve *Ictalurus punctatus* (Venture ve Grizzle, 1988) balıklarında da aynı şekilde olduğu bildirilmiştir.

Aeromonas hydrophila'nın Intraperitoneal enjeksiyon sonrasında; gökkuşağı alabalığının vücut yüzeyinde, enjeksiyon bölgesinden dorsal yüzgece kadar olan deride hemorajili lezyonlar, beyaz alanlar, ventral yüzgecin tabanında peteşiler ve anüs bölgesinde kızarıklıklar gibi belirlenen makroskobik bulgular, *Oncorhynchus mykiss* (Santos ve diğ., 1988; Paniaqua ve diğ., 1990), *Cyprinus carpio* (Erer, 1983), *Ictalurus punctatus* (Venture ve Grizzle, 1988), *Sarotherodon niloticus* (Amin ve diğ., 1985) ve *Chanos chanos* (Lio ve Duremdez 1986) balıklarında aynı etkenin intraperitoneal enjeksiyonunda elde edilen makroskobik bulgularla uyum sağlamıştır. Ayrıca, *Cyprinus carpio*'da (Erer, 1983) yapılan çalışmada bir örnekte prolapsus, *Sarotherodon niloticus*'un (Amin ve diğ., 1985) bazılarında da eksoftalmus ve prolapsus gözlemlendiği bildirilmiştir. Halbuki; bu araştırmada sadece 2 balıkta prolapsus tespit edilmiştir.

Intramüsküler enjeksiyon ile oluşturulan enfeksiyon sonunda gökkuşağı alabalığında makroskobik olarak, enjeksiyon yapılan alanda 2-3 cm çapında, kenarları kanamalı olan grimsi renkte lezyonlar, yine balıkların büyük bir çoğunluğunda abdomen ve anüs kenarlarında kızarıklıklar belirlendi. Çalışmanın bu bulguları, *Mugil cephalus* (Soliman ve diğ. 1989), *Ictalurus punctatus* (Venture ve Grizzle, 1988), *Sarotherodon niloticus* (Amin ve diğ., 1985), *Cyprinus carpio* (Erer, 1983; Takeuchi ve Miyazaki, 1986; Paniaqua ve diğ., 1990; Sioutas ve diğ., 1991), *Clarias batrachus* (Panpit, 1988), *Anguilla anguilla* (Miyazaki, 1980), *Hypophthalmichthys molitrix* (Kumar ve Dey, 1986), *Perca fluviatilis* (Michel, 1981) ve *Ophicephalus punctatus* (Subasinghe ve diğ., 1990) balıklarında *A. hydrophila*'nın intramüsküler enjeksiyonu sonunda bildirilen bulgularla paralellik göstermiştir.

Aeromonas hydrophila'nın gökkuşağı alabalığının solungaçlarına sürülmesiyle oluşturulan enfeksiyonlu balıkların otopsisinde solungaçlarının koyu kırmızı, bazılarının ise açık pembemsi olduğu ve karaciğerde de yer yer nekrotik odakların bulunduğu gözlenmiştir. Aynı yöntemle *Mugil cephalus* (Soliman ve diğ., 1989) balığında oluşturulan enfeksiyonun otopsisinde ise yapılan bu çalışmadaki bulguların yanı sıra böbreklerde peteşiyal kanamalar, safra kesesinde şişme ve abdominal boşlukta seröz sıvı birikimi olduğu bildirilmiştir. Bu farklılıkların nedeni, kullanılan *A. hydrophila* suşunun virülensine ve farklı balık türlerinin kullanılmış olmasına bağlanmıştır.

Aeromonas hydrophila'nın intraperitoneal enjeksiyonuyla oluşturulan enfeksiyonlu gökkuşağı alabalığının otopsisinde karın boşluğunda ve bağırsak içeriğinde sarımsak-yeşilimsi renkte kötü kokulu bir sıvı, *Oncorhynchus mykiss* (Candan, 1990; Paniaqua ve diğ., 1990) ve *Cyprinus carpio* (Erer, 1983) balıklarında görülenler ile, karaciğerde çeşitli

büyükliklerde nekrotik bölgeler, gonadlar, karaciğer, bağırsaklar ve midede yer yer nokta şeklinde kanamalar ve bazı balıklarda böbreklerin yumuşak bir kıvamda olduğu şeklindeki bulguları ise *Oncorhynchus mykiss* (Paniaqua ve diğ., 1990), *Clarias batrachus* (Angka, 1990) ve *Cyprinus carpio* (Erer, 1983; Ahmed ve diğ., 1995) balıklarında belirtilen bulgularla benzerlik sağlamıştır.

Aeromonas hydrophila'nın intramüsküler enjeksiyonuyla gökkuşağı alabalığında oluşturulan enfeksiyonun otopsisinde ise enjeksiyon yapılan sahadaki lezyonlu bölgenin deri altında kanlı irinli bir sıvı, karaciğerde irili ufaklı nekrotik alanlar, karaciğer, bağırsaklar ve midede peteşiyal kanamalar şeklindeki bulgular, *Oncorhynchus mykiss* (Paniaqua ve diğ., 1990), *Mugil cephalus* (Soliman ve diğ., 1989), *Carassius auratus* (Brenden ve Huizinga, 1986) *Sarotherodon niloticus* (Amin ve diğ., 1985) ve *Cyprinus carpio* (Erer, 1983; Takeuchi ve Miyazaki, 1986; Sioutas ve diğ., 1991) balıklarında bildirilen bulgularla aynı olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada, *Aeromonas hydrophila* alabalıklarda 3 grup halinde oluşturulan enfeksiyonun mikroskopik bulguları birbirine benzerlik gösterdiğinden organlarda tespit edilen histopatolojik değişiklikler aşağıdaki şekilde tartışılmıştır.

Deney grubu balıkların solungaçlarının primer ve sekonder lamellalarında hiperemi ve hemoraji, bazı bölgelerinde ise hafif yangısal hücre infiltrasyonları şeklindeki bulgular *Mugil cephalus* (Soliman ve diğ., 1989) ve *Anguilla anguilla* (Miyazaki, 1980) balıklarında belirtilen bulgularla uyum sağlamıştır. Ayrıca, bu bulgulara ilaveten *Mugil cephalus*'un (Soliman ve diğ., 1989) sekonder lamellalarında telangiektazi ile nekroz, *Ictalurus punctatus* (Ventura ve Grizzle 1988; Grizzle ve Kiryu, 1993) balığının lamellalarında ise ödem ve epitelyumda spongiosis bildirilmiştir.

Aeromonas hydrophila ile enfekte edilen alabalıkların karaciğerinde tespit edilen hiperemi, sinuzoidlerde genişleme, hepatositlerde koagulatif nekroz gibi belirtiler, *Oncorhynchus mykiss* (Candan, 1990; Paniaqua ve diğ., 1990), *Mugil cephalus* (Soliman ve diğ., 1989), *Ictalurus punctatus* (Ventura ve Grizzle, 1988; Grizzle ve Kiryu, 1993), *Salmo gairdneri irideus* (Baran ve diğ., 1981), *Carassius auratus* (Brenden ve Huizinga 1986; Miyazaki ve Kaige, 1986), *Cyprinus carpio* (Erer, 1983; Timur, 1986), *Anguilla anguilla* (Miyazaki, 1980), *Stizostedion lucioperca* (Timur ve Timur, 1985) ve *Clarias batrachus* (Angka, 1990) balıklarında bildirilenlerle, yine bu çalışmada karaciğer hepatositlerindeki bulunan yağ dejenerasyonu, *Anguilla japonica* (Chien ve diğ., 1993; Chien ve Chien, 1994) ve *Ictalurus punctatus* (Ventura ve Grizzle, 1988) balıklarında tespit edilen bulgularla paralellik göstermiştir. Ancak, yapılan bu çalışmada yukarıdaki bulgulardan ayrı olarak karaciğerde kupffer hücre aktivasyonu da saptanmıştır.

Yine enfekte edilen alabalıkların böbrek tubulus epitellerinde belirlenen dejenerasyon, nekroz ve bowman kapsülünün epitelyumu boyunca yer yer görülen desquamasyon bulguları, bazı araştırmacıların (Candan, 1990; Soliman ve diğ., 1989; Venture ve Grizzle, 1988; Erer, 1983; Timur, 1986; Baran ve diğ., 1981; Brenden ve Huizinga, 1986; Chien ve Chien, 1994; Angka, 1990; Miyazaki ve Jo, 1985), *Salmo gairdneri*, *Mugil cephalus*, *Ictalurus punctatus*, *Cyprinus carpio*, *Salmo gairdneri irideus*, *Carassius auratus*, *Anguilla japonica*, *Clarias batrachus* ve *Plecoglossus altivelis* balıklarında belirttikleri bulgularla aynı olduğu görülmüştür. Bununla birlikte sadece *Mugil cephalus* balığında olduğu bildirilen (Soliman ve diğ., 1989) böbrek tubulus epitellerindeki hyalin damlacıkları bu araştırmada da belirlenmiştir.

Bu araştırmada alabalıkların kaslarının epidermal tabakasında görülen ekstraselüler ödem, *Mugil cephalus* (Soliman ve diğ., 1989) ve *Ictalurus punctatus* (Venture ve Grizzle, 1988) ile, dermiste hiperemi, konjesyon ve kollagen bandlarda lokosit infiltrasyonu ve subdermal kas demetlerinde nekroz, *Oncorhynchus mykiss* (Paniaqua ve diğ., 1990), *Mugil cephalus* (Soliman ve diğ., 1989), *Ictalurus punctatus* (Venture ve Grizzle, 1988), *Cyprinus carpio* (Erer, 1983; Kanai ve Takagi, 1986; Sioutas ve diğ., 1991), *Perca fluviatilis*, *Carassius auratus* (Miyazaki ve Kaige, 1986), *Sarotherodon niloticus* (Amin ve diğ., 1985) ve *Anguilla japonica* (Miyazaki, 1980) balıkları ile, derideki kahverengi-siyah lekelenmeler ise *Ictalurus punctatus* (Venture ve Grizzle, 1988; Grizzle ve Kiryu, 1993), *Mugil cephalus* (Soliman ve diğ., 1989), *Cyprinus carpio* (Kanai ve Takagi, 1986) ve *Salmo gairdneri irideus* (Baran ve diğ., 1981) balıkları ile ilgili bildirilen bulgularla paralellik göstermiştir.

Ictalurus punctatus (Venture ve Grizzle, 1988) balığında mide gastrik bezlerinde nekrotik alanlar, *Anguilla japonica* (Miyazaki, 1980) balığının midesinde ise hiperemi olduğu bildirilmesine rağmen bu araştırmada, mide de patolojik bir bulguya rastlanılmamıştır.

Yine, *Mugil cephalus* (Soliman ve diğ., 1989) balığının bağırsağında mukus hücre proliferasyonu, bağırsak epitelyumunda nekroz, lokosit infiltrasyonu, dilatasyon, bağırsak kriptlerinin lamina propriyasında kan kapillalarında kopmalar, *Ictalurus punctatus* (Venture ve Grizzle, 1988) balığının bağırsak mukozal epitelyumunda yangı, *Stizostedion lucioperca* (Timur ve Timur, 1985) balığının bağırsak mukoza membranının nekroze olarak bağırsak lumeni içerisine döküldüğü ve propriyada selüler yangısal infiltrasyonların yanısıra hemorajiler, *Clarias batrachus* (Angka, 1990) balığının bağırsağında hemoraji ve nekroz, *Cyprinus carpio* (Erer, 1983; Timur, 1986) balığının bağırsak villuslarının uç kısımlarının nekroze olarak lumene döküldüğü ve bir balıkta da submukozada hiperemi ve ödem, *Anguilla japonica* (Chien ve diğ., 1993) balığının bağırsağında ise stratum kompaktum ve stratum spongiosumu ihlal eden bir hemoraji şeklinde bulgular tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen bu

araştırmada da submukozada ödem, bağırsak kriptlerinin lamina propriyasında kan kapıllarında kopmalar ve bağırsak villuslarının lumene dökülmesi gibi hafif derecede bulgulara rastlanmıştır. Ancak, preparat hazırlama esnasında yapılan hatalar sonucunda da bu şekilde görüntüler elde edilebileceğinden önemli bir bulgu olarak dikkate alınmamıştır.

Araştırmada pankreasa ait önemli herhangi bir bulguya rastlanılmamıştır. Ancak, *Ictalurus punctatus* balığının pankreasında asinar hücrelerinin normalden daha küçük ve daha bazofilik olduğu ve zimogen granüllerinin bulunmadığı (Venture ve Grizzle, 1988; Grizzle ve Kiryu, 1993), *Stizostedion lucioperca* (Timur ve Timur, 1985) balığında ise pankreas hücrelerinin şekillerini kaybederek nekroze olduğu yolunda bulgular bildirilmiştir.

Yapılan bu araştırmada gastrin immunoreaktif hücrelere gökkuşağı alabalığının (*O. mykiss*) pilorik midesinde gözlendi. Bu sınırlı dağılım *Gadus morhua* balığında da tespit edilmiştir (Larsson ve Rehfeld, 1978; Jonsson ve diğ., 1987). Bununla beraber, bu tip hücrelere, *Mugil saliens* balığının gastrik bezlerinin sefalik bölgesinde de görüldüğü bildirilmiştir (Elbal ve diğ., 1988). Daha önce alabalıkta yapılan bir çalışmada kolesistakinin / gastrin immunoreaktivitesine midede rastlanılmadığını ama bağırsak mukozasındaki endokrin hücrelerinde tespit edildiği belirtilmiştir (Holmgren ve diğ., 1982; Powell ve diğ., 1991; Beorlegui ve diğ., 1992; Barrenechea ve diğ., 1994). Yine, *Carassius auratus* (Himick ve Peter, 1994) ve *Lampetra japonica* (Yui ve diğ., 1988) balıklarının midesinde de gastrin immunoreaktivitesinin olduğu bulunmuştur.

Gökkuşağı alabalığında yapılan bu araştırmada midede ve ince bağırsakta çok sayıda substans P içeren hücrelere rastlanmıştır. *Salmo gairdneri* üzerinde yapılan bir başka araştırmalarda da (Holmgren ve diğ., 1982; Powell ve diğ., 1991; Beorlegui ve diğ., 1992; Barrenechea ve diğ., 1994) aynı bulgular bildirilmiştir. Bununla birlikte şimdiye kadar elasmobranş balıklardan olan *Scyliorhinus canicula*'da scyliorhinin I ve II olmak üzere iki tane peptid izole edildiği (Conlon ve diğ., 1986), bunların fizyolojik etkilerinin substans P'ye benzerlik gösterdiği (Jensen ve diğ., 1987) ve enterik nöronlardan serotonin salgılanmasına sebep olduğu bildirilmiştir (Holmgren ve diğ., 1985). *Scyliorhinus stellaris* balığında yapılan bir araştırmada ise midede substans P içeren hücrelere rastlanılmıştır (Cimini ve diğ., 1989).

Teleostlardan sadece *Mugil saliens* balığının midesinde gastrik bezlerin üst kısımlarında glukagon pozitif hücreleri tespit edilmiştir (Elbal ve diğ., 1988). Glukagon immunoreaktif hücrelerin genel dağılımı teleostlar ve kıkırdaklı balıklarda farklılık gösterdiği, teleostlarda glukagon içeren hücrelerin bağırsaklarda (Elbal ve Agullerio, 1986; Abad ve diğ., 1987; Beorlegui ve diğ., 1992), kıkırdaklı balıklarda ise gastrik mukozada yer aldığı bildirilmiştir (Tagliafierro ve diğ., 1989). *Barbus conchoni* balığında yapılan araştırmalarda (Rombout ve diğ., 1986a ve 1986 b) glukagon içeren hücrelere gastro-entero-

pankreatik endokrin sistemde bulunduğu bildirilmiştir. Bu araştırmada ise glukagon immunoreaktivitesi pankreasta langerhans adacıklarında ve ön bağırsak bölümlerinde görüldü. Mide de ise rastlanılmadı.

Birçok teleost balıkda insülin immunoreaktivitesi pankreasta langerhans adacıklarında saptanmıştır (Carillo ve diğ., 1986; Yui ve Fujita, 1986; Abad ve diğ., 1987; Gruff ve Yousan, 1997; Maglio ve Putti, 1998; Lozano ve diğ., 1991; Al-Mahrouki ve Yousan, 1999; Yang ve diğ., 1999). Bu çalışmada da insülin immunoreaktivitesi gökkuşağı alabalığının (*O. mykiss*) pankreas langerhans adacıklarında tespit edilmiştir.

Gökkuşağı alabalığında yapılan bu araştırmada calbindin immunoreaktivitesi sindirim kanalı, pankreas ve böbreklerde görülmedi. Bu da, balıklarda bu organlardaki kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesini memelilerden farklı bir mekanizma tarafından ayarlandığını göstermektedir.

Aeromonas hydrophila ile enfeksiyon oluşturulan deneysel gruplarda, gastrin, substans P ve glukagon immunoreaktivitesi mide, bağırsaklar ve pankreasta, kontrol grubuna benzer bir dağılım gösterdi. Substans P immunoreaktivitesi ise kontrol gruplarda pilorik mide ve ince bağırsakta rastlanmasına rağmen enfekte gruplarda bu immunoreaktiviteye rastlanmadı. Bu durum enfekte balıkların, enfeksiyon süresince aç bırakılmasına bağlı olarak şekillenebileceğini söylenebilir. Çünkü, substans P sindirim kanalı endokrin hücrelerinden sentezlenmesi, alınan besin ile bağlantılı olduğu, daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Inverson, 1982; Walker ve Thompson, 1987).

Bu araştırmada *A. hydrophila* ile enfekte edilen alabalıkların karaciğer epitel hücrelerinin elektron mikroskopik incelemesinde, sinuzoid ve hepatositlerdeki büyük yağ damlacıkları, endoplazmik retikulum sisternalarındaki genişleme ve sitoplazma içindeki membransel yapılar belirlendi. Aynı bulgular *Ictalurus punctatus* (Ventura ve Grizzle, 1988) balığında yapılan araştırmada da bildirilmiş, ayrıca bu hücrede yoğun hemosiderin granüllerinden ve pigment topluluğundan da bahsetmişlerdir. Bunlardan ayrı olarak yapılan bu çalışmada, kas myofibrilleri arasında açılmalar, sarkolemma altında myofibrillerden yoksun alanlar, sarkoplazma retikulum sisternalarında genişlemeler, böbrek tubulus epitel hücrelerinde, sitoplazma içinde dev inklüzyonlar, membransal ve vakuol benzeri yapılar tespit edilmiştir.

Enfeksiyon grubu ile kontrol grubu arasında endokrin hücrelerinin içerdikleri hormonlar yönünden herhangi bir farklılığın görülmemesi, ışık ve elektron mikroskobu bulguları ile uyum içerisindedir. Bu sonuçlara göre, etken primer olarak karaciğer, böbrek, kas ve solungaçlar üzerine etki göstermekte, sindirim kanalı organları üzerine ise pek etkisi olamamaktadır.

KAYNAKLAR

- Abad, M.E., Binkhorst, P.F.M., Elbal, M.T. and Rombout, J.H.W.M., 1987, A comparative immunocytochemical study of the gastro-entero-pancreatic (GEP) endocrine system in a stomachless and a stomach-containing teleost. *General and Comparative Endocrinology*, 66, 1, 123-136.
- Ahmed, S.A., Marzouk, M.S., Megid, R.M.A., Moustafa, M. and Gado, M., 1995, Histopathological and immunological studies on *Aeromonas hydrophila* infection in common carp. *Veterinary Medical Journal Giza*, 43, 4, 389-396.
- Al-Mahrouki, AA. and Youson, J.H., 1999, Ultrastructure and immunocytochemistry of the islet organ of (Teleostei). *Gen. Comp. Endocrinol.* 116, 3, 409-421.
- Allan, B.J., and Stevenson, R.M.W. 1981, Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections. *Can. J. Microbiol.* 27 (10): 1114-1122.
- Allen, D.A., Austin, B. and Colwell, R.R., 1983, Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a freshwater fishery. *Journal of General Microbiology*, 129, 2043-2062.
- Amin, N.D., Abdallah, I.S., Elallawy, T., Ahmed, S.M. and Amin, E.D.N., 1985, Motile *Aeromonas* septicaemia among *Tilapia nilotica* (*Sarotherodon niloticus*) in upper Egypt. *Fish Pathology*, 20, 2-3, 93-97.
- Anderson, B.G. and Mitchum, D.L., 1974, Atlas of trout histology. Wyoming Game Fish Department., Bulletin, U.S.A. 1-13.
- Angka, S.L., 1990, The pathology of the walking catfish, *Clarias batrachus* (L.), infected intraperitoneally with *Aeromonas hydrophila*. *Asian Fish. Sci.*, 3,3, 343-351.
- Arda, M., 1974, Balıklarda bakteriyel, mantar, viral ve ekolojik nedenlerinden ileri gelen hastalıklar ve tedavisi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın No: 300, Yardımcı Ders Kitabı: 201, Ankara.
- Arda, M., 1997, Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi No: 25, 1. Baskı, Ankara, 490 s.
- Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö. İzgür, M., Leloğlu, N., Karaman, M., Ilgaz, A. ve Diker, S., 1997, Özel mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi No: 26, 4. Baskı, Ankara, s. 59-62.

- Austin, B. and Austin, D.A., 1987, Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish. Ellis Horwood Limit. Publis. Chichester, England, p. 111-195.
- Austin, B. and Al-Zahrani, M.J., 1988, The effect of antimicrobial compounds on the gastrointestinal microflora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish. Biol., 33, 1-14.
- Bach, R., Chen, P.K. and Chapman, G.B., 1978, Changes in the spleen of channel catfish *Ictalurus punctatus* Rafinesque induced by infection with *Aeromonas hydrophila*. J. Fish. Dis. 1 (3): 205-217.
- Baran, İ., Timur, M., Aydın, N., İstanbulluoğlu, E. ve Aydınтуğ, M.K., 1981, Çifteler-Sakaryabaşı Balık Üretim ve Araştırma İstasyonunda, alabalıklarda (*Salmo gairdneri irideus*) görülen bakteriyel hemorajik septisemi hastalığı üzerinde incelemeler. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 17, 3-4, 467-473.
- Baran, İ. ve Timur, M., 1983, Ichthyologie Balık Bilimi. A.Ü. Vet. Fak. Yayınları No:392. Ders kitabı. A.Ü. Basımevi. S. 60-69.
- Barrenechea, M.A., Lopez, J. and Martinez, A., 1994, Regulatory peptides in gastric endocrine cells of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: General distribution and colocalizations. Tissue and Cell, 26, 3, 309-321.
- Beorlegui, C, Martinez, A. and Sesma, P., 1992, Endocrine cells and nerves in the pyloric ceca and the intestin *Oncorhynchus mykiss* (Teleostei): an immunocytochemical study. Gen. Comp. Endocrinol. 86, 3, 483-495.
- Brenden, R.A. and Huizinga, H.W., 1986, Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus* (L.). Journal of Fish Diseases, 9, 163-167.
- Buchan, A.M.J and Baimbridge, K.G., 1988, Distribution and co-localization of calbindin D 28k with VIP and neuropeptide Y but not somatostatin, galanin and substance P in the enteric nervous system of the rat. Peptides 9:333-338.
- Cai, W. and Huang, G., 1986, A study on pathology of derma-ulcer of *Tilapia nilotica*. J. Fish. China Shuichan Xuebao, 10, 3, 261-272.
- Candan, A.A., 1990, A study on the histopathology of *Aeromonas hydrophila* infections of rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) kept under experimental conditions and the effect of chloramphenicol. J. Aquat. Prod., 4, 1, 5-20.



- Carrillo, M., Zanuy, S., Duve, H. and Thorpe, A., 1986, Identification of hormone-producing cells of the endocrine pancreas of the sea bass, *Dicentrarchus labrax*, by immunocytochemistry. Gen. Comp. Endocrinol., 61, 2, 287-301.
- Chang, M.M., Leeman, S.E. and Niall, H.D, 1971, Amino acid sequence of substance P. Nature 232; 86.
- Chang, M.C. and Huang, T.C., 1981, Effects of the predation of *Tetrahymena pyriformis* on the population of *Aeromonas hydrophila*. Natl. Sci. Coun. Mon. 9(7): 552-556.
- Chien, C.H., Lin, T.S. and Chein, E.J., 1993, The artifical injection of *Aeromonas hydrophila* isolated from human to induce bacterial septicemia in culture eel (*Anguilla japonica*). Coa Fish. Ser., no. 40, pp. 32-38.
- Chien, C.H. and Chien, E.J., 1994, Histopathological study of *Aeromonas hydrophila* in eel (*Anguilla japonica*). Coa Fish. Ser., no. 46, pp. 13-24.
- Christakos S., Gabrielides C and Rhoten WB, 1989, Vitamin D-dependent calcium binding proteins: Chemistry, distribution, functional consideration and molecular biology. Endocrine Rev., 10: 3-26.
- Cimini, V., Van Noorden, S. and Polak, J.M., 1989, Co-localization of substans P-, bombesin- and peptide histidine isoleucine- like peptides in gut endocrine cells of the dogfish *Scyliorhinus stellaris*. Anat. Embr., 179:605-614.
- Cipriano, R.C., Bullock, G.L. and Pyle, S.W., 1984, *Aeromonas hydrophila* and motile septicemias of fish. United States Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Division of Fishery Research, Washington, D.C., Fish Disease Leaflet 68, 23 s.
- Conlon, J.M., Deacon, C.F., O'Toole, L. and Thim, L., 1986, Scyliorhinin I and II: two novel tachykinins from dogfish gut. F.E.B.S. Lett, 200: 111-116.
- Çelikkale, M.S., 1988, İçsu Balıkları ve Yetiştiriciliği. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sürmene Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Yüksekokulu, Cilt 1, Trabzon, 419 s.
- Darwin, L.C, 1991, Ca⁺² binding proteins as neuronal markers. Neurosci Facts, 2:1-4
- Demir, N., 1992, İhtiyoloji. İstanbul Üniversitesi. Yayınlarından sayı: 3668. Fen fak. No: 219. İ.Ü. Fen Fak. Basımevi. S. 136-143.

- Dockray, G.J. and Gregory, R.A., 1989, Gastrin. In: Makhoul GM, ed. Handbook of physiology and gastrointestinal system. New York: Oxford University Press, American Physiology society, 311.
- Ekingen, G., 1988, Balık Sistematığı. Tolga Ofset, Elazığ, 225 s.
- Elbal, M.T. and Agullerio, B., 1986, An immunocytochemical and ultrastructural study of endocrine cells in the gut of a teleost fish, *Sparus auratus* L. General and Comparative Endocrinology, 64, 339-354.
- Elbal, M.T., Lozano, M.T. and Agullerio, B., 1988, The endocrine cells in the gut of *Mugil saliens* Risco, 1810 (Teleostei): An immunocytochemical and ultrastructural study. General and Comparative Endocrinology, 70, 231-246.
- Erer, H., 1983, Aynalı sazanlarda (*Cyprinus carpio* L.) deneysel *Aeromonas hydrophila* enfeksiyonunda (bakteriyel hemorajik sepsis) oluşan patolojik bulguların incelenmesi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 30, 4, 674-690.
- Erganiş, O. ve İstanbulluoğlu, E., 1993, İmmunoloji. Mimoza Yayınları No: 14, Sağlık Bilimleri Dizisi: 1, Konya, s. 189-203.
- Ergün, A., Çağırhan, H. ve Tanrıöver, A., 1996, Balık Hastalıkları. Özel Sayı, Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Dergisi, Cilt: 20, Sayı: 34, Bornova-İzmir, s.
- Esteve, C. and Amaro, C., 1991, Siderophore production in *Aeromonas* spp. isolated from European eel, *Anguilla anguilla* L. Journal of Fish Diseases, 14, 423-427.
- Grizzle, J.M. and Kiryu, Y., 1993, Histopathology of gill, liver, and pancreas, and serum enzyme levels of channel catfish infected with *Aeromonas hydrophila* complex. Journal of Aquatic Animal Health, 5, 1, 36-50.
- Gruff, K.E and Youson, J.H., 1997, An immunohistochemical study of the endocrine cells within intestine and stomach of the gar. Gen. Comp Endocrinol, Apr, 106(1): 1-16.
- Hayat, M.A., 1989, Principles and Techniques of Electron Microscopy. The Macmillan Press Ltd., Third Edition, Hong Kong,
- Hazen, T.C., 1979, Ecology of *Aeromonas hydrophila* in a South Carolina Cooling Reservoir. Microb. Ecol., 5, 3, 179-195.



- Himick, B.A. and Peter, R.E., 1994, CCK/gastrin-like immunoreactivity in brain and gut, and CCK suppression of feeding in goldfish. *Am-J-Physiol. Sep*; 267 (3 pt 2): R 841-51.
- Holmgren, S., Vaillant, C. and Dimaline, R., 1982, VIP, substance P, gastrin/CCK, bombesin, somatostatin and glucagon-like immunoreactives in the gut of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell-Tissue-Res.* 223(1):141-53.
- Holmgren, S., Grove, D.J. and Nilsson, S., 1985, Substance P acts by releasing 5-hydroxytryptamine from enteric neurons in the stomach of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Neuroscience*, 14, 682-697.
- Huizinga, H.W., Esch, G.W. and Hazen, T.C., 1979, Histopathology of red-sore disease (*Aeromonas hydrophila*) in naturally and experimentally infected Largemouth Bass, *Micropterus salmoides* (Lace'pe'de). *Journal of Fish Disease*, 2, 263-277.
- Inverson, L.L., 1982, Substance P. *Br Med Bull* 38:277.
- Jensen, J., Holmgren, S. and Jonsson, A.C., 1987, Substance P-like immunoreactivity and the effect of tachykinins in the intestine of the Atlantic cod, *Gadus morhua*. *J. Auton. Nerv. Syst.* 20:25-33.
- Jonsson, A.C., Holmgren, S. and Holstein, B., 1987, Gastrin/CCK-like immunoreactivity in endocrine cells and nerves in the gastrointestinal tract of the cod, *Gadus morhua*, and the effect of peptides of the gastrin/CCK family on cod gastrointestinal smooth muscle. *Gen Comp. Endocrinol.* 66:190-202.
- Kanai, K. and Takagi, Y., 1986, Alpha-hemolytic toxin of *Aeromonas hydrophila* produced in vivo. *Fish Pathology*, 21, 4, 245-250.
- Kawakani, H. and Hoshimoto, H., 1978, Occurrence and distribution of *Aeromonas* in surface water and algae in river water. *J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ.* 17(2): 155-164.
- Kumar, D. and Dey, R.K., 1986, Bacterial septicemia in silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes). Bangkok, Thailand NACA, 7 pp.
- Kumar, D., Misshra, B.K. and Dey, R.K., 1986, Dropsy in *Catla catla* (Ham.) caused by mixed infection of *Aeromonas hydrophila* and *Myxosporidian* sp. *Aquacult. Hung.* 5, 107-112.



- Lallier, R., Leblanc, D., Mittal, K.R. and Olivier, G., 1981, Serogrouping of motile *Aeromonas* species isolated from healthy and moribund fish. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 42(1):56-60.
- Lallier, R., Bernard, F. and Lalonde, G., 1984, Difference in the extracellular products of two strains of *Aeromonas hydrophila* virulent and weakly virulent for fish. *Can. J. Microbiol.*, 30, 7, 900-904.
- Larsson, L.I. and Rehfeld, J.F., 1978, Evolution of CCK-like hormones. In: *Gut hormones* 2nd edn, Churchill livingstone, Edinburgh, pp. 68-73.
- Leung, K.Y. and Stevenson, R.M., 1988, Tn5-induced protease-deficient strains of *Aeromonas hydrophila* virulence for fish. *Infect Immun.*, 56, 10, 2639-2644.
- Lio, P.G. and Duremdez, F.R., 1986, The pathogenicity of bacteria associated with transport-stressed *Chanos chanos* fingerlings. The First Asian Fisheries Forum Proceedings of the First Asian Fisheries Forum, Manila, Philippines, 26-31 May, pp. 223-226.
- Liu, C.I., Huang, J.L., Hung, H.H. and Pen, C.F., 1990, The experimental infection of *Streptococcus* and / or *Aeromonas* to induce bacterial septicemia in cultured tilapia. *Coa Fish. Ser.*, 24, 40-45.
- Lozano, M.T., Garcia, A.A., Abad, M.E. and Agulleiro, B., 1991, Pancreatic endocrine cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) immunocytochemical study of insulin and somatostatin peptid. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 81, 2, 198-206.
- Luna L.G. 1968, Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. New York, McGraw-Hill Book Company.
- Maglio, M. and Putti, R., 1998, Morphological Basis of the Interactions Between Endocrine Cells Pancreatic Islets of the Teleost, *Blannius gattorugine*. *Tissue Cell.* 30, 6, 672-683.
- Mateos, D., Anguita, J., Rivero, O., Naharro, G. and Paniaqua, C., 1992, Comparative study of virulence and virulence factors of *Aeromonas* strains isolated from water and sediment of a river. *Zentralbl Hyg Umweltmed*, Aug, 193(2):114-22.
- Mattson, N.S. and Riple, T.H., 1989, Metomidate, a better anaesthetic for cod (*Gadus morhua*) in comparison with benzocain, MS-222, chloro butanol and phenoxyethanol. *Aquaculture*, 83, 89-94.
- Matty, A.J., 1985., *Fish Endocrinology*. Crom. Helm. Ltd. Paovident house. Beckenham.

- Michel, C., 1981, A bacterial disease of perch (*Perca fluviatilis*) in an alpine lake: isolation and preliminary study of the causative organism. *Journal of Wildlife Disease*, 17:4, 505-510.
- Miyazaki, T., 1980, Histopathological study on bacterial infections in fishes. *Bulletin of the Faculty of Fisheries, Mie University*, no. 7, 63-149, pp. 104-107.
- Miyazaki, T. and Jo, Y., 1985, A histopathological study of motile aeromonad disease in ayu. *Fish Pathology*, 20, 1, 55-59.
- Miyazaki, T. and Kaige, N., 1986, A histopathological study on motile aeromonad disease of crucian carp. *Fish Pathology*, 21, 3, 181-185.
- Meyer, F.P., 1970, Seasonal fluctuations in the incidence of disease on fish farms. Pages 21-29 in S.F. Snieszko, ed. *A symposium on diseases of fishes and shellfishes*. Am. Fish. Soc. Spec. Publ. 5.
- Nieto, T.P., Santos, Y., Rodriguez, L.A. and Ellis, A.E., 1991, An extracellular acetylcholinesterase produced by *Aeromonas hydrophila* is a major lethal toxin for fish. *Microbial Pathogenesis*, 11, 2, 101-110.
- Nieto, T.P., Corcobado, M.J.R., Toranzo, A.E. and Barja, J.L., 1985, Relation of water temperature to infection of *Salmo gairdneri* with motile *Aeromonas*.
- Olsson, C. and Holmgren, S., 1994, Distribution of PACAP (pituitaryadenylate cyclase-activating polypeptide) like and helospectin-like peptides in the teleost gut. *Cell Tissue Res.*, 277, 539-547.
- Paniaqua, C., Rivero, O., Anguita, J. and Naharro, G., 1990, Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of motile *Aeromonas* spp. isolated from a river. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 2, 350-355.
- Panpit, S., 1988, Histopathological and hematological studies of walking catfish (*Clarias batractus* Linn.) infected by *Aeromonas hydrophila*. *Abstracts of Master of Science Theses Fisheries Science*, no. 3, pp. 6-7.
- Peters, G., Faisal, M., Lang, T. and Ahmed, I., 1988, Stress caused by social interaction and its effect on susceptibility to *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, *Disease of Aquatic Organism*, 4:2, 83-89.
- Philippe, E. and Droz, B., 1988, Calbindin D 28k immunoreactive neurons in chick dorsal root ganglion: ontogenesis and cytological characteristics of the immunoreactive sensory neurons. *Neuroscience* 26: 215-224.

- Popoff, M. and Vernon, M., 1976, A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group. J. Gen. Microbiol. 94(1):11-22.
- Popoff, M., 1984, Genus *Aeromonas*. P. 545-550. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed: Krieg, N.R. Vol I. Barbara Williams and Wilkins, Baltimore. U.S.A.
- Powell, M.D., Wright, G.M. and Burka, F. 1991, Degranulation of eosinophilic granule cells induced by capsaicin and substance P in the intestine of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Cell Tissue Res., 266, 3, 469-474.
- Roberts, R.J., 1978, Fish pathology. Baillare Tindall, London.
- Rodriguez, M.C., Silveira, R., Cartaya, R., Prieto, A., Fajer, E. and Vinjoy, M., 1986, Columnaris disease and hemorrhagic septicemia in *Ictalurus punctatus* (Channel catfish). Aquacultura: Bol. Tec., 20, 17 pp.
- Rodriguez, L.A., Ellis, A.E. and Nieto, T.P., 1992, Purification and characterisation of an extracellular metalloprotease and haemolysin of *Aeromonas hydrophila* strain B32. Microb. Patholog., 13, 1, 17-24.
- Rodriguez, L.A., Ellis, A.E. and Nieto, T.P., 1993, Effects of the acetylcholinesterase toxin of *Aeromonas hydrophila* on the central nervous system of fish. Microbial Pathogenesis, 14, 411-415.
- Rombout, J.H.W.M., Grinten, C.P.M., Binkhorst, P.F.M., Thiele, T.J.J. and Schooneveld, H., 1986 a, Immunocytochemical identification and localization of peptide hormones in the gastro-entero-pancreatic (GEP) endocrine system of the mouse and a stomachless fish, *Barbus conchoni*. Histochemistry, 84, 4-6, 471-483.
- Rombout, J.H.W.M., Bol, J. and Thiele, T.J.J., 1986 b, Ultrastructural characterization of 6 immunoreactive enteroendocrine cells in *Barbus conchoni* (Teleostei, cyprinidae). Histochemistry, 85, 6, 467-473.
- Santos, Y., Toranzo, A.E., Dopazo, C.P., Nieto, T.P. and Barja, J.L., 1987, Relationships among virulence for fish, enterotoxigenicity and phenotypic characteristics of motile *Aeromonas*, Aquaculture, 67:1-2, 29-39.
- Santos, Y., Toranzo, A.E., Barja, J.L., Nieto, T.P. and Villa, T.G., 1988, Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. Infection and Immunity, 56, 12, 3285-3293.

- Schulz, D., 1980, Erythrodermatitis of carp: Studies of the mode of infection. Fish Diseases, Third COPRAQ-Session, Springer. Verlag. Berlin Heidelberg, New York, p. 137-144.
- Shu, S., Ju G. and Fan L., 1988, The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroksidase histochemistry of the nervous system. Neurosci Lett 85:169-171.
- Sioutas, S., Hoffmann, R.W., Pfeil, P.C. and Fischer, S.T., 1991, Carp erythrodermatitis (CE) due to an *Aeromonas hydrophila* infection. Journal of Veterinary Medicine, Series B, 38, 3, 186-194.
- Snieszko, S.F. and Axelrod, H.R., 1971, Disease of fish. T.F.H. Publication, London, pp. 41.
- Snieszko, S.F. and Bullock, G.L., 1976, Diseases of freshwater fishes caused by bacteria of genera *Aeromonas*, *Pseudomonas* and *Vibrio*. U.S. Fish Wild Life Service, Fish Disease, Leaflet 40, p.10.
- Soliman, M.K., Ease, M.E.S., Faisal, M., Abou-Alazm, I.M., and Hetrick, F.M., 1989, Motile aeromonas infection of striped (grey) mullet *Mugil cephalus*. Antonie van Leeuwenhoek, 56, 4, 323-335.
- Solcia, E., Capella, C. and Buffa, R., 1987, Endocrine cells of the digestive system. In: Johnson LR, ed. Physiology of the gastrointestinal tract. New York: Raven Press, 111.
- Stevens, A. and Lowe, J, 1993, Histology. Mosby-Year Bok Europe Limited. London.
- Sternberger, L.A., 1986, Immunocytochemistry. 3 rd ed. Wiley, New York.
- Subasinghe, R.P., Jayasinghe, L.P., Balasuriya, K.S.W. and Kulathilake, M., 1990, Preliminary investigations into the bacterial and fungal pathogens associated with the ulcerative fish disease syndrome in Sri Lanka. Manila, Philippines Asian Fisheries Society, pp. 655-657.
- Şimşek S., Ertaş, H.B., Eröksüz, H. ve Sarıeyyüpoğlu, M., 1997. Hastalıklı lepistes (*Lepistes reticulatus*)'lerden izole edilen *Aeromonas hydrophila* ile aynalı sazan (*Cyprinus carpio* L.)'da eritrodermatitis oluşturulması. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Akdeniz Balıkçılık Kongresi, 9-11 Nisan, İzmir, s. 841-847.
- Tagliafierro, G., Farrini, L., Rossi, G.C. and Vacchi, M., 1989, Distribution of somatostatin and glucagon immunoreactive cells in the gastric mucosa of some cartilaginous fishes. Gen. Comp. Endocrinol. 75: 1-19.



- Takeuchi, T. and Miyazaki, T., 1986, Detection of aeromonad bacteria in tissues of the carp with fluorescent antibody techniques. Bull. Fac. Fish Mie Univ., Miedai Suisan Kenpo, 13, 145-150.
- Tarakçı, B., 1995, Neurochemical coding of neural system of rat. PhD Thesis, England, p. 150.
- Taylor, I.L., Byrne, N., Christie, D., Ament, M. and Walsh, J.H., 1982, Effect of individual L-amino acids on gastric acid secretion and serum gastrin and pancreatic polypeptide release in humans. Gastroenterology, 83-273.
- Taylor, I.L., 1989, The pancreatic polypeptide family: Pancreatic polypeptide, neuropeptid Y, and peptide YY. In: Makloofh, G.M., ed. Handbook of physiology- The gastrointestinal system. II. Bedhesda, American Physiology Society, p. 476.
- Timur, G. ve Timur, M., 1985, Eğridir Gölü sudak (*Stizostedion lucioperca*, L. 1758) balıklarında yüksek mortaliteye neden olan bakteriyel hemorajik sepsis hastalığı üzerinde bir araştırma. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 32, 1, 33-41.
- Timur, M., 1986, Aynalı sazan (*Cyprinus carpio* L.) ve japon balıklarında (*Carassius auratus* L.) görülen bakteriyel hemorajik sepsis hastalığı üzerinde karşılaştırmalı bir araştırma. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi, 3, 9-12, 95-105.
- Torres, J.L., Shariff, M. and Law, A.T., 1990, Identification and virulence screening of *Aeromonas* spp. Isolated from healthy and epizootic ulcerative syndrome (EUS) infected fish. The Second Asian Fisheries Forum Proceedings of the Second Asian Fisheries Forum, Tokyo, Japan, 17-22 April, pp. 663-666.
- Trust, T.J. and Sparrow, R.A.H., 1974, The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. Canadian Journal of Microbiology., 20, 1219-1228.
- Ventura, M.T. and Grizzle, J.M., 1988, Lesions associated with natural and experimental infections of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). Journal of Fish Diseases, 11, 397-407.
- Walker, J.P. and Thompson, J.C., 1987, Substance P. In: Thompson JC, ed. Gastrointestinal endocrinology. New York: McGraw-Hill, 317.
- Walsh, JH., 1987, Gastrointestinal hormones. In: Johnson LR, ed. Physiology of the gastro-intestinal tract. New York: Raven press, 181.

- Waltman, W.D., Shotts, E.B. and Hsu, T.C., 1982, Enzymatic characterization of *Aeromonas hydrophila* complex by the API-ZYM system. J. Clin. Microbiol. 16(4): 692-696.
- Wasserman, R.H. and Taylor, A.N., 1966, Vitamin D3 induced calcium binding protein in chick intestinal mucosa. Science 152: 791-793.
- Wolke, R.E., 1975, Pathology of bacterial and fungal diseases affecting fish. W.E. Ribellin and G. Migaki, editors, The pathology fishes. University of Wisconsin Press. Madison, Wisconsin, 33-116.
- Yang, H., Morrison, C.M., Conlon, J.M., Laybolt, K. and Wright J.R., 1999, Immunocytochemical characterization of the pancreatic islet of Oreochromis (Oreochromis niloticus). Gen. Comp. Endocrinol. 114, 1, 47-56.
- Yasutake, W. and Wales, J.H., 1983, Microscopic anatomy of salmonids: An Atlas. U.S. Dept. of the interior, fish and wildlife service. Resource Publication 150. P.24-31.
- Yui, R., Nagata, Y. and Fujita, T., 1988, Immunocytochemical studies on the islet and the gut of the arctic lamprey, *Lampetra japonica*. Arch. Histol. Cytol., 51, 1, 109-119.
- Yui, R. and Fujita, T., 1986, Immunocytochemical studies on the pancreatic islets of the ratfish, *Chimaera monstrosa*, Arch Histol. Jpn. Aug., 49(3): 369-77.

EC YÜKSEKÖĞRETİM
DOKÜMANASYON BÖLÜMÜ

