

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LEVAMİSOL'ÜN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞININ (*Oncorhynchus*
mykiss, WALBAUM) İMMUN SİSTEMİNE ETKİSİNİN**
ARAŞTIRILMASI

Ünal İSPİR

114342

T.C. FİRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

114342

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI

ELAZIĞ
2001

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LEVAMİSOL'ÜN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞININ (*Oncorhynchus mykiss*, WALBAUM) İMMUN SİSTEMİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Ünal İSPİR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 22/07/2021.. Tarihinde, Aşağıda Belirtilen Jüri Tarafından Oybirliği / Oy çokluğu
İle Başarılı / Başarısız Olarak Değerlendirilmiştir.

(İmza)
Danışman

Yrd.Doç.Dr.Mustafa DÖRÜCÜ

(İmza)
Üye

Doç.Dr. Burhan GELİNKAYA

(İmza)
Üye

İ. İspir

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

ÖZET**YÜKSEK LİSANS TEZİ****LEVAMİSOL'ÜN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞININ (*Oncorhynchus mykiss*,
WALBAUM) İMMUN SİSTEMİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI****Ünal İSPİR**

Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Ana Bilim Dalı

2001, Sayfa: 44

Bu çalışmada; levamisolün gökkuşağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) spesifik ve non spesifik savunma mekanizmalarına olan etkileri incelendi.

Araştırmada; ağırlıkları 99.35 – 215.95 g olan 60 adet gökkuşağı alabalığı kullanıldı. Balıklara 5 mg kg⁻¹ levamisolün intraperitoneal uygulamasından sonra kalpten alınan kan da Hematokrit, Lökosit, Glass-adherent NBT pozitif hücre aktivasyonu, Lökosit düzeyi, NBT aktivitesi, Nötrofil ve Monositlerin potansiyel öldürme aktiviteleri, Fagositik aktivite, Myeloperoksidaz üretimi, İmmunoglobulin, Lizozim ve Seroluplazmin aktiviteleri tespit edildi.

Çalışmada; Hematokrit, Lökosit ve İmmunoglobulin düzeylerinde, kontrol ve deneme grubu arasında farklılığın olmadığı ($p>0.05$), ancak diğer immün parametrelerde artışın yüksek olduğu ve kontrol grubu ile deney grubu arasında anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p<0.05$).

Anahtar kelimeler: İmmunomodulasyon, Levamisol, Gökkuşağı alabalığı

SUMMARY

Master Thesis

A STUDY ON EFFECTS OF LEVAMISOLE ON THE IMMUNE SYSTEM OF RAINBOW TROUT, (*Onchorhynchus mykiss*, WALBAUM)

Ünal İSPİR

Firat University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Fish Production and Breeding

2001, Page: 44

In this study, effects of levamisole on specific and non-specific immune mechanisms of rainbow trout (*O. mykiss*) were examined. The mean weight of 60 fish used in this study was 99.35 – 215.95 g.

After injecting 5mg kg⁻¹ levamisole intraperitoneally, blood was taken from hearth of fish and haematocrit, leucocrit, glass-adherent NBT positive cell activation, leucocyte level, NBT activities, potential killing activities of neutrophyl and monocytes, fagocytic activity, myeloperoxidase production, immunoglobulin, lysozyme and ceruloplasmin activity were determined.

No differences were found at levels of haematocrit, leukocrit and immunoglobulin between control and experimental groups ($p>0.05$). However, there was considerable increase in other immune parameters and significant differences were detected between control and experimental groups ($p<0.05$).

Key Words: Immunomodulation, Levamisole, Rainbow trout

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada; her türlü desteğini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa DÖRÜCÜ'ye, çalışmada kullanılan bakteri suşlarını temin etmemde yardımcı olan S.D.Ü. Su Ürünleri Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayşegül KUBİLAY'a ve Arş. Gör. Dr. Engin ŞEKER'e, laboratuvarlarını kullanmama izin veren F. Ü. Vet. Fak. Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, manevi destek ve fikirleriyle her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım Cebrahil TÜRK ile M. Enis YONAR'a, çalışmayı maddi yönden destekleyen Fırat Üniversitesi Araştırma Fonu (FÜNAF)'a ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim sevgili aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

FOTOĞRAFLAR LİSTESİ.....	VII
TABLolar LİSTESİ.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ.....	3
2.1. Balıklarda İmmun Sistem.....	4
2.1.1. Balıklarda Non-spesifik Savunma Mekanizmaları	5
2.1.2. Balıklarda Spesifik Savunma Mekanizmaları.....	9
2.2. İmmunostimulantlar.....	9
2.2.1. Levamisol.....	11
3. MATERYAL ve METOT.....	14
3.1. Balık Kanında Hematokrit ve Lökosit Düzeyleri.....	15
3.2. Adherens/ NBT Testi (Glass-adherent NBT Pozitif Hücre Aktivasyonu)	15
3.3. Hemositometre ile Hücre Sayımı (Lökosit Düzeyi).....	15
3.4. Nitroblue Tetrazolium (NBT) Aktivitesi-Spektrofotometrik Test (Nötrofil Oksidatif Radikal Üretimi).....	16
3.5. Balıkta Nötrofil ve Monositlerin Potansiyel Öldürme Aktivitesi.....	16
3.6. Balıkta Fagositik Aktivite.....	17
3.7. Balık Hücrelerinin Myeloperoksidaz (MPO) Üretimi.....	17
3.8. Balık Plazmasında Toplam İmmunoglobulin.....	17
3.9. Balık Plazmasında Lizozim Aktivitesi.....	18
3.10. Balık Plazmasında Seruloplasmin Aktivitesi.....	18
4. SONUÇLAR.....	19
5. TARTIŞMA	27
KAYNAKLAR.....	38

FOTOĞRAFLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Foto 3.1 Denemede kullanılan tankın görünüşü.....	14
Foto 4.1 İntraperitoneal enjeksiyonun yapıldığı bölge.....	20
Foto 4.2 Balıkların kalplerinden kan alma işlemi.....	20



TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.1	Levamisol enjekte edilen gökkuşağı alabalığının hematokrit ve lökokrit düzeyleri.....	19
Tablo 4.2	Levamisolün gökkuşağı alabalıklarının glass-adherent, lökosit ve nötrofil oksidatif radikal üretimine (NBT) etkisi.....	22
Tablo 4.3	Gökkuşağı alabalığında levamisol enjeksiyonunun polimorfnükleer nötrofil granülositlerin potansiyel öldürme aktivitesine ve periferel kan lökositlerinin fagositik aktivitesine etkisi.....	23
Tablo 4.4	Gökkuşağı alabalığının myeloperoksidaz (MPO) ve toplam immunoglobulin (Ig) miktarına levamisolün etkisi.....	25
Tablo 4.5	Levamisolün gökkuşağı alabalığının kan plazmasındaki lizozim ve seruloplazmin aktivitesine etkisi.....	26

1. GİRİŞ

Dünyadaki diğer canlılarda olduğu gibi insanlar da metabolitik aktivitelerini dışarıdan aldıkları besinlerden karşılamak zorundadırlar. Artan nüfus yoğunluğu ile birlikte dünyanın bir çok yerinde gıda yetersizliğinden dolayı ölümler görülmekte ve önümüzdeki yıllarda bu durumun hızla artacağı bilinmektedir. Günümüzde balık, dünyanın besin ihtiyacının önemli bir kısmını karşılamakta ve hatta mevcut yiyecek sıkıntısına da kısmi bir çözüm olarak görülmektedir. Bu nedenle tüm dünyada intensif kültür balıkçılığına verilen önem gün geçtikçe artmaktadır. Ancak gelişen intensif kültür balıkçılığı uygulamaları ile birlikte balık hastalıkları da gittikçe sorun olmaya başlamıştır.

Balıkçılık işletmelerinde herhangi bir nedenden dolayı meydana gelen ve önemli ekonomik kayıplara neden olan bazı bakteriyel ve viral hastalıklara karşı uygun bir tedavi günümüze kadar geliştirilememiştir. Antibiyotik ve dezenfektanların sadece kısa bir süre için etkili olması ve çevrede birikmesi gibi olumsuzluklara neden olması, aşılarda ise tüm hastalıklara karşı kullanılabilirliğinin imkansızlığı, immunostimulantların balık hastalıklarında koruyucu olarak kullanılmasını kaçınılmaz hale getirmiştir.

Balıkların non-spesifik savunma mekanizmaları; konakçı dokusunda hasara neden olan etkenleri ortadan kaldıran veya yayılmasını sınırlayan, enfeksiyonun meydana gelmesini engelleyen ve enfeksiyona karşı vücudun cevap vermesini sağlayan faktörlerin bir çoğunu içine almaktadır (Ellis, 1981). İmmunostimulantlar bulaşıcı hastalıklara karşı balıkların non-spesifik savunma mekanizmalarında da olumlu bir artışa neden olmaktadır. Dolayısıyla herhangi bir hastalık sırasında immunostimulant verilen balıklarda non-spesifik savunma mekanizmaları hızla devreye girer ve hastalık başlamadan önlenmesine yardımcı olunabilir. İmmunostimulantlar, vücudun savunma mekanizmasında makrofajları ve nötrofilleri kuvvetli bir şekilde uyarır ve non-spesifik savunma mekanizmalarını harekete geçirir. Diğer adjuvant karakterli maddelerle kullanıldığında spesifik ve non-spesifik immun sistemi tamamen etkilemektedir (Arda ve diğ., 1994).

Farklı immunostimulantların çeşitli balıklara değişik yollarla verildiği bir çok çalışmada; hastalıklara karşı mücadelede önemli bir etkiye sahip oldukları gözlenmiştir

(Olivier ve diğ., 1985; Kitao ve Yoshida, 1986; Siwicki, 1987, Siwicki, 1989; Verlhac ve diğ., 1996; Findlay ve Munday, 2000; Findlay ve diğ., 2000).

İmmunostimulantların; nötrofillerin fagositik faaliyetleri, serumda lizozim ve lökosit seviyesi ile fagositik aktivite gibi immunolojik faaliyetlerin artışına neden olması bu maddelerin balık hastalıklarında koruyucu olarak kullanılmasını yaygınlaştırmaktadır. Kültür balıkçılığında immunostimulantların enfeksiyonlara karşı kullanılması yeni bir uygulama olmasına rağmen ilerisi için oldukça umut vericidir.

Bu araştırmanın amacı; bir immunostimulant olan levamisolün gökkuşağı alabalıklarındaki stimulant etkilerini immunolojik testlerle belirleyerek literatürdeki boşluğu doldurmaktır. Su ürünlerinde immunolojik çalışmaların hemen hemen yok denecek kadar az olduğu ülkemizde, bu çalışmayla levamisolün enfeksiyöz balık hastalıklarında koruyucu bir madde olarak kullanılabilirliği araştırıldı. Dolayısıyla kültür balıkçılığında bu ve bunun gibi maddelerin kullanılmasıyla patojenlerden kaynaklanan kayıpların en aza indirilip, balık yetiştiriciliğine katkı sağlanması hedeflendi.

Bu tez çalışması; Fırat Üniversitesi Araştırma Fonu (FÜNAF) tarafından 389 nolu proje olarak desteklenmiştir.

2. LİTERATÜR BİLGİSİ

Balıklarda, çok karmaşık bir yapı olan immun sistem üzerine yapılan çalışmalar yakın geçmişe kadar çok fazla değildi. Ancak son yıllarda gelişen kültür balıkçılığı ile birlikte artan balık hastalıklarına karşı savunma mekanizmaları önem kazanmış ve bu konuda yapılan çalışmaların sayısı bir hayli artmıştır. Bu nedenle bir çok balık türünün spesifik ve non-spesifik savunma mekanizmaları ile bu mekanizmalar üzerine etkili immunomodulator ilaçların etkilerinin araştırıldığı bir çok çalışma birbirini izlemiştir (Olivier ve diğ., 1985; Kitao ve Yoshida, 1986; Chung ve Secombes, 1987; Siwicki, 1987; Siwicki, 1989; Baba ve diğ., 1993; Sakai ve diğ., 1993; Anderson ve Siwicki, 1994; Verlhac ve diğ., 1996; Chen ve diğ., 1998; Kakuta, 1998; Wahli ve diğ., 1998; Findlay ve Mundlay, 2000).

Balık yetiştiriciliğini olumsuz bir şekilde etkileyen balık hastalıklarından korunmak amacıyla immunostimulantların kullanılması hakkında dünyada bir çok araştırma yapılmış olmasına rağmen ülkemizde bu alanda yalnızca bir çalışmaya rastlanılmıştır. Kubilay ve Timur (1997), *Yersinia ruckeri* bakterisine karşı gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nin antikör düzeyine FIA (Freund's incomplete adjuvant)'nın etkilerini çeşitli aglutinasyon yöntemleriyle tespit etmeye çalışmışlardır.

Dünyada ise; bu alanda bir çok araştırmacı tarafından ayrıntılı çalışmalar yapılmış ve oldukça önemli bilgiler elde edilmiştir. *Saccharomyces cerevisiae*'nin hücre duvarlarından elde edilen bir polisakkarit olan glucan ile β -1,3-glucan ve peptidoglucan gibi birçok türevinin çeşitli balıklar üzerindeki etkileri araştırma konusu olmuştur (Sakai, 1999). Glucan'ın Atlantik salmonlara (*Salmo salar*) intraperitoneal olarak verildiğinde *Yersinia ruckeri*, *Vibrio anguillarum* ve *V. salmonicida* enfeksiyonuna karşı mortalitenin azaldığı ve balığın immun sisteminde olumlu bir artışın olduğu gözlenmiştir (Robertsen ve diğ., 1990). Sakai ve diğ. (1992), gökkuşağı alabalıklarına intraperitoneal olarak verdikleri kitin ile *V. anguillarum* enfeksiyonuna karşı hücrel immunitenin, fagositik aktivite ve böbreklerde lizozim faaliyetinin artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Tavuk yumurtalarının fermantasyonu sonucu elde edilen ve immunostimulatik karakterde olan EF-203 ile aşıl原因 gökkuşağı alabalıklarında *Renibacterium salmoninarum*'a karşı balıkların böbrek lökositlerinde, NBT (Nitroblue tetrazolium) yanıtında ve fagositik aktivitede yükselme olduğu gözlemlenmiştir (Sakai

ve diğ., 1995). Makrofajların ve B lenfositlerin faaliyetini artırması gibi immunostimulatik etkiye sahip Muramyl dipeptid (MDP)'in FCA (Freund's complete adjuvant) ile karışımının *O. kisutch*'ların *Aeromonas salmonicida*'ya karşı direncini 47 kat arttırdığı tespit edilmiştir (Olivier ve diğ., 1985). Hardie ve diğ. (1990; 1991), vitamin C ve E'nin hücrel ve humoral savunma sistemine olan etkilerini ortaya koymuşlardır.

Sentetik bir immunostimulant olan levamisol (Sakai, 1999) ile balıklar üzerine yapılmış birkaç çalışmaya rastlanılmaktadır. Siwicki (1987), sazan (*Cyprinus carpio*) balıklarına oral yolla verdiği levamisolün immunostimulatik etkilerini incelemiş ve fagositik faaliyetin, nötrofil ve lökosit düzeyinin, myeloperoksidaz ile serumda lizozim aktivitesinin yükseldiğini ortaya koymuştur. Anderson ve Jeney (1992), *A. salmonicida* O-antijenine karşı gökkuşağı alabalıklarının immun sisteminde levamisolün humoral ve hücrel aktivitelerinin her ikisini de artırdığını bildirmişlerdir.

2. 1. Balıklarda İmmun Sistem

Vücudun çeşitli patojen etkenlere karşı kendini koruması, hayatını devam ettirebilmesi için zorunludur. Savunma mekanizmalarının önemi enfeksiyonların ortaya çıkmasından sonra daha iyi anlaşılmaktadır. Balıklar, bulundukları ortam nedeniyle hastalık yapabilme kabiliyetindeki bir çok mikroorganizma ile her an karşılaşma riskine sahip iken, bu karşılaşmanın çok az bir kısmında tehlikeli sorunlar ortaya çıkmaktadır. Çünkü; vücudun savunma sistemi, önemli bir belirti göstermeden patojen mikroorganizmayı etkisiz hale getirmektedir. Bu nedenle enfeksiyon yakalanma olasılığının çok yüksek olduğu su ortamında yaşamak zorunda olan balıklar için patojen mikroorganizmalara karşı vücudun göstereceği direnç büyük önem taşımaktadır.

Bir çok araştırmacı balığın immun sisteminin çeşitli safhalarını incelediği çalışmalarında memeliler ile balıkların bağışıklık sistemi arasında büyük bir benzerlik olduğunu bildirmişlerdir (van Muiswinkel, 1992; Heath, 1995; Vadstein, 1997; Sakai, 1999). Balıklar da, diğer canlıların bir çoğunda olduğu gibi spesifik ve non-spesifik karakterde olan humoral ve hücrel savunma mekanizmalarının bir çoğunu içermektedir (Vadstein, 1997).

2. 1. 1. Balıklarda Non-spesifik Savunma Mekanizmaları

Balıklarda non-spesifik savunma mekanizmaları; konakçıda fizyolojik ve morfolojik hasara neden olan etkenleri ortadan kaldıran, enfeksiyonun meydana gelişini engelleyen, oluşmasını geciktiren veya vücudun cevap vermesini sağlayan deri, mukus, gastrointestinal bölge, fagositik hücreler vb. gibi faktörlerin bir çoğunu içine almaktadır (Ellis, 1981).

Balıklarda deri; keratin içermeyen epidermis hücreleriyle yüksek omurgalılarınkinden farklılık göstermektedir (Ellis, 1981). Bir çok patojenik mikroorganizma sağlam deriden geçememektedir. Sağlam derinin epitel örtüsü mikroorganizmaların girişini önleyen önemli ve iyi bir bariyerdir. Mikroorganizmalara karşı balığın ilk savunma sistemi olan deri ve solungaçlarda mukus salgılanarak epitel artışına gidilmektedir (Wandelaar Bonga, 1997). Bu epitel katmanının yaralanmaması ve bütünlüğünün bozulmaması gerekmektedir (Arda ve diğ., 1994).

Mukus; antimikrobiyal sistemde komplementin oluşması için oldukça önemlidir. Balık ile çevresi arasında koruyucu bir tabaka konumunda olan mukus, çevrede patojen mikroorganizmaların görülmesiyle tüm vücudu kaplamaktadır (Ellis, 1981). Mukus kıvam olarak çok yoğun ve akışkan bir maddedir. Mikroorganizmaların içeri girebilmeleri için önce bu mukus bariyeri geçmesi ve sonrada epitel hücrelere temas ederek onlara tutunması gerekmektedir. Mukoid tabakanın devamlı hareket halinde olması mikropların hücrelere direk temasını zorlaştırmaktadır (Arda ve diğ., 1994). Fiziksel ve kimyasal tahrişler ile enfeksiyonlara tepki esnasında mukus salgısının oranı artmaktadır. Derideki mukus komponentleri; antimikrobiyal sistemde önemli etkiye sahip olmaktadır. Yakın geçmişe kadar yapılan araştırmalarda salmonların epitelial hücrelerinin göçebe davranışları ve onların *in vitro* ortamda da fagositik ve yara iyileştirici özellikte oldukları ileri sürülmüştür (Dalmo ve diğ., 1997).

Gastro-intestinal sistem; uzun bir süre yalnızca mikroorganizmaların yaşamlarını devam ettirebilmeleri için enerji ve doku yenilenmelerinde kullanılan temel maddelerin, alınan besinlerden üretildiği bir organlar gurubu olarak bilinmekteydi. Fakat yapılan araştırmalar bu sistemin, bu ana görevi yanında canlının yaşamını tehlikeye sokacak çeşitli etkenlere karşı korunmasında da rol oynadığı ortaya koyulmuştur (İstanbuluoğlu, 1978). Gastro-intestinal bölge mikrobiyal invazyon için bir bariyer görevi görür. Düşük pH'ın etkisiyle çevredeki kuvvetli patojenlere karşı midenin safra, tripsin ve pepsin gibi

enzimlerin salgılanması bu sistemin önemli görevlerindendir (Ellis, 1981; Dalmo ve diğ., 1997). Salmonlarda ve diğer bazı balık türlerinde de, makro-moleküllerin bağırsaklarda absorpsiyonu için asıl yerin bağırsakların posterior kısmı olduğu düşünülmüştür. Bağırsaklarda; immunoglobulinler, peroksidaz ve ferritin gibi makro-moleküllerin absorpsiyon oranını tayin etmektedir. Balık larvalarının olgunlaşmamış bağırsaklarında proteinlerin, yetişkinlerin bağırsaklarında ise β (1.3)-D-glucan gibi immunostimulant karakterdeki makro-moleküllerin posterior kısımda absorbe olduğu ortaya konulmuştur (Dalmo ve Seljelid, 1995; Dalmo ve diğ., 1997).

Balıklarda non-spesifik savunma mekanizmalarının en önemli faktörlerinden biri de fagositik hücrelerdir. Memelilerde makrofaj ve nötrofil olmak üzere başlıca iki fagositik hücre tipi vardır. Makrofajlar bir çok dokuda bulunmasına rağmen lenf düğümleri, dalak ve karaciğerde oldukça fazladır. Teleostlarda ise solungaçları içine alan dokularda da bulunmasına rağmen kalbin atriumunda, dalak ve karaciğerin Reticulo-endothelial hücrelerinde daha fazla bulunmaktadır (Ellis, 1981). Vücutta humoral ve hücrel savunma mekanizmalarında ve diğer immunolojik aktivitelerinde direkt veya indirekt olarak önemli rolleri bulunan, myeloid sisteme ait ve mononükleer özellikteki hücreler olan makrofajlar balık ve diğer omurgalılarda immun sistemin en önemli elemanı olarak görülmektedir. Makrofajlar daha çok, ayrılmış nukleuslarıyla 1-10 μ m boyutlarındaki partikülleri yutacak güçtedir (Heath, 1995; Dalmo ve diğ., 1997). Her türlü yabancı partikül yanında vücudun ölü ve hasta hücreleri ile hücrel artıklarını yutarak vücuttan uzaklaştırmaya çalışırlar. Makrofajlar nötrofillerden daha geç fagositoza başlamalarına rağmen ömürleri boyunca sürekli fagositoz yapabilirler. Fagositoz olayının bir devamı olarak vücuda ilk kez giren yabancı maddeleri hücre içinde işleyerek immun sisteme sunma özelliğine sahiptir (Diker, 1998). Makrofajların vücutta çok yönlü bir işleve sahip olması (fagositoz, antijenlerin işlenmesi ve sunulması, salgısal aktivite, tümorisidal etkinlik vd.) bu hücrelerin öneminin ne kadar fazla olduğunu göstermektedir. Fagositik hücrelerin ikincisi nötrofillerdir. Memelilerde nötrofiller önemli fagositik hücrelerden olup yangı oluşumu sırasında çok hızlı bir şekilde meydana gelirler. Nötrofiller; balıklarda önemli bir granulopoetik organ olan böbreklerde daha fazla bulunmakta, dalakta ise daha az görülmektedir. Balık nötrofilleri memeli nötrofillerine morfolojik ve histokimyasal boyama bakımından benzerlik göstermektedir. Balıklarda nötrofillerin fagositik aktivitesi kesin olarak açıklanmış olsa

da çelişkili ifadeler vardır (Ellis, 1977; 1981). Ellis (1976), Pisi balık (*Pleuronectes platessa*)'larında nötrofillerin karbon taneciklerini fagosite edemediğini bildirmiştir. Ancak Finn ve Nielson (1971), gökkuşağı alabalıklarında deneysel olarak oluşturulan yara iltihaplanmasında makrofajların ve nötrofillerin fagositozunu kesin olarak bildirmiştir. Fizyolojik ve patolojik bir işleme tabi tutulan omurgalıların vücudunun pek çok organ ve dokularında fagositik hücreleri bulmak mümkündür (Dalmo ve diğ., 1997).

Balıklarda non-spesifik hücresel immunitenin yanında; NK (Doğal Öldürücü Hücreler) hücreleri, tripsin, lizozim, CRP (C-reaktif protein), seruloplazmin (Cp) ve proteinaz inhibitörler gibi çeşitli antimikrobiyal maddelerin non-spesifik humoral savunma oluşturduğu bilinmektedir (Dalmo ve diğ., 1997).

Non-spesifik hücresel bağışıklık kazandırma özelliğinde olan NK hücrelerinin memelilerde sitotoksik özellikte olduğu tespit edilmiştir. Bu hücrelerin kökenleri tam olarak açıklık kazanmamakla birlikte lenfositlerin bir formu olarak düşünülmektedir. Balıklarda da benzer hücreler kesin olarak tanımlanmıştır. NK hücreleri tatlısu balıklarının kan ve böbreklerinin normal hücreleridir (Ellis, 1981). NK hücreleri; tümör hücreleri ve virusla enfekte olmuş hücelere karşı sitotoksik etki göstermektedir. NK hücrelerinin antijene spesiflik ve MHC (büyük doku uygunluk kompleksi) bağımlılığı yoktur. Bu nedenle NK hücresi doğal bağışıklık kapsamında etkinlik gösteren bir hücre olarak kabul edilmektedir. NK hücreleri; sitotoksik T lenfosit hücreleriyle hedef hücrenin arasında fiziksel temas sonucunda oluşan bir mekanizma ile yabancı hücreleri lize etme özelliğine sahiptir (Ellis, 1988; Gülmezoğlu ve Ergüven, 1994).

Lizozim (Muramidase) ilk defa 1922 yılında *Micrococcus lysoidekticus* üzerine etkisi gösterilerek tanımlanmıştır. Mukolitik enzim etkisi gösteren bazik bir proteindir. Lizozim, lökositler tarafından salgılanmakta olup Gram pozitif bakterilerin hücre duvarlarındaki polisakkaritleri şekere indirgeyerek bakterilerin parçalanmasına ya da parçalanmadan ölmesine neden olur. İntrasellüler olarak Gram negatif bakterilere de etkilidir. Gram negatif bakterilerin hücre duvarlarındaki peptidoglikan ve muramik asit maddeleri en dıştaki dış membran tarafından korunduğundan bunlara da lizozimin komplementle birlikte etkisi vardır. (Dalmo ve diğ., 1997; Bilgehan, 1999).

C-Reaktif Protein; bir rastlantıya bağlı olarak *Streptococcus pneumoniae* kapsülünde bulunan C polisakkaritine bağlanma özelliği gösterdiğinden bu ismi

almıştır. CRP her biri 21.500 kDa ağırlığında olan aynı yapıdaki beş alt ünite içeren yaklaşık 110.000 molekül ağırlığında bir proteindir. Alt üniteler küresel yapıda olup birbirlerine nonkovalent bağlarla bağlanarak dairesel bir şekil oluşturmuşlardır. C-reaktif protein; bakterilere bağlanarak, aynı zamanda buraya komplementin tutunmasını da sağlar. Bu şekilde kaplanan (opsonize olan) bakteriler fagositler tarafından daha kolay fagosit edilir (Bilgehan, 1999). Memelilerde görülen CRP ile serum amiloid protein (SA) bazı balık türlerinde bulunduğu kanıtlanmıştır. Gökkuşluğu alabalıklarında ön böbrek lenfositlerinin ve dış yüzeylerinin CRP ile kaplandığı tespit edilmiştir. Mitojenik (Konkavalin A ve LPS) stimulasyondan sonra CRP-pozitif lenfositlerin yüzdelik oranının yükseldiği gözlenmiştir. Ön böbrek fagositleri ve onların bakteri reseptörleri ile fagositozda CRP'nin etkileri üzerine yeteri kadar bilgi yoktur (Dalmo ve diğ., 1997).

Apotransferrinler (apotransferrine iki demir iyonun bağlanması); seruloplazmin ve metallothionin (bakır, çinko, kadminyum ve civa gibi metal iyonlarının bağlandığı) gibi metal bağlayıcı proteinler (Siderophilinler) bakterilerin büyümesini engeller. Bütün bu maddeler balıkta tespit edilmiştir. Metallothioninlerin spesifik bağlayıcıları makrofajların plazma membranında solunum faaliyetinin hızlanmasını başlattığı ileri sürülmüştür. Apotransferrinler; *Listeria monocytogenes* gibi intraselüler bakterileri içine alan patojenlere karşı, demirleri bağlayarak antimikrobiyal özellik gösterirler (Dalmo ve diğ., 1997).

α_2 - makroglobulin gibi maddeler balık serumundaki proteinaz inhibitörlerdir. Proteinaz inhibitörlerin temel görevi kan ve diğer vücut sıvılarının hemostasisini sürdürmek ve komplement ile pıhtılaşma gibi mekanizmaların hareketini düzenlemektir. Bir çok mikroorganizma ve parazit, konakçı dokularını ekstraselüler sindirimle dışarıya taşır. Proteinaz inhibitörler bunların bazı faaliyetlerine karşı koyabilirler. İmmun sistemin spesifik bölümü ile proteinaz inhibitörler arasında antijen modülasyonu bakımından bir ilişki olduğu ortaya konulmuştur (Dalmo ve diğ., 1997).

Bunlardan başka balıklarda; sitokinler, interferon ve yaklaşık yirmi serum proteinin oluşturduğu komplement sistem de non-spesifik humoral savunma mekanizmasında görevlidir.

2. 1. 2. Balıklarda Spesifik Savunma Mekanizmaları

Balıklarda spesifik savunma mekanizmalarının en önemli elemanlarını immunoglobulinler oluşturmaktadır. B lenfositlerin başkalaşımı ile ortaya çıkan immunoglobulinler antijenik uyarımlar sonucu vücutta plazma hücreleri tarafından sentezlenen ve homolog antijenler ile birleşerek spesifik bir reaksiyon verebilen glikoprotein karakterindeki moleküllerdir. İmmunoglobulinler bütün memelilerin kan sıvısında (plazmada) bulunur. Daha az miktarda dokularda hücreler arası sıvılarda yer alırlar. Kan veya plazma pıhtılaştığında serumda bulunurlar. Bu gün memelilerde IgG, IgM, IgA, IgD ve IgE olmak üzere beş farklı immunoglobulin sınıfı bulunduğu bilinmektedir (Arda ve diğ., 1994; Gülmezoğlu ve Ergüven, 1994). Balıklarda ise bir sınıf immunoglobulin kesin olarak teşhis edilmiştir. Bu immunoglobulin memelilerde makroglobulin veya IgM olarak isimlendirilen sınıfa oldukça benzerlik göstermektedir (Darson, 1981; Tizard, 1992; Scapigliati ve diğ., 1999). Kıkırdaklı balıkların serumunda IgM'nin pentamerik (19 S) ve monomerik (7 S) formları; kemikli balıklarda ise tetramerik (17 S) ve monomerik formları bulunmaktadır (Tizard, 1992). Memelilerde bu sınıf antikorlar genellikle plazma proteini olarak bulunurlar ve immun yanıtta teşekkül eden ilk immunoglobulinleri oluştururlar. Sonra daha küçük molekül olan IgG'nin oluşmasına yardımcı olurlar. Memelilerde IgM ile IgG serumda ve doku aralıklarında bulunurken, IgA mukus ve süt sekresyonlarında bulunmaktadır. Balıklarda antikorlar ise serumda, doku sıvılarında, sindirim kanalında, deriden ve solungaçlardan salgılanan mukus içinde bulunmaktadır. Teleost balıklarda bulunan IgM'nin dışında, hiperimmunize edilmiş havuz balıklarında (*Carassius carassius*) IgG benzeri (Roberts, 1978); Avusturalya cadı balıklarında (*Myxinidae*) ise molekül ağırlığı 118 kDa olan ve IgN adı verilen IgM benzeri ikinci bir immunoglobulinin olabileceği bildirilmiştir (Tizard, 1992).

T lenfosit popülasyonu T yardımcı klonlarının yanı sıra hücreler arası bağışıklıktan (Cells mediated immunity, CMI) sorumlu klonlara da sahiptir. immun yanıtın bu bölümü geniş bir sahayı içine alır ve vücudu istila eden mikroorganizmaları fagosite ederek sindirmek suretiyle vücudun non-spesifik koruma mekanizmasını oluşturan makrofajların teminini sağlar. Primer antijen stimülasyonunda T lenfosit klonları CMI'da rol alan öldürücü, supresör ve lenfokin üreten hücreler gibi farklı

fonksiyonel hücrelere dönüşür. Bu hücrelerde, spesifik hücresel bağışıklığın yürütülmesinden sorumludurlar (Ellis, 1988).

2. 2. İmmunostimulantlar

İmmunostimulasyon, immunostimulant verilen bir organizmanın immuniter sistemini uyarmaktan ibaret uygulama olarak tanımlanmaktadır (Arda ve diğ., 1994). İmmunostimulasyon konusuna ilgi özellikle insan hekimliğinde; otoimmun hastalıkları, AIDS ve kanser tedavisi ile transplantasyon teknolojileri sahalarında, immunostimulatör etkili ajanların kullanılmalarının gerçekleşmesi bu maddelerin kullanımını bir hayli artırmıştır. Buna rağmen immunostimulatik etkili ilaçların özelliklerinin ve etki mekanizmalarının tam olarak bilinmemesi (Erganiş ve Kaya, 1990; Anderson, 1992), bu maddelerin Su Ürünlerinde kullanımını sınırlı kılmıştır.

Bakteriyel ve viral enfeksiyonlar zincirleme olarak organlara ait bir reaksiyonu yürütürler. Bu gibi enfeksiyonlar uzadıkça organizmanın immun yanıtı zayıflar. Organizma akut enfeksiyon olaylarında reaksiyonel faktörlerin çoğalmasını harekete geçirir. Bazı hallerde uyarılmış olan organizma reaksiyonların meydana gelmesine yardım eder ve bu reaksiyonların oluşmasını kolaylaştırabilir. Organizmada bu uyarımı immunostimulantlar ve adjuvantlar kullanılarak harekete geçirmek mümkündür. Organizma, yapılacak olan bu uyarımın etkisine bağlı olarak gerek antikorlar tarafından oluşturulan humoral ve gerekse sellüler yolla spesifik ve non-spesifik olarak immun cevabın uyarılmasına tepki gösterir (Arda ve diğ., 1994).

Hali hazırda piyasada bulunan pek çok immunostimulant madde rastlantısal olarak bulunmuş olup, sağıtımsal uygulamalarda spesifik etki göstermeleri nedeniyle sınırlı bir klinik uygulamaya sahiptir. Çoğu balığın kısa yaşam süresine sahip olması ve immun sistemlerinin karmaşıklığı nedeniyle patojenlere karşı spesifik cevabın oluşması için sürenin kısa oluşu (Siwicki ve Anderson, 1993), immunostimulant kullanımı için bir dezavantaj olarak görülmekteyse de, son yıllarda kullanılan immunostimulant ilaçların bir çoğu ile yapılan çalışmalarda spesifik ve non-spesifik savunma mekanizmasının her ikisini de artırdıkları ispatlanmıştır (Jeney ve Anderson, 1993 b; Siwicki ve diğ., 1994).

Enfeksiyöz etkenlere karşı organizmanın direncini artırmak amacıyla kullanılan immunostimulant maddeler ile tüm bulaşıcı enfeksiyonlarda mortaliteyi azaltmak

mümkün değildir. Balıklarda immunostimulantlar *Streptococcus*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* gibi bakteriyel; İnfeksiyöz Hematopoetik Nekrozis (IHN) gibi viral; *Ichthyophthirius multifiliis* gibi paraziter enfeksiyonlara karşı direnci artırabilmektedir. İmmunostimulantların; Viral Hemorajik Septisemi (VHS) gibi birkaç virüs enfeksiyonuna ve *Cytophaga* gibi bakteriyel enfeksiyonlara karşı pozitif etkileri bildirilmemiştir (Sakai, 1999).

İmmunostimulantlar gerek genç ve gerekse yetişkin hayvanlarda koruyucu ve sağıtıcı olarak kullanılmıştır (Arda ve diğ., 1994). Balıklarda yapılan immunostimulasyon çalışmalarında da yavru ve anaç balıkların immunostimulantlarla bir çok patojen mikroorganizmaya karşı immunizasyonu sağlanmış ve bu etkenlere karşı koruyucu ve sağıtıcı etkileri ispatlanmıştır (Kitao ve diğ., 1987; Siwicki, 1987; Jeney ve Anderson, 1993 c; Sakai ve diğ., 1993).

İmmunostimulantlar balıklarda yalnızca bazı enfeksiyonlara karşı spesifik ve non-spesifik savunma mekanizmalarını artırmamaktadır. Aynı zamanda immunostimulantlar ile büyümeyi etkileyen etkenler arasında bir ilişkinin olduğu bildirilmiştir. Balıkların yumurta dökümü sırasında seks hormonlarının etkisiyle immun sistemde bir zayıflama görülmektedir. Yumurta dökümü sırasında meydana gelecek olan bu zayıflık immunostimulantların kullanılmasıyla giderilebilir (Sakai, 1999).

İmmunoloji konusunda yapılan araştırmalar değerlendirildiğinde, diğer konularda olduğu gibi immunolojik immunostimulantların geliştirilmesi ve daha geniş amaçlı kullanılmaları bilimsel gelişmeye paralel olarak artmakta ve klasik yöntemlerden vazgeçilerek daha çok sayıdaki yeni teknikler ve yeni ürünler uygulama alanına sokulmaktadır. Araştırmalar; balık immunostimulantlarının kullanılması ve kullanımının yaygınlaştırılmasının bu sanayi kolunun gelişmesinde olumlu bir etkiye neden olacağını göstermektedir.

2.2.1. Levamisol

Levamisol kimyasal formülü L-2,3,5,6-tetrahydro-G-pnenylimidazo (2,1-b)-thiazole olarak bilinen bir imidazol bileşiğidir. Levamisol bir tetramizol izomeri olup 20 yılı aşkın bir süredir insan ve ruminantlarda geniş spektrumlu antihelmintik olarak kullanılmaktadır (Erganiş ve Kaya, 1990; Anderson, 1992; Tizard, 1992; Anderson ve diğ., 1997; Sakai, 1999).

Levamisolün antijenle birlikte veya antijenlerden sonra verildiği durumlarda primer antikor üretiminde bir baskılanma olduğu gözlenmiştir. Ancak sekonder immun cevapta bir artış olduğu tespit edilmiştir (Ellis, 1988; Erganiş ve Kaya, 1990). Antijenlere karşı dirençte ve T-hücre aktivasyonunda oldukça etkilidir. Bu nedenle levamisol interferon üretiminin ve makrofajlarda FcR aktivitesinin artırılmasında önemli rol oynar (Tizard, 1992; Anderson, 1992; Anderson ve diğ., 1995).

İnsanlarda melanom, brankogenik kanser, brucellosis, tekrarlayan üst solunum yolu enfeksiyonları, leprosi, tekrarlayan genital kanal herpes virus ve Staphylococcal enfeksiyonlarda olumlu sonuçlar vermektedir (Gökçe ve diğ., 1998). Süt sığırcılığı yapılan işletmelerde süt ineklerinde genç buzağuların yetiştirilmesinde levamisolün büyük yararları olduğu bildirilmiştir (Arda ve diğ., 1994). Gökçe ve diğ., (1998), Levamisolün koyun çiçeğinin sağaltılmasında kullanılmasının etkilerini inceledikleri bir çalışmalarında, hastalığın sağıtılması ve korunmasında levamisolün etkili olduğunu tespit etmişlerdir.

Çeşitli araştırmacılar parazitik enfeksiyonlarda levamisol uygulamasını tavsiye etmektedir. Trasczewski ve diğ. (1988), 1mg lt⁻¹ dozdaki levamisol banyosunda bir saat bekletilen Avrupa yılan balıklarında *Anguilla crassu* nematoduna karşı etkili sonuçlar almışlardır. Parazite karşı uygulanan levamisol balıklarda hipodermis, kas hücrelerinde stoplazmik parçalanma, barsak duvarının yaygın hasarı, telafisi mümkün olmayan vakuolizasyon sonucu parazitin ölümü görülmüştür.

Levamisolün tek bir dozu antifungal olarak da etkilidir. Prost ve Sopinska (1991), sazan fingerlinglerine bir saat boyunca 1mg ml⁻¹ dozdaki levamisol uygulamasının *Saprolegnia* enfeksiyonuna karşı olumlu etkilerini belirlemişlerdir. Levamisol uygulamaları sazan fingerlinglerinin büyümesini artırmakta ve doğal mortalite kayıplarını en aza indirmektedir (Anderson, 1992).

Antihelmintik, antiprotozoan ve antifungal olarak araştırılmış olan levamisolün balıklarda immunostimulant olarak kullanılması konusunda herhangi bir çelişki bulunmamaktadır (Anderson, 1992). Diğer bir çok immunostimulant maddelerde olduğu gibi sentetik bir immunostimulant olan levamisol (Sakai, 1999) ile balıkların immun sistemine etkileri üzerine birkaç çalışma yapılmıştır. *Oncorhynchus kisutch*'larda levamisol ve Freund's tam adjuvant karışımının enjeksiyonundan sonra *Aeromonas salmonicida* bakterisine karşı balıkta direncin arttığı gözlenmiştir (Olivier

ve diğ., 1985). Ayrıca levamisolün intraperitoneal enjeksiyonu ve oral yolla verildiği sazan balıklarında fagositoz ve myeloperoksidaz faaliyetinin arttığı, lökosit sayısında ve kan serumundaki lizozim seviyesinde de bir artmanın olduğu tespit edilmiştir (Siwicki, 1987; 1989).

Levamisolün balıklardaki etkisi doza, uygulama zamanına ve balığın durumuna bağlı olarak değişir. Anderson (1992), *Yersinia ruckeri* – O antijenlerine karşı spesifik ve non-spesifik savunma mekanizmalarının stimülasyonu için 5 mg kg⁻¹ levamisol enjeksiyonunun uygun olduğunu; yüksek dozun immunosupresif, düşük dozun ise düzensiz direniş gösterdiğini bildirmiştir. Baba ve diğ. (1993), 24 saat süreyle 10 mg lt⁻¹ levamisol banyosuna daldırılan sazanlarda *Aeromonas hydrophila* bakterisine karşı fagositik hücrelerin faaliyetinin yükseldiğini ifade etmişlerdir. Siwicki ve diğ. (1990), ise düşük ve yüksek levamisol dozunun *Yersinia ruckeri*'ye karşı dalakta antikör üretimine uyarıcı bir etkiye sahip olmadığını ispatlamışlardır. Yapılan çalışmalarda levamisolün optimal dozunun 3-5 mg kg⁻¹ canlı ağırlık olduğu görülmektedir.

Levamisolün immunostimulatör olarak uzun süreli kullanıldığı hastalarda agranülositozis görülmektedir. Bundan başka önemli bir yan etkisine rastlanılmamıştır (Erganiş ve Kaya, 1990).

3. METARYAL VE METOT

Araştırmada kullanılan ağırlıkları 99.35 – 215.95 g ve boyları 20.77 – 27.13 cm arasında olan toplam 60 adet Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yerel bir işletmeden temin edildi. Çalışma Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Balıklar her grupta eşit sayıda olmak üzere, elektrikli hava filtre ve motorlarıyla düzenli olarak havalandırılan fiberglas teknelere yerleştirildi (Foto 3.1). Balıklara levamisol enjekte edilmeden önce 1 haftalık bir adaptasyon süresi uygulandı. Balıklar çalışma boyunca ticari bir alabalık yemi (Pınar No: 4) ile günde iki kere alabildikleri kadar yemle beslendi. Çalışma sırasında su sıcaklığı ortalama 16 °C olarak tespit edildi.

Adaptasyon süresi sırasında balıklar 50 ppm'lik benzocaine solüsyonunda bayıltılıp (Ingebrigtsen ve diğ., 1993), tüm biyometrik ölçümleri yapıldı. Bu süre sonunda balıklar tekrar anestezi edilerek I. grup balıklara (kontrol) 0.2 ml PBS (Phosphat buffer saline, pH: 7.2); II. grup balıklara ise 5 mg kg⁻¹ levamisol intraperitoneal yolla pelvik yüzgeçlerin anteriöründe iki yüzgecin ortasından (Akhlaghi ve diğ., 1993) enjekte edilip deneysel gruplar oluşturuldu.

Levamisolün gökkuşluğu alabalıklarının immun sistemi üzerine etkileri 3, 7, 10 ve 14. gün sonunda anestezi uygulanarak alınan kan örnekleri ile tespit edilmeye çalışıldı. Balıklardan kan örnekleri kalpten heparinli bir şırınga yardımıyla alındı.



Foto 3.1. Denemede kullanılan tankın görünüşü

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin tamamı Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)'den temin edildi.

Çalışmada elde edilen verilerin değerlendirilmesi için Rutin istatistiksel metotlar ve Minitab istatistik programı kullanıldı. Gruplar arasında farklılığın olup olmadığı *t*-student testi, zamana bağlı değişim ise varyans analizi ile test edildi.

Levamisol'un gökkuşağı alabalığının immun sistemine etkilerini belirlemede kullanılan immunolojik ve serolojik testlerin uygulanış şekli aşağıda açıklanmıştır.

3.1. Balık Kanında Hematokrit ve Lökosit Düzeyleri

Kontrol ve deneme grubu balıklarına levamisol enjeksiyonundan sonra balıklardan alınan kan ile hematokrit ve lökosit değerleri mikrohematokrit metoda göre belirlendi. Buna göre; heparinli hematokrit kapıllar tüplerin 2/3'ü kan ile dolduruldu ve tüplerin bir ağzı bunzen-bek alevinde kapatılarak mikrohematokrit santrifüjde 12.500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hematokrit ve lökosit yüzdesi özel skalada okundu (Siwicki ve Anderson, 1993; Kakuta, 1998).

3.2. Adherens / NBT Testi (Glass-adherent NBT Pozitif Hücre Aktivasyonu)

Adherens testi Anderson ve diğ. (1992), ile Siwicki ve Anderson (1993)'nun bildirdikleri metoda göre yapıldı. Buna göre; iki lamel üzerine birer damla (50 µl) kan damlatıldı ve bir ıslatılmış kağıt havlu ile nemlendirilmiş petri kutusuna yerleştirildi. Nötrofil ve monositlerin cama yapışmaları için oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Lameller dikkatlice alınarak bir pipet yardımıyla PBS ile yıkandı ve bir kağıt havluyla kurulandı. Lamel, bir lam üzerine 50 µl damlatılmış % 0.2 NBT (Nitroblue tetrazolium) üzerine kapatıldı ve 20-30 dakika inkübe edilerek 400 büyütme mikroskopta sayıldı. Mavi boyalı hücreler ve yapışan hücreler sayılarak, levamisol enjekte edilmiş balıklar ile, PBS enjekte edilmiş kontrol balıklarından elde edilen sayılar karşılaştırıldı.

3.3. Hemositometre ile Hücre Sayımı (Lökosit Düzeyi)

Kandan lökosit hücre hesaplaması için balıktan alınan hücre konsantrasyonu, örnek sayısı ve zamana bağlı olarak, 1:20 oranında PBS ile seyreltildi. Minimum hücre süspansiyonu Hemositometre'nin kaplama camı altına damlatıldı ve 1 dakika için

dağılması beklendi. Her bir 4 büyük kare (16 küçük kareden oluşan) de toplam lenfosit sayısı belirlendi ve 50 ile çarpılarak 1 ml örnekteki sayı belirlendi. Bazı nötrofilleri görmek zor olduğundan Trypan mavisi kullanılarak ölü ve canlı hücreler birbirinden ayırt edildi (Jeney ve Anderson, 1993 b; Siwicki ve Anderson, 1993).

3.4. Nitroblue Tetrazolium (NBT) Aktivitesi-Spektrofotometrik Test (Nötrofil Oksidatif Radikal Üretimi)

NBT kullanılarak O₂ radikalleri spektrofotometre ile tespit edilebilir. Bunun için; mikrotitr tabaklara 0.1 ml kan konuldu ve eşit miktarda % 0.2 NBT çözümü ilave edildi. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. NBT-Kan süspansiyonundan 50 µl alındı ve 1.0 ml N, N-dimetyl formamide içeren cam tüpe ilave edildi. Cam tüp 3000 x g'de 5 dakika santrüfuj edildi. Üstteki tabaka alındı ve 1 ml'lik küvette 540 nm veya 620 nm'de spektrofotometrede okundu (Siwicki ve Studnicka, 1987; Siwicki ve Anderson, 1993; Siwicki ve diğ., 1994).

Burada kaybolan değer şöyle hesaplandı;

$$\text{Absorbans} \times 4 = \text{mg NBT formazan} / 1 \text{ ml Kan}$$

3.5. Balıkta Nötrofil ve Monositlerin Potansiyel Öldürme Aktiviteleri

Balıklarda nötrofil ve monositlerin potansiyel öldürme aktivitelerini belirlemede şu metod kullanıldı. Mikrotitr hücrelere 0.1 ml kan ve 0.1 ml EMEM-0.1 (Eagles minimal essential media, % 0.1 fetal calf sera'lı) konuldu. Hücrelerin plastik yüzeylere yapışması için mikrotitr tabaklar oda sıcaklığında 1-2 saat inkübe edildi. Üstte kalan kısım ve yapışmayan hücreler boşaltıldı ve 1×10^9 *Yersinia ruckeri* hücreleri içeren NBT (PBS de % 0.2) çözümü ile dolduruldu. Mikrotitr tabaklar, yapışan hücreler ile bakteri kontaminasyonu için 5 dakika hafifçe sallandı. Oda sıcaklığında 30-60 dakika inkübe edildi Üstteki kısmı ve yapışmayan bakteriler uzaklaştırıldı ve % 100 metanol ilave edilerek, 2-5 dakika inkübe edildi. Plateler % 70'lik metanol'e 3-4 defa daldırıldı, hava ile kurutuldu ve spektrofotometre de 620 nm'de okundu. Spektrofotometrede okurken; formazon 120 µl 2M KOH ilavesiyle çözüldü ve üzerine 140 µl DMSO (Dimethyl sulfozoide) ilave edildi ve 2 dakika karıştırıldı (Siwicki ve Anderson, 1993; Siwicki ve diğ., 1994).

3.6. Balıkta Fagositik Aktivite

Fagositik aktivite; fagositik hücreler, kan nötrofilleri, monositler ve doku makrofajları dahil partiküllerin fonksiyonel yükseltgenmesiyle belirlendi. Buna göre şu işlem yapıldı. Mikrotitr tabaklara 0.1 ml hücre süspansiyonu konuldu ve PBS'de bekletilmiş 0.1 ml *Staphylococcus ssp.* (1×10^7) ilave edildi. Bakterilerin lökositlerle kontaminasyonu için bir pipetle karıştırıldı ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bir lam üzerine bu süspansiyondan 5 µl konuldu ve kan örneklerindeki gibi slayt yapıldı. 5 dakika etilalkol (% 95) ile fikse edildi. Giemsa (% 7) ile 10 dakika boyandı ve 100 hücre okundu. Baktersiz fagositik hücre sayısı, aktif hücre yüzdesi için bakterili olanlarla karşılaştırıldı (Siwicki, 1989, Siwicki ve diğ., 1990; Siwicki ve Anderson, 1993).

3.7. Balık Hücrelerinin Myeloperoksidaz (MPO) Üretimi

Myeloperoksidaz aktivitesinin ölçülmesinde şu metot kullanıldı. 5 µl hücre eriyiği lam üzerine damlatıldı ve kan frotisi yapar gibi cam üzerine yayıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika için kurumaya bırakılır. Daha sonra Sigma Kit 390-A (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO) kullanılarak şu işlemler yapıldı. Slayt etanol/formaldehyde solusyonunda 30 saniye bekletildi ve musluk suyunda 2 dakika yıkanarak kurutuldu. 1:10 Trizmal 6.3 Buffer 50 ml şeklinde sulandırılarak su banyosunda 37 °C de bekletildi. Kullanmadan önce, 1 şişe peroxidase indikatör ayıracı ve 0.2 ml % 3 Hidrojen Peroksit, ön ısıtılmış Trizmal Buffer'a ilave edildi. Slayt 37 °C su banyosunda ve karanlıkta peroxidase indikatör ayırac solusyonunda 30 dakika için fikse edildi. Slayt az akan musluk suyunda 15-30 dakika yıkandı. Pozitif hücreler (koyu boyanan hücreler) sayıldı (Siwicki ve Anderson, 1993; Siwicki ve diğ., 1994; Sigma, 2000).

3.8. Balık Plazmasında Toplam İmmunoglobulin

Plazmada toplam immunoglobulin analizi, aminoasitlerde azot miktarını belirleyen Biuret metoduna dayandırılarak yapıldı. Ancak metodu uygularken, ilk olarak immunoglobulinler Glikopolietilen glikol ile çöktürülerek plazmadan ayrıldı ve geriye kalan üst kısım okundu. Bu değerden, toplam immunoglobulini bulmak için toplam protein çıkarıldı. Toplam protein düzeyini bulmak için Kwapinski (1965)'nin bildirdiği

metod modifiye edilerek kullanıldı ve plazmadaki immunoglobulin miktarını bulmak için şu şekilde devam ettirildi. Kan 5 dakika 1000 x g'de santrifüj edildi. Mikrotiter tabaklara 0.1 ml plazma konuldu. Üzerine deiyonize suda bekletilen % 12'lik polietilene gilikol'dan 0.1 ml ilave edildi ve oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. 5000 x g'de 10 dakika santrifüjü müteakip üstte kalan tabaka alındı ve mikrometod için inkübasyon ile 2 kere seyreltilmiş 10 Ug protein solüsyonu kullanıldı. Protein konsantrasyonu belirlendi. Süpernatanttan okunan protein polyethylene glycol ile absorbe edilen protein miktarını vermektedir (Siwicki ve Anderson, 1993; Siwicki ve diğ., 1994).

3.9. Balık Plazmasında Lizozim Aktivitesi

Lizozim kanda bakterileri parçalayan önemli bir enzimdir. Balık kanında lizozim aktivitesini tespit etmek için şu yöntem uygulandı. Kan 5 dakika 1000 x g'de santrifüj edildi. Test tüpüne 0.1 ml plazma kondu ve PBS ile 1:1 oranında seyreltildi. 450 nm'de konsantrasyon belirlendi ve 0.5 ml *Micrococcus lysoidecticus* süspansiyonu ilave edildi. Bakteri lizis kinetiği, bakteri karıştırıldıktan hemen sonra 1, 2, 3 ve 30 dakika sonra okunarak takip edildi (Studnicka ve diğ., 1986; Grinde, 1989; Siwicki ve Anderson, 1993; Siwicki ve diğ., 1994).

3.10. Balık Plazmasında Seruloplazmin Aktivitesi

Seruloplazmin kanda bakır taşınmasından sorumlu bir α -globulin maddesidir. Plazmada bulunuşu bakır konsantrasyonuna bağlıdır. Bu durum spektrofotometre ile analizini kolaylaştırmaktadır. Seruloplazmin aktivitesinin tespitinde şu metot uygulanmıştır. Kan 5 dakika 1000 x g'de santrifüj edildi. Su banyosunda 24 °C'de tutulan 2 test tüpüne 0.5 ml buffer substrate (Asetat tamponda taze hazırlanmış % 0.1 P-Phenylenediamine) solüsyonu kondu, üzerine 0.05 ml plazma ilave edildi ve 37 °C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra test tüplerine 2.5 ml sodyum azid (% 0.02) ilave edildi. Kontrol tüpüne 0.05 ml serum ilave edildi ve her iki tüpün içeriği iyice karıştırıldı. Dalga boyu 540 nm'de test absorbansı kontrole karşı belirlendi (Siwicki ve Studnicka, 1986; Siwicki ve Anderson, 1993). Seruloplazmin aktivitesi şu formülle hesaplandı: $\text{Absorbans} \times 349 = \text{Uluslararası Ünite (IU)} / 1.910 \text{ \% mg Seruloplazmin aktivitesi}$.

4. SONUÇLAR

4.1. Balık Kanında Hematokrit ve Lökosit Düzeyleri

Deneyisel grup ile kontrol grubu balıklarının hematokrit ve lökosit değerleri Tablo 4.1’de verilmiştir. İntraperitoneal olarak levamisol uygulanan balıklar ile PBS enjekte edilmiş (Foto 4.1) kontrol grubu balıkların kalplerinden alınan kan (Foto 4.2) ile yapılan hematokrit ve lökosit testleri sonunda gruplar arasında bir farklılığın olmadığı tespit edildi ($p>0.05$). Ancak yine de levamisol ile immunizasyon sağlanmış balıkların hematokrit ve lökosit değerlerinin kontrol grubundan daha fazla olduğu gözlemlendi. Levamisol uygulanan balıklarda en yüksek hematokrit düzeyine uygulamanın 14. gününde; lökosit düzeyine ise 3. gününde rastlanıldı. Buna göre hematokrit değerleri $\% 33.1 \pm 1.37$ (5 mg kg^{-1} levamisol) ve $\% 32.22 \pm 1.30$ (kontrol); Lökosit değerleri ise $\% 2.50 \pm 1.78$ ve $\% 2.30 \pm 1.33$ olarak bulundu. Hematokrit ve lökosit değerleri deneme süresi boyunca fazla bir dalgalanma göstermedi.

Tablo 4.1. Levamisol enjekte edilen gökkuşağı alabalığının Hematokrit ve Lökosit düzeyleri

Enjeksiyondan Sonraki günler	Gruplar	Hematokrit (%)	Lökosit (%)
3	Kontrol	32.22 ± 1.30	2.30 ± 1.33
	Deney	32.80 ± 1.83	2.50 ± 1.78
7	Kontrol	30.33 ± 1.03	2.00 ± 0.89
	Deney	30.83 ± 3.86	2.33 ± 1.21
10	Kontrol	31.00 ± 1.24	1.90 ± 0.73
	Deney	32.10 ± 2.02	1.90 ± 0.73
14	Kontrol	30.50 ± 1.50	2.00 ± 0.81
	Deney	33.10 ± 1.37	2.10 ± 0.87



Foto 4.1. İntraperitoneal enjeksiyonun yapıldığı bölge



Foto 4.2. Balıkların kalplerinden kan alma işlemi

4.2. Adherens/NBT Testi (Glass-adherent, NBT Pozitif Hücre Aktivasyonu)

Levamisol ile immunize gökkuşağı alabalıklarının nötrofillerinde immunize olmayan kontrol balıklarına oranla nötrofillerinde glass-adherent hücrelerin daha yoğun olduğu görüldü (Tablo 4.2). Hücreler genellikle; parlak olmayan, opak şekilde boyanan ve stoplazma etrafının mavi ışık halkası şeklinde sınılanmasıyla karakterize idi. Bu hücreler polimorfonükleer lökositlere benzerlik göstermekteydi.

5 mg kg⁻¹ levamisol ile enjekte grupta 3. günde balıklarda glass-adherent, NBT pozitif hücre seviyesinde yükselme görüldü ve uygulamanın 10. gününde en üst seviyeye çıktı. Bu günden sonra adherent hücrelerinde azda olsa bir azalmanın olduğu görüldü. Deneyel grup balıkların dağılımında her sahada en fazla 179 adet hücre sayıldı. Halbuki PBS enjekte edilen kontrol balıklarında bu sayı 47'nin altında tespit edilmiştir. Deneme süresi sonunda, levamisol uygulanan balıkların bu aktivitelerinin kontrol grubu balıklarından daha fazla olduğu görülmüş ve bu farklılığın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edildi ($p < 0.001$). Ayrıca deneme grubunun bu aktivasyonunun uygulama süresince zamana bağlı olarak önemli değişiklikler gösterdiği görüldü ($F = 12.34$, $p < 0.001$).

4.3. Hemositometre ile Hücre Sayımı (Lökosit Düzeyi)

Levamisol verilen gökkuşağı alabalıkları ile kontrol grubu balıkları arasında lökosit seviyesinin zamana bağlı aktivasyonu ve gruplar arasındaki ilişki düzeyi Tablo 4.2'de görülmektedir. Buna göre deney grubu balıkların lökosit seviyesi kontrol grubundan farklı olduğu tespit edildi ($p < 0.001$). Levamisol uygulanan grupta lökosit seviyesi 10. günde artmaya başladı ve deneme sonuna kadar devam etti. Uygulamanın 14. gününde ise en üst seviyeye ($85.96 \pm 5.07 \times 10^3$) ulaştı. Kontrol grubu balıklarının lökosit seviyesinde ise 37.30 ± 1.28 ile $37.86 \pm 1.09 \times 10^3$ arasında değişme görüldü. Ayrıca deney grubu balıklarda lökosit sayısı bakımından zamana bağlı olarak anlamlı farklılık tespit edildi ($F = 47.65$; $p < 0.001$).

4.4. Nitroblue Tetrazolium (NBT) Aktivitesi (Nötrofil Oksidatif Radikal Üretimi)

Levamisol verilen grupta, nötrofillerin oksidatif radikal üretiminde kontrol grubuna oranla gözle görülmüş önemli derecede bir artışın olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). Tablo 4.2'de levamisolün nötrofillerin oksidatif radikal üretimine etkisi görülmektedir.

Buna göre levamisol uygulanan balıklarda nötrofil oksidatif radikal üretimini belirleyen NBT test sonuçları ilk günden itibaren artmaya başladı ve maksimum seviyeye 14. günde ulaştı. Bu zamanda NBT aktivitesi 2.24 mg ml^{-1} olarak ölçüldüğü halde kontrol grubu balıklarında bu değerin 1.30 mg ml^{-1} olduğu tespit edildi. Deneme süresi sonunda dahi NBT aktivitesi bakımından deney grubunun kontrol grubundan daha aktif olduğu görüldü.

Tablo 4.2. Levamisolün gökkuşağı alabalıklarının glass-adherent, lökosit ve nötrofil oksidatif radikal üretimine (NBT) etkisi

Enjeksiyondan Sonraki günler	Gruplar	Glass-adherent	Lökosit Düzeyi $\times 10^3$	NBT Aktivitesi (mg ml^{-1})
3	Kontrol	29.20 ± 2.68	37.63 ± 3.25	1.30 ± 0.08
	Deney	$82.60 \pm 10.89^{***}$	40.8 ± 4.69	$1.65 \pm 0.10^{***}$
7	Kontrol	27.80 ± 3.49	37.30 ± 1.28	1.30 ± 0.12
	Deney	$121.00 \pm 24.76^{***}$	46.35 ± 8.31	$1.87 \pm 0.10^{***}$
10	Kontrol	28.00 ± 8.42	37.77 ± 1.17	1.30 ± 0.15
	Deney	$154.80 \pm 16.09^{***}$	$46.90 \pm 5.34^*$	$2.18 \pm 0.77^{***}$
14	Kontrol	29.40 ± 6.69	37.86 ± 1.09	1.31 ± 0.10
	Deney	$153.2 \pm 29.65^{***}$	$85.96 \pm 5.07^{***}$	$2.24 \pm 0.73^{***}$

* $p < 0.05$ *** $p < 0.001$

4.5. Balıkta Nötrofil ve Monositlerin Potansiyel Öldürme Aktivitesi

Levamisol enjekte edilmiş gökkuşağı alabalıklarının polimorfonükleer lökositlerinde nötrofillerin potansiyel öldürme aktiviteleri Tablo 4.3’de verilmiştir. Levamisol uygulanan gruptaki balıkların nötrofillerinin öldürme aktivitesinde kontrol grubuna oranla önemli bir artışın olduğu görüldü ($p < 0.05$). Deney grubu balıklarda 14. günde bu aktivitenin en üst seviyeye ulaştığı (0.63 ± 0.04) ve deneme süresi sonuna kadar bu artışın sürdüğü gözlemlendi. Deneysel grubu ile kontrol grubu balıklarında bakterisidal etki bakımından elde edilen farklılık anlamlı bulundu ($p < 0.001$).

4.6. Balıkta Fagositik Aktivite

Levamisol uygulanmış gökkuşuğu alabalığının periferik kan lökositlerinin fagositik aktivitesi Tablo 4.3’de verilmiştir. Buna göre deney grubu ile kontrol grubu balıklarında fagositik aktivite bakımından elde edilen fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.001$). Deney grubu balıklarında fagositik aktivitenin 3. günden sonra önemli bir şekilde arttığı ancak uygulama süresi olarak kabul edilen 14. günde azda olsa bir azalmanın olduğu görüldü. Buna rağmen bu süre sonunda dahi deney grubunun bu aktivasyonunun kontrol grubundan daha fazla olduğu gözlemlendi ($p < 0.001$). Deneme süresi boyunca deney grubu balıklarının kan preparatlarında sayılan her yüz hücredeki bakteri yutan hücre sayısı en fazla 10. günde 83 adet olarak tespit edildi. Kontrol grubunda ise bu sayının en fazla 39 olduğu görüldü. Levamisol verilen balıklarda bu aktivasyonun zamana bağlı olarak grup içerisinde de anlamlı olarak farklılık gösterdiği gözlemlendi ($F=21.88$; $p < 0.001$).

Tablo 4.3. Gökkuşuğu alabalığında Levamisol enjeksiyonunun polimorfonükleer nötrofil granülositlerin potansiyel öldürme aktivitesine ve periferik kan lökositlerinin fagositik aktivitesine etkisi

Enjeksiyondan Sonraki günler	Gruplar	Potansiyel öldürme aktivitesi	Fagositik aktivite
3	Kontrol	0.40 ± 0.03	33.44 ± 3.20
	Deney	$0.59 \pm 0.08^*$	$59.20 \pm 4.20^{***}$
7	Kontrol	0.42 ± 0.05	35.00 ± 3.00
	Deney	$0.61 \pm 0.07^*$	$69.20 \pm 4.49^{***}$
10	Kontrol	0.42 ± 0.06	33.60 ± 4.27
	Deney	$0.60 \pm 0.07^*$	$78.80 \pm 3.49^{***}$
14	Kontrol	0.41 ± 0.03	35.20 ± 2.58
	Deney	$0.63 \pm 0.04^{***}$	$71.20 \pm 3.36^{***}$

* $p < 0.05$ *** $p < 0.001$

4.7.Balık Hücrelerinin Myeloperoksidaz (MPO) Üretimi

Levamisol uygulanan balıklar ile kontrol grubu balıkları arasında Myeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin zamana bağlı değişimi ve gruplar arasındaki ilişkisi Tablo 4.4’de ifade edilmiştir. 5 mg kg⁻¹ levamisol verilen balıklarda MPO aktivitesinde 7. günden sonra önemli bir artışın olduğu görüldü. Buna göre, balıkların bu zamanda MPO aktivitesi ortalama 120.6 gibi bir değere ulaştı. Kontrol grubu balıklarında ise bu değer 90.2 olarak tespit edildi. Deney balıklarında, her sahada en fazla uygulamanın 14. gününde 147 hücre sayılmışken kontrol grubunda bu değer 97 olarak tespit edildi. Deneme süresince uygulama grubundaki MPO aktivitesi kontrol grubundan daha fazla çıktığından gruplar arasında anlamlı bir farklılığın olduğu görüldü ($p<0.05$). Levamisol uygulanan balıkların MPO aktivitesinin uygulama sonuna kadar bir artış içerisinde olduğu görüldü. Levamisol uygulanan balıklardaki MPO aktivitesi deneme süresi içinde anlamlı olarak farklı bulundu ($F= 3.29$, $p<0.05$).

4.8.Balık Plazmasında Toplam İmmunoglobulin

Levamisolün gökkuşağı alabalığının kan plazmasındaki toplam immunoglobulin düzeyine etkisi Tablo 4.4’de verilmiştir. Plazmada en yüksek immunoglobulin düzeyine (22.04 ± 1.78 mg ml⁻¹) levamisol enjekte edilen balıkların oluşturduğu grupta rastlandı. 5 mg kg⁻¹ levamisol uygulanan balıkların plazmasındaki toplam immunoglobulin düzeyi çalışmanın 14. gününde en yüksek düzeye ulaştı ve bu gruptaki balıkların Ig düzeyi çalışmanın 10. gününden sonra kontrol grubundan daha yüksek olarak ölçüldü. Buna rağmen her iki grup arasında toplam Ig düzeyi bakımından elde edilen farklılığın istatistiksel olarak önemli olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$).

Tablo 4.4. Gökkuşığı alabalığında levamisolün Myeloperoksidaz (MPO) ve toplam immunoglobulin (Ig) miktarına etkisi

Enjeksiyondan Sonraki günler	Gruplar	MPO (Toplam)	Toplam İmmunoglobulin (mg ml ⁻¹)
3	Kontrol	89.80 ± 3.03	20.52 ± 1.47
	Deney	102.00 ± 5.78**	21.10 ± 2.18
7	Kontrol	90.20 ± 5.06	21.80 ± 1.38
	Deney	120.60 ± 13.90**	21.22 ± 2.54
10	Kontrol	89.60 ± 3.43	21.06 ± 2.19
	Deney	122.20 ± 15.61**	21.10 ± 2.77
14	Kontrol	88.20 ± 3.96	21.14 ± 1.45
	Deney	132.40 ± 22.44**	22.04 ± 1.78

** $p < 0.01$

4.9. Balık Plazmasında Lizozim Aktivitesi

Gökkuşığı alabalığının plazmasında lizozim düzeyine levamisolün etkisi Tablo 4.5’de gösterilmiştir. Tablo incelendiğinde plazmada en yüksek lizozim aktivitesine sahip grubun levamisol uygulanmış deneysel grubun olduğu görülmektedir. Uygulamanın ilk gününden itibaren lizozim aktivitesinde bir artışın olduğu görülmüş, ancak bu artışın levamisol uygulanan balıklarda uygulamanın 14. gününden sonra bir azalmanın olduğu görüldü. Buna rağmen levamisol uygulanan balıkların plazmasında lizozim aktivitesinin zamana bağlı göstermiş olduğu reaksiyon değişiminin istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edildi ($F = 74.52$, $p < 0.001$).

4.10. Balık Plazmasında Seruloplazmin Aktivitesi

Balık kanında seruloplazminin en yüksek düzeyine (21.05 ± 0.89 mg.100 ml⁻¹) deneysel grubu balıklarında rastlanıldı (Tablo 4.5). Levamisol verilen balıklarda seruloplazmin aktivitesinin enjeksiyondan 3 gün sona artmaya başladığı ve 7. günde maksimum düzeye ulaştığı tespit edildi. Bu grup ile kontrol grubu balıkları arasında seruloplazmin aktivitesi bakımından elde edilen farklılık istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.001$).

Tablo 4.5. Levamisolün gökkuşığı alabalığının kan plazmasındaki lizozim ve seruloplazmin aktivitesine etkisi

Enjeksiyondan Sonraki günler	Gruplar	Lizozim Aktivitesi ($\mu\text{l mg}^{-1}$)	Seruloplazmin Aktivitesi (% mg)
3	Kontrol	0.90 ± 0.05	15.05 ± 0.80
	Deney	$1.37 \pm 0.03^{***}$	$19.80 \pm 1.75^{**}$
7	Kontrol	0.92 ± 0.03	15.16 ± 1.03
	Deney	$1.50 \pm 0.12^{***}$	$21.05 \pm 0.89^{***}$
10	Kontrol	0.92 ± 0.04	15.48 ± 1.14
	Deney	$1.12 \pm 0.06^{***}$	$20.39 \pm 1.34^{***}$
14	Kontrol	$0.93 \pm 0.03^{**}$	15.16 ± 1.52
	Deney	0.83 ± 0.04	$20.38 \pm 1.46^{***}$

**** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$**

5. TARTIŞMA

5.1. Balık Kanında Hematokrit ve Lökosit Düzeyleri

Bu çalışmada; levamisol enjekte edilerek immun sistemi güçlendirilmiş balıklar ile kontrol grubu balıkların hematokrit değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren Tablo 4.1 incelendiğinde, levamisolün hematokrit düzeyi bakımından immunostimulatik etkisinin deneysel ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmektedir. Ancak yine de 5 mg kg^{-1} levamisol verilen balıklar ile kontrol grubu balıkları arasında hematokrit düzeyi bakımından azda olsa bir farklılığın olduğu bulunmuştur. Siwicki ve Anderson (1993), balık sağlığını kontrol etmede kullanılabilecek ve yüksek stres altında oldukça değişkenlik gösterebilecek hematokrit değer üzerine immunostimulantların çok az etkili olduğunu bildirmişlerdir. Siwicki ve diğ. (1994), farklı immunostimulant maddeleri oral yolla verdikleri gökkuşağı alabalıklarında hematokrit düzeylerindeki artışın önemli olmadığını rapor etmişlerdir. Kakuta (1998), deneysel olarak oluşturduğu çevresel stres altındaki sazan (*Cyprinus carpio*)'lara oral yolla verdiği laktoferrin uygulamasından sonra gruplar arasında hematokrit düzeyleri bakımından bir farklılığın olduğunu ancak bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını tespit etmiştir. Findlay ve Munday (2000), ameboik solungaç hastalığına karşı 2.5 mgL^{-1} dozda levamisol uyguladıkları Atlantik salmonların hematokrit düzeyinin kontrol grubu balıklarıyla hemen hemen aynı olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmada ise bulunan veriler değerlendirildiğinde; levamisol uygulanan grubun hematokrit değeri kontrol grubu balıklardan daha fazla çıkmışsa da istatistiki olarak bir anlam ifade etmediğinden diğer çalışmalarla paralellik arz ettiği görülmektedir.

Balık kanında lökosit yüzde oranı (beyaz kan hücreleri) hematokrit değeri ile birlikte balığın sağlığı hakkında ipuçları vermekte ve abnormaliteleri açıklamaya yardım etmektedir. Normal koşullarda gökkuşağı alabalıklarında lökosit düzeyi % 2 civarındadır. Lökosit düzeyini pek çok faktör etkilemekle beraber bir çok immunostimulant madde bu düzeyi artırmaktadır (Siwicki ve Anderson, 1993). Findlay ve Munday (2000), levamisolün, Atlantik salmonların lökosit düzeyine etkisinin kontrol grubu balıklarıyla aynı olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da ortalama lökosit düzeyi deney ve kontrol gruplarında birbirine yakın çıkmıştır.

5.2. Adherens/NBT Testi (Glass-adherent, NBT Pozitif Hücre Aktivasyonu)

Periferal kan nötrofillerinin glass-adherent, NBT pozitif hücre aktivasyonu önemli bir non-spesifik savunma mekanizmasıdır. Bu aktivasyonun ölçülmesi balık sağlığı hakkında ipuçları vermektedir. Enjeksiyon ile immunizasyonda; sirkülasyon kan nötrofillerinde, oksidatif radikallerin ve glass-adherent aktivasyonu artırılabilir. Bu hücreler sorunlu dokularda kapillardan göçü kolaylaştıran birbirine yapışan proteinlerin üretimi ile doku hücresinin etrafını kaplayan yapışkan hücrelerdir (Anderson ve diğ., 1992).

Jeney ve Anderson (1993 a), levamisol, bir polipeptid olan ISK ve bir amonyum bileşiği QAC ile *in vitro* olarak yapmış oldukları bir çalışmada; glass-adherent hücre aktivasyonu bakımından uygulama dozlarının (1.0, 10, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) tamamında levamisolün diğer immunostimulantlara oranla daha fazla etki gösterdiğini ispatlamışlardır. Siwicki ve diğ. (1989), levamisolün tetrasiklin ve oksolinik asit antibiyotiklerine karşı etkilerini incelemiş ve adherent hücre atktivasyonunun antibiyotik uygulamalarından daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Yine Siwicki (1989), levamisolün sazan balıklarının non-spesifik savunma mekanizmalarına etkilerini araştırdığı bir çalışmada; levamisol uygulanan balıklarda 12 hafta boyunca glass-adherent hücre aktivasyonunun yüksek çıktığını bildirmiştir. Yoshida ve diğ. (1995), *Aeromonas hydrophila* bakterisi ile aktivitesi zayıflatılmış Afrika yayın (*Clarias gariepinus*) balıklarının oligosakkarit ve glukan ile 12 günlük tedavisinde, glass-adherent NBT pozitif hücre aktivasyonunda büyük bir artış görülmesine rağmen tedavide esas alınan 30 günlük oligosakkarit uygulanan balıklar ile kontrol balıkları arasında önemli bir farklılığın olmadığını tespit etmişlerdir. Ancak 30 günlük glukan uygulamasında adherent hücre aktivasyonu kontrol grubundan daha yüksek çıkmıştır. Bu bakımdan çalışmada elde edilen veriler diğer çalışmaların bulgularıyla paralellik arz etmektedir. Siwicki (1987), farklı dozlardaki levamisolü sazanlara enjekte ettiğinde; 5 ve 10 mg kg^{-1} dozun NBT pozitif hücre aktivasyonundaki 2. haftadan itibaren bir artışa neden olduğu, ancak daha sonra azda olsa bir azalma ile 12 hafta boyunca devam ettiğini tespit etmiştir. 15 ve 20 mg kg^{-1} dozlarında ise 10 hafta boyunca immunosupresif etki gösterdiğini ve 12. haftada ise az da olsa bir artmanın olduğu görülmüştür. Bu çalışmada; 5 mg kg^{-1} uygulama dozunda 10 gün sonra balıklarda glass-adherent, NBT pozitif hücre aktivasyonunun en üst seviyeye ulaştığı görülmüştür. Bu

çalışmada glass-adherent NBT pozitif hücrelerinin zamana bağlı olarak gösterdikleri aktivasyon etkisi diğer araştırmacının bildirdiği sonuçlarla uyum sağlamaktadır.

Siwicki ve diğ. (1990), 5, 25 ve 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ levamisol konsantrasyonlarıyla yapmış oldukları *in vitro* testlerde glass-adherent aktivasyonunda değişik genişlikte etkilerin olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak yinede 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ levamisolün *Y. ruckeri* O-antijeni ile birlikte enjekte edildiği gökkuşağı alabalığının dalak hücrelerinin adherent aktivasyonunun 25 ve 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ levamisol uygulanan gruplardan daha etkili olduğu tespit edilmiştir. 5 mg kg^{-1} lık dozun aktivasyonda etkili olduğunun görülmesi bu çalışmanın diğer çalışmalarla uyum içerisinde olduğunu göstermektedir.

5.3.Hemositometre ile Hücre Sayımı (Lökosit Düzeyi)

Levamisol enjekte edilen balıkların lökosit seviyesi kontrol grubundan, uygulamanın ilk zamanlarında dahi farklı çıkmışsa da denemenin 14. gününde lökosit düzeyinin oldukça fazla arttığı tespit edilmiştir. Siwicki (1987), 5, 10, 15 ve 20 mg kg^{-1} levamisol dozunu uyguladığı sazan balıklarında; 5 mg kg^{-1} levamisolün verildiği grupta lökosit düzeyindeki artışın uygulamanın hemen ardından artış gösterdiğini ve bu artışı 12 hafta boyunca koruduğunu tespit etmiştir. Bu aktivite bakımından diğer gruplarda bir dalgalanmanın olduğunu rapor etmiştir. Siwicki (1989), levamisolü sazanlara oral yolla vermiş ve balıkların lökosit seviyesinin 3 aylık deneme süresi boyunca kontrol grubundan farklı olduğunu gözlemlemiştir. Jeney ve Anderson (1993 b), QAC, ISK ve levamisol ile *A. salmonicida* O-antijenlerinin kombinasyonlarıyla bağışıklık oluşturulmuş gökkuşağı alabalıklarının lökosit düzeylerini incelemiş ve levamisolün diğer iki immunostimulanta oranla daha az aktivasyon gösterdiğini ancak kontrol grubu balıklarıyla karşılaştırıldığında lökosit düzeyini artırdığı tespit edilmiştir. Glucan ve *Y. ruckeri* O-antijen kombinasyonunun enjeksiyon ve banyo şeklinde uygulandığı bir başka çalışmada ise, her iki uygulama şeklinde de kontrol grubu balıklarına oranla lökosit düzeyinde önemli artışların olduğu rapor edilmiştir (Jeney ve Anderson, 1993 c). Bu çalışmada da, elde edilen veriler araştırmacıların bildirmiş olduğu bulgular ile uygunluk göstermektedir.

Levamisol ile yapılan bazı çalışmalarda, balıkların lökosit düzeylerinde bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Anderson ve Jeney (1992), *A. salmonicida* O-antijen bakterinine karşı QAC, ISK ve levamisolün etkisini araştırdıkları bir çalışmada,

balıkların lökosit düzeyini levamisol dışındaki immunostimulantların arttırdığını gözlemledikleri halde levamisol uygulanan balıklardaki lökosit düzeyinin kontrol grubu balıklardan daha az çıktığını bildirmişlerdir. Siwicki ve diğ. (1994), farklı immunostimulantları içeren yemlerle beslenen gökkuşağı alabalıklarının lökosit düzeyini incelemiş ve bir immunostimulant (FinnStim) hariç diğer gruplardaki değerlerin kontrol grubundan daha düşük olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmada ise bu bilgilerin tam tersi bir durum söz konusu olduğundan dolayı elde edilen sonuçlar bu araştırmacıların bulgularıyla tezat oluşturmaktadır.

5.4. Nitroblue Tetrazolium (NBT) Aktivitesi (Nötrofil Oksidatif Radikal Üretimi)

Balıkta fagositoz; parazit, virüs ve bakteri gibi patojenik faktörlere karşı non-spesifik immun direncin en önemli mekanizmasıdır. Çeşitli safhaların oluşum süreçleri, kemotaksis, opsonizasyon, absorpsiyon, intraselüler yıkım ve sindirimde makrofajlar ve polimorfonükleer lökositler çok önemlidir. NBT (Nötrofillerin oksidatif radikal üretiminin tespiti) nötrofillerin fagositik aktivitelerinin balirlenmesinde kullanılan bir testtir (Siwicki ve Studnicka, 1987).

Siwicki ve diğ. (1990), levamisolün tetrasiklin ve oksolonik asit antibiyotiklerine karşı etkilerini incelemiş ve levamisol uygulanan grupta nötrofillerin oksidatif radikal üretiminin antibiyotik uygulanan grupta daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Yine Siwicki ve diğ. (1994), farklı immunostimulantlarla beslenen gökkuşağı alabalıklarının kanında nötrofillerin oksidatif radikal üretiminin tutarlı olarak arttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada; levamisol uygulanan balıklarda nötrofillerin NBT yanıtında önemli artışların görülmesi çalışmanın, diğer araştırmacıların bildirdiği bulgularla uyum sağlamasına neden olmuştur.

Siwicki ve diğ. (1990), *Y. ruckeri* O-antijeni ve levamisolün 5, 25 ve 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyonlarıyla yapmış oldukları bir *in vitro* çalışmada; 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ levamisol konsantrasyonunun uygulandığı balıkların NBT yanıtındaki artışın diğer gruplardan daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ levamisolün verildiği balıklarda bu aktivitede bir artış görülmesine rağmen 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 'lık dozun uygulandığı balıklarda da NBT yanıtında bir azalma tespit edilmiştir. Bu uygulama dozundaki aktivitenin kontrol grubundan daha az çıkmasından dolayı 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ miktarındaki dozun balıklarda immunosupresif etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. 5 mg kg^{-1} levamisol enjekte edilen

bu çalışmada ise; NBT aktivasyonunun arttığı görülmüşse de bu aktivasyonun değişkenlik göstermesi; çalışmanın diğer araştırmacıların bulgularıyla uyum sağladığının bir göstergesidir.

5.5. Balıkta Nötrofil ve Monositlerin Potansiyel Öldürme Aktiviteleri

Balıklarda patojen olan bir çok mikroorganizmaya karşı dalak, böbrek veya periferik kan nötrofil veya monositlerinin potansiyel öldürme aktiviteleri; canlının patojene karşı göstermiş olduğu önemli bir non-spesifik savunma mekanizmasıdır.

Çeşitli balık türlerinde farklı immunostimulantlar ve bu çalışmada kullanılan teknikten farklı teknikler kullanılarak balığın mikroorganizmaya karşı göstermiş olduğu reaksiyonlar incelenmiş ve bu etkenlere karşı immunostimulantların etkili oldukları kanıtlanmıştır (Robertson ve diğ., 1990; Matsuyama ve diğ., 1992; Sakai ve diğ., 1992). Siwicki ve diğ. (1994), bu çalışmada kullanılan tekniğe benzer bir teknik kullanarak yapmış oldukları bir çalışmada, oral yolla verilen immunostimulantların (Macrogard, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisia*, Evestel, Chitosan ve Finn Stim) tamamında nötrofil ve monositlerin potansiyel öldürme aktivitelerini kontrol grubundan daha yüksek olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada da, levamisol uygulanan balıkların nötrofillerinin bakteri öldürme aktivitesi kontrol grubundan daha fazla çıkmıştır. Bu nedenle çalışmada elde edilen bulgular diğer araştırmacıların sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

5.6. Balıkta Fagositik Aktivite

Fagositik sistem; bir mikroorganizmanın veya yabancı partikülün yakalanarak tahrip edilmesi veya vücuttan uzaklaştırılmasında en önemli ve erken savunma mekanizmalarından biridir. Granülositler ve mononükleer fagositler veya makrofajlar balığın hücrel non-spesifik savunma mekanizmalarında önemli bir role sahiptirler (Dalmo ve diğ., 1997).

Farklı immunostimulantların değişik yollarla verildiği bir çok balık türünde, bu maddelerin organizmanın fagositik aktivitesini artırdığı ispatlanmıştır. Siwicki (1989), farklı sıcaklıklarda (12 °C ve 22 °C) tutulan sazan balıklarına levamisolü oral yolla vererek immunostimulatik etkilerini araştırdığı bir çalışmada, 22 °C'deki balıkların

fagositik aktivitelerinin 12 hafta kadar devam ettiğini bildirmiştir. Sakai ve diğ. (1992), gökkuşağı alabalıklarına kitin enjekte ederek *Vibrio anguillarum* enfeksiyonuna karşı etkilerini incelemişler ve kitin uygulanan balıkların böbrek fagositik hücrelerinin lateks partiküllerine karşı fagositik aktivitelerinin 3 ve 7. günden sonra en üst düzeye ulaştığını bildirmişlerdir. Anderson ve Jeney (1992) ile Jeney ve Anderson (1993 b), Levamisol, QAC ve ISK immunostimulantlarının *Aeromonas salmonicida* O-antijen kombinasyonu ile bağışıklık kazandırılmış gökkuşağı alabalıklarında dalak hücrelerinin fagositik aktivitelerini incelemişler ve levamisolün diğer immunostimulantlardan daha düşük olmasına rağmen fagositik aktivite bakımından kontrol grubu ile istatistiksel olarak önemli farklılık bulmuşlardır. Kajita ve diğ. (1992), gökkuşağı alabalığına FCA'yı intraperitoneal olarak enjekte ettikten 5 ve 30 gün sonra böbrek hücrelerinin fagositik aktivitesinde önemli bir artışın oluştuğunu; Sakai ve diğ. (1993), laktoferrin ile *Vibrio anguillarum* ve *Streptococcus sp.*'ye karşı tedavi edilen gökkuşağı alabalığının fagositik aktivitesinin albumin uygulanan kontrol grubu balıklarının hücreleriyle karşılaştırıldığında önemli derecede farklılık gösterdiğini; Yoshida ve diğ. (1995), EF203 uygulanan balıkların fagositik aktivitesinin uygulamadan 1 gün sonra önemli bir artış gösterdiğini, bu artışın 3 ve 5. günlerde sürdüğünü tespit etmişlerse de, 7. günde kontrol grubu ile arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılığın olmadığını gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada elde edilen bulgular değerlendirildiğinde, levamisol uygulanan gruplarda 3. günden sonra fagositik aktivitede artışın görüldüğü ve fagositoz bakımından en yüksek düzeye uygulamanın 14. gününde ulaşıldığı görülmektedir. Burada elde edilen veriler fagositik aktivite açısından diğer immunostimulantlarla yapılan çalışmalarla paralelik göstermektedir.

5.7. Balık Hücrelerinin Myeloperoksidaz (MPO) Üretimi

MPO, nötrofillerin fagositozu ile ilgili bir mekanizma olup yüzey zarlarında bulunan bir oksidaz ile süperoksit anyonlarının oluşturulmasıdır. Bu süper oksitlerin bir kısmı hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülür ve diğer kısımla birlikte fagositoz vakuolu içine taşınır. Hücre içine alındıktan sonra lizozomlarla birleşir. Burada H_2O_2 , myeloperoksidazların eşliğinde klor iyonlarıyla tepkimeye girerek etkili bir bakterisit olan hipokloriti oluşturur (Akay, 1999). MPO, H_2O_2 ve halojenler ile birlikte bakterileri öldürür. MPO, H_2O_2 , halojenler ve asit pH; antibakteriyel, anti-viral, anti-fungal ve

antimukosal etki gösterirler (Gülmezoğlu ve Ergüven, 1994). Bu çalışma da kullanılan teknikte; kan yaymalarının mikroskopta dikkatle bakılması gerekmektedir (Siwicki ve diğ., 1994).

Yapılan çalışmada levamisol uygulanan balıklarda MPO aktivitesi kontrol balıklarından daha fazla çıkmıştır. Siwicki ve diğ. (1994), altı farklı (Macrogard, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisia*, Evestel, Chitosan ve Finn Stim) immunostimulantı oral yolla verdikleri gökkuşağı alabalığında non-spesifik savunma mekanizmalarını incelemiş ve tüm immunostimulant maddelerin MPO aktivitesini artırdığını gözlemlemişlerdir. Yapılan bu çalışmada elde edilen veriler bu araştırmacıların bildirdiği verilerle uyum içerisindedir.

Siwicki (1987), farklı dozdaki (5, 10, 15 ve 20 mg kg⁻¹) levamisolü yumurtlamak üzere olan sazanlara intraperitoneal olarak enjekte etmiş ve balıkların non-spesifik savunma mekanizmalarını incelemiştir. Buna göre MPO aktivitesi bakımından en yüksek aktiviteyi 5 mg kg⁻¹ levamisol dozu uygulanan balıklarda tespit etmiştir. Bu grup balıklarda MPO aktivitesi 2. haftadan itibaren artmaya başlamış ve deneme süresi sonu olan 12. haftaya kadar bu yüksek aktivitesini sürdürmüştür. Bu çalışmada, levamisol uygulanan balıklarda MPO aktivitesinin oldukça yükseldiği görülmüştür. Bu grup balıklarda MPO aktivitesi 7. günde artmaya başlamış ve deneme sonuna kadar yüksek aktivitesini sürdürmüştür. Deney grubundaki balıklar da MPO aktivitesi bakımından elde edilen diğer araştırmacıların bulmuş oldukları verilere yakın olduğu gözlenmektedir.

5.8. Balık Plazmasında Toplam İmmunoglobulin

Balıklarda, spesifik savunma mekanizmalarının en önemli elemanlarını antikorlar oluşturmaktadır. Balıkta immunoglobulinler herhangi bir immunizasyondan sonra kısa bir sürede oluşmasına rağmen normal koşullarda meydana gelmesi için oldukça uzun zaman gerekebilmektedir (Anderson ve diğ., 1992). Levamisolün hücrel immunitiyi arttırdığı, antikor üretimi üzerine bir değişiklik yapmadığı bildirilmiştir (Erganiş ve Kaya, 1990). Levamisolün balıklar üzerine farklı dozlarıyla yapılmış çalışmalarda bu bilgilerin doğruluğu kanıtlanmıştır. Siwicki ve diğ. (1990), gökkuşağı alabalıklarının dalak hücreleriyle levamisol kullanarak yapmış oldukları bir *in vitro* çalışmada antikor üreten hücrelerin düşük dozda (5 µl ml⁻¹) kontrol grubundan farklı

olduğunu ancak yüksek dozların (25 ve 50 $\mu\text{l ml}^{-1}$) immunosupresif etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Jeney ve Anderson (1993 b), *A. salmonicida* O-antijeni ile QAC, ISK ve levamisol kombinasyonlarını verdikleri gökkuşağı alabalığının kan sirkülasyonundaki antikor titresini belirlemişlerdir. Buna göre; uygulamanın 14. gününde levamisol uygulanan grubun diğer immunostimulant ve kontrol grubu balıklarına karşı daha aktif olduğu tespit edilmişse de 28. günde hem immunostimulant hemde kontrol grubu balıklardan daha az aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Bu çalışmada ise, levamisol uygulanan balıkların antikor düzeyi kontrol grubundan daha yüksek çıkmıştır. Bu bakımdan elde edilen bulgular bu araştırmacıların sonuçlarıyla uyum sağlamamaktadır. Ancak elde ettiğimiz veriler, Siwicki ve diğ. (1994)'nin çeşitli immunostimulant maddeleri yemlere katarak bir hafta boyunca beslediği gökkuşağı alabalıklarının toplam immunoglobulin miktarını kontrol grubundan daha fazla bulduğunu bildirdiği çalışmayla paralellik arz etmektedir.

5.9. Balık Plazmasında Lizozim Aktivitesi

Lizozim; protein karakterinde bir hidrolitik enzim olup non-spesifik humoral dirençte önemli bir elementtir. Lizozim muhtemelen liziz etkisinden dolayı bakterilerin hücre duvarlarına saldırması nedeniyle antibakteriyel bir enzim olarak kabul edilmektedir. Lizozim bir çok balığın fagositik hücrelerinde, mukus ve serumunda bulunmuştur (Studnicka ve diğ., 1986; Siwicki ve Studnicka, 1987; Grinde, 1989).

Farklı immunostimulantlarla immunizasyonu sağlanmış değişik türdeki balıklarda plazmada lizozim aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Engstand ve diğ., 1992; Sakai ve diğ., 1992; Marc ve diğ., 1995; Verlhac ve diğ., 1996). Çalışmada 5 mg kg^{-1} levamisolün uygulandığı balıkların tamamının plazmasında lizozim aktivitesinin arttığı tespit edildi.

Siwicki (1987), levamisol uygulamasından bir hafta sonra plazmada lizozim seviyesinin en üst düzeye ulaştığını ancak bu artışın zamanla azaldığını gözlemlemiştir. Levamisolün oral yolla verildiği sazanlarda lizozim aktivitesinin ilk haftadan itibaren arttığı ancak uygulamanın 4. haftasında en yüksek düzeye ulaştığı bildirilmiştir (Siwicki, 1989). Verlhac ve diğ. (1996), glucanın 10 mg'ı ile enjekte edilerek immunizasyonu sağlanmış gökkuşağı alabalıklarında uygulamadan 1 hafta sonra lizozim aktivitesinde yüksek bir artış görüldüğünü ve 2. haftadan sonra en yüksek

noktaya ulaştığı tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da levamisol enjekte edilen deney grubundaki balıkların plazmasında lizozim aktivitesi artmıştır. Bu balıklarda uygulamadan ilk gününden itibaren artmaya başlamış ve 10. günde en üst düzeye ulaşmıştır. Bu günden deneme süresi sonuna kadar ise bir azalma sürecine girmiştir. Bu sonuçlar diğer araştırmacıların sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

Siwicki (1987), levamisolün farklı dozlarını uyguladığı sazan balıklarında plazmada lizozim aktivitesi bakımından en iyi sonucun 5 mg kg⁻¹ levamisolün uygulandığı balıklarda görüldüğünü bildirmiştir. 15 ve 20 mg kg⁻¹’lık dozda levamisol uygulamasında plazmadaki lizozim aktivitesindeki artışın 5 mg kg⁻¹ uygulama grubundan daha az olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada da, söz konusu doz miktarının uygulandığı balıklarda lizozim seviyesi kontrol grubu balıklardan oldukça fazla çıkmıştır. Bu sonuç, diğer araştırmacıların bulgularıyla paralellik arz etmektedir.

Lizozim aktivitesindeki farklılıkların bilinmesi sağlıklı ve hastalıklı balık arasındaki ilişkinin kurulmasıyla; balık hastalıklarının erken teşhisi yapılabilmektedir (Studnicka ve diğ., 1986).

5.10. Balık Plazmasında Seruloplasmin Aktivitesi

Serulopazmin serum bakırının % 95’inin taşınmasından sorumlu bir α -globulin maddesidir. Cp; ferro oksidaz içermekte ve çeşitli genetik varyasyonlarda bakırı bağlamaktadır. Yetiştiriciliği yapılan balıklarda Cp’nin fizyolojik aktivitedeki etkisi hakkında literatür bilgisi yetersizdir. Bakteri, virus veya diğer enfeksiyonlarda hastalığın erkenden tespit edilmesinde balığın Cp aktivitesi önemli ipuçları vermektedir. Bu testin sonucunda erken teşhis pratik bir yol olup terapötik ve profilaktik önlemler alınabilmektedir (Siwicki ve Studnicka, 1986).

Çalışmada; lavamisol enjekte edilen balıklarda Cp aktivitesi en yüksek 21.05 ± 0.89 % mg (deney) ve 15.48 ± 1.14 % mg (kontrol) olarak bulundu. Siwicki ve Studnicka (1986), sağlıklı sazanlarda Cp aktivitesinin 9.87 ile 15.74 % mg arasında değiştiğini ve branchionecrosis durumundaki balıklarda ise Cp aktivitesinin 26.23 % mg gibi yüksek bir aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir (Siwicki ve Studnicka, 1986).

Deniz ve tatlı su balık kültürünün her ikisinde de başarılı sonuçlar elde etmek ve verimi artırmak; çevre şartlarına, besin dengesine, uygun teknolojiye, hastalıkların kontrolüne ve iyi bir yönetime bağlıdır. Patojen bir enfeksiyona yakalanma riskinin çok fazla olduğu balıklarda spesifik ve non-spesifik savunma mekanizmaları oldukça önem taşımaktadırlar. Balıklarda su sıcaklığına bağlı olarak değişen spesifik savunma mekanizmalarının oluşması kısa yaşam süresine sahip olan balıklar için, oldukça uzun zaman gerekmektedir (Anderson, 1992). Çünkü antikor gibi moleküllerin oluşması, organlardaki karmaşık fizyolojik olayları içermektedir. Bunun yanında, non-spesifik savunma mekanizmaları çoğu zaman yalnızca uyarı aldıklarında aktive olmaktadır. Bu nedenle non-spesifik savunma mekanizmaları balıkların mikroorganizmalarla enfekte olması ve zarar görmesi sırasındaki bir immunizasyondan sonra çok çabuk olarak devreye girer (Anderson ve diğ., 1992). Balıklar için bu kadar önemli olan non-spesifik savunma mekanizmalarını adjuvantlar ve immunostimulantlar kullanarak artırmak mümkündür. Çünkü bir çok bakteriyel ve sentetik immunostimulant T hücre stimulatörüdür (Anderson, 1992).

Son on yıl içinde balıklarda aşılarda, adjuvantların ve immunostimulantların kullanılmasıyla hastalık direncinin artırılması konusuna ilgi çoğalmıştır (Sakai, 1999). Kültür balıkçılığında hastalıklara karşı korunmayı ve non-spesifik savunma mekanizmalarını artırmada immunostimulantlar önemli etkilere sahiptir (Jeney ve Anderson, 1993b). Bu çalışmanın sonuçları; sentetik bir immunostimulant olan levamisolün non-spesifik savunma mekanizmalarını artırmasıyla balık hastalıklarında koruyucu bir madde olarak kullanılması fikrini desteklemiştir.

İmmunostimulantlar balıklara enjeksiyon, banyo veya oral yolla uygulanabilmektedir. Ancak, balık sayısının çok olduğu durumlarda immunostimulantların immersiyon veya oral olarak verilmesi daha kolaydır. Bununla birlikte patojenin tipi ve çevre şartları immunostimulantların veriliş yolunu belirler (Anderson, 1992). Bu nedenle immunostimulant uygulama tekniğinin seçiminde hastalığın karakteristik patolojisi ve çevresel koşullar göz önünde bulundurulmalıdır. İmmunostimulant verilen balıklarda oluşan korunmanın; immunostimulantların intraperitoneal olarak verildiği durumlarda, immerse veya oral yolla immunize edilen balıklardan daha fazla olduğu bildirilmiştir (Anderson ve Siwicki, 1994). Bu çalışmada da elde edilen veriler, daha önce banyo ve oral yolla immunizasyon

oluşturulan çalışmalarla (Hardie ve diğ., 1990; Baba ve diğ., 1993; Jeney ve Anderson, 1993 b; Yoshida ve diğ., 1995) karşılaştırıldığında daha fazla bir korunmanın olduğu gözlenmektedir.

Balık immunizasyon çalışmalarında ilk uygulamadan sonra ikinci bir uygulama veya booster uygulamaları tavsiye edilmektedir. Tekrarlanan uygulamalar korunmanın sürdürülmesinde yardımcı olmaktadır (Anderson ve Jeney, 1992; Jeney ve Anderson, 1993 b). Ancak, bu çalışmada non-spesifik savunma mekanizmalarındaki artışın etkisine bakılarak levamisol uygulamalarında ikinci bir booster uygulamasına gerek olmadığı kanaatine varılmaktadır.

Genellikle biyolojik ve sentetik bileşikler kapsayan immunostimulantlar; hayvanlarda savunma mekanizmalarını artırmaktadırlar. Bununla beraber immunostimulantların balıkların non-spesifik veya spesifik savunma mekanizmalarında stimulant olumsuz cevap verme, allerjik reaksiyonlar, hipersensitivite gibi olumsuz etkilerinin olabileceği bilinmektedir (Siwicki ve diğ., 1990). Gerçekten de bu çalışmada; levamisolün gökkuşağı alabalıklarının immunoglobulin düzeyinde bir artışa neden olmaması levamisolün spesifik bağışıklık üzerine etkisinin az olduğuna dair bilgileri doğrulamıştır. Immunostimulantların immun parametreleri artırmaması veya immunosupresyona neden olması uygulama şekline ve büyük oranda doza bağlanmaktadır (Sakai, 1999) Bu çalışmada da immunoglobulin düzeyinde bir artışın olmaması; çalışmada kullanılan levamisol dozunun düşük veya yüksek olabileceği veya balıkta antikor oluşumunu sağlayacak mekanizmanın oldukça uzun zaman gerektireceğini göz önünde bulundurarak açıklamak mümkündür. Bu nedenle bağışıklama çalışmalarında immunostimulantların uygun dozlarının kullanılması gerekmektedir.

Tüm canlılarda olduğu gibi balıklarda da hastalıklara karşı oluşacak savunma mekanizmaları oldukça fazla öneme sahip olduğundan, gelecekteki çalışmaların bir çoğu bu alanda hastalıklara karşı korunmanın nasıl artırılacağı konusunda olacaktır. Bu nedenle, günümüzde immunostimulantların kullanımı sınırlı olmasına rağmen gelecek için oldukça umut vericidir.

KAYNAKLAR

- Akay, T., 1999, Genel Histoloji, Palme yayıncılık, Ankara, 200 s.
- Akhlaghi, M., Munday, B.L. and Whittington, R.J., 1993, Comparison of the efficacy of two sites of intraperitoneal injection in fish. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 13 (5), 176 – 179.
- Anderson, D. P., 1992, Immunostimulants, Adjuvants, and Vaccine Carriers in Fish: Applications to Aquaculture, Annual Review of Fish Diseases, pp. 281 – 307.
- Anderson, D. P. and Jeney, G., 1992, Immunostimulants added to injected *Aeromonas salmonicida* bacterin enhance the defense mechanisms and protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinary Immunology and Immunopathology, 34, 379 – 389.
- Anderson, D.P., Moritoma, T. and de Grooth, R., 1992, Neutrophil, glass – adherent, nitroblue tetrazolium assay gives early indication of immunization effectiveness in rainbow trout. Veterinary Immunology and Immunopathology, 30, 419 – 429.
- Anderson, D.P. and Siwicki, A.K., 1994, Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in Brook trout immunostimulated with Glucan or Chitosan by injection or immersion. The Progressive Fish Culturist, 56, 258 – 261.
- Anderson, D. P., Jeney, G., Rumsey, G. L. and Siwicki, A. K., 1995, Adjuvants and immunostimulants for potentiating protection against furunculosis in fish. In: Furunculosis (Ed., Bernoth, E. M., Ellis, A. E., Midlyng, P. J., Olivier, G. and Smith, P.), Academic Press Ltd., pp. 345 – 365 .
- Anderson, D. P., Siwicki, A. K. and Jeney, G., 1997, Immunostimulants in fish culture: Induction of nonspecific defence mechanisms and protection against diseases. Conference of Modulators of Immune Responses, Colorado (Abstract).
- Arda. M., Mimbay, A., Aydın, N., İzgür, M. ve Diker, S., 1994, İmmunoloji, Medisan Yayınevi, Ankara, 394 s.
- Baba, T., Watase, Y. and Yoshinaga, Y., 1993, Activation of mononuclear phagocyte function by Levamisole immersion in Carp. Nippon Suisan Gakkaishi, 59 (2), 301-307.

- Bilgehan, H., 1999, Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, Şafak Mat., Ankara, 622 s.
- Chen, D., Yoshida, T., Adams, A., Thompson, K. and Richards, R.H., 1998, Non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis nilotica*, to the extracellular products of *Mycobacterium spp.* and to various adjuvants. Journal of Fish Diseases, 21, 39 – 46.
- Chung, S., and Secombes, C.J., 1987, Activation of rainbow trout macrophages. Journal of Fish Diseases, 31 (Supp. A), 51 – 56.
- Dalmo, R.A. and Seljelid, R., 1995, The Immunomodulatory effect of LPS, laminaran and sulphated laminaran [$\beta(1.3)$ -D-glucan] on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., macrophages *in vitro*. Journal of Fish Diseases, 18, 175 – 185.
- Dalmo, R.A., Ingebrigtsen, K. and Bøgwald, J., 1997, Non – specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). Journal of Fish Diseases, 20, 241 – 273.
- Darson, M., 1981, Role and characterization of fish antibody. Developmental Biological Standardization 49, 307 – 319.
- Diker, S., 1998, İmmunoloji, Medisan Yayınevi, Ankara, 304 s.
- Ellis, A. E., 1976, Leucocytes and related cells in the plaice *Pleuronectes platessa*. Journal of Fish Biology, 8, 143 – 156.
- Ellis, A. E., 1977, The leucocytes of fish: A review. Journal of Fish Biology, 11, 453 – 491.
- Ellis, A. E., 1981, Non-specific defense mechanisms in fish and their role in disease processes. Developmental Biological Standardization 49, 337 – 352.
- Ellis, A. E., 1988, Fish Vaccination, Academic Press Ltd., London, 255 p.
- Engstad R. E., Robertsen, B. and Frivold, E., 1992, Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish and Shellfish Immunology, 2, 287 – 297.
- Erganiş, O. ve Kaya, O., 1990, İmmunomodulatorler ve Kullanım Alanları. Etlik Vet. Mikrob. Derg., 6 (6), 147 – 165.
- Findlay, V. L. and Munday, B. L., 2000, Immunomodulatory effects of levamisole on the nonspecific immune system of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Journal of Fish Diseases, 23, 369 – 378.

- Findlay, V. L., Zilberg, D. and Munday, B. L., 2000, Evaluation of levamisole as a treatment for amoebic gill disease of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., Journal of Fish Diseases, 23, 193 – 198.
- Finn, J.P. and Nielson, N.O., 1971, Inflammatory response in rainbow trout. Journal of fish biology, 3, 463 – 478.
- Gökçe, G., Irmak, K., Sural, E. ve Uzlu, E., 1998, Koyun çiçeğinde immunomodulatorların sağaltıcı ve koruyucu etkileri üzerinde klinik gözlemler. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg., 3 (2), 211 – 215.
- Grinde, B., 1989, Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. Journal of Fish Diseases, 12, 95 – 104.
- Gülmezoğlu, E. ve Ergüven, S., 1994, İmmunoloji, Feryal Mat., Hacettepe- Taş Kit., Ankara, 308 s.
- Hardie, L.J., Fletcher, T.C. and Secombes, C.J., 1990, The effect of vitamin E on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 87, 1 – 13.
- Hardie, L. J., Fletcher, T. C. and Secombes, C. J., 1991, The effects of dietary vitamin C on the immune of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture, 95, 201 – 214.
- Heath, A. G., 1995, Water Pollution and Fish Physiology, Lewis Publishers, New York, 359 p.
- Ingebrigtsen, K., Horsberg, T. E., dalmo, R. and Seljelid, R., 1993, Tissue distribution of immunomodulator aminated β 1 – 3 polyglucose in Atlantic salmon (*Salmo salar*) after intravenous, intraperitoneal and peroral administration. Aquaculture, 117, 29 – 35.
- İstanbuluoğlu, E., 1978, Enterik İnfeksiyonlarda Yerel Bağışıklığın Rolü. A.Ü.Vet. Fak. Derg., 22 (1-2), 72 – 76.
- Jeney, G. and Anderson, D.P., 1993 a, An *in vitro* technique for surveying immunostimulants in fish. Aquaculture, 112, 283 – 287.
- Jeney, G. and Anderson, D.P., 1993 b, Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non – specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 116, 315 – 329.

- Jeney, G. and Anderson, D. P., 1993 c, Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the non-specific defence mechanisms in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 116, 315 – 329.
- Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayashi, M., 1992, Immunopotential activity of Freund's Complete Adjuvant in Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Nippon Suissan Gakkaishi*, 58 (3), 433 – 437.
- Kakuta, I., 1998, Reduction of stress response in carp, *Cyprinus carpio* L., held under deteriorating environmental conditions, by oral administration of bovine lactoferrin. *Journal of Fish Diseases*, 21, 161 – 167.
- Kitao, T., and Yoshida, Y., 1986, Effect of an immunopotentiator on *Aeromonas salmonicida* infection in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Developmental and Comparative Immunology*, 12, 287 – 296.
- Kitao, F., Yoshida, Y., Anderson, D.P., Dixon, O.W. and Blanch, A., 1987, Immunostimulation of antibody – producing cells and humoral antibody to fish bacterins by a biological response modifier. *Journal of Fish Biology*, 31 (supp. A), 87 – 91.
- Kubilay, A. ve Timur, G., 1997, Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Yersinia ruckeri* bakterinine karşı antikor üretiminin aglutinasyon yöntemleriyle tespiti üzerinde bir araştırma. IX. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, Egridir/Isparta, 624 – 640 s.
- Kwapinski, J. B., 1965, *Methods of Serological Research*. John Wiley & Sons Inc., New York, 526 p.
- Marc, A.M., Quentel, C., Severe, A., Bail, P.Y. and Bouef, G., 1995, Changes in some endocrinological and non-specific immunological parameters during seawater exposure in the brown trout, *Journal of Fish Biology*, 46, 1065 – 1081.
- Matsuyama, H. Remy, E.P. and Yano, T., 1992, Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture*, 101, 197 – 203.
- Olivier, G., Evelyn, T.P.T. and Lallier, R., 1985, Immunity to *Aeromonas salmonicida* in coho salmon (*O. kisutch*) induced by modified freund's complete adjuvant: Its

- non-specific nature and the probable role of macrophages in the phenomenon. *Developmental and Comparative Immunology*, 9, 419 – 432.
- Prost, M. and Sopinska, A., 1991, Levamisole-unagent immunostimulant et therapeutique contrala saproleginose de la carpe; In: Problems of chemotherapy in aquaculture: From theory to realy. Office of International Epizootics, 12-15 March 1991. Pp. 373 – 377.
- Roberts, R. J., 1978, *Fish Pathology*, London, Bailliere Tindal, 368 p.
- Robertsen, B., Rorstad, G., Engstad, R and Raa, J., 1990, Enhancement of non-specific disease resistance in atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell wals. *Journal of Fish Diseases*, 13, 391 – 400.
- Sakai, M., 1999, Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172, 63 – 92.
- Sakai, M., Kamiya, H., Atsuta, S., Ishii, S. and Kobayashi, M., 1992, The immunostimulating effects of chitin in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: *Diseases in Asian Aquaculture I*. M. Shariff, R.P. Subainghe and J.R. Arthur (eds), p. 413 – 417. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- Sakai, M., Otubo, T., Atsuta, S. and Kobayashi, M., 1993, Enhancement of resistance to bacterial infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by oral administration of bovine lactoferrin. *Journal of Fish Diseases*, 16, 239 – 247.
- Sakai, M., Yoshida, Y., Atsuta, S. and Kobayashi, M.; Kobayashi, M., 1995, Enhancement of resistance to vibriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by oral administration of *Clostridium butyricum* bacterin. *Journal of Fish Diseases*, 18, 187 – 190.
- Scapigliati, G., Scalia, D., Marras, A., Meloni, S. and Mazzini, M., 1999, Immunoglobulin levels in the teleost sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) in relation to age, season, and water oxygenation. *Aquaculture*, 174, 207 – 212.
- Sigma Chemical Company, 2000, Leukocyte peroxidase (Myeloperoxidase). Sigma Technical Bulletin No: 390, St. Louis Missouri, USA. 6 p.
- Siwicki, A.K., 1987, Immunomodulating activity of levamisole in carp spawners, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biology*, 31 (Supp. A), 245 – 246.

- Siwicki, A.K., 1989, Immunostimulating influence of levamisole on non-specific immunity in carp, *Cyprinus carpio* L. *Developmental and Comparative Immunology*, 13, 87 – 91.
- Siwicki, A. and Studnicka, M., 1986, Ceruloplasmin activity in carp (*Cyprinus carpio*L.). *Bamidgeh*, 38, 126 –129.
- Siwicki, A. K. and Studnicka, M., 1987, The phagocytic ability of neutrophils and serum lysozyme activity in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Biology*, 31 (Supp. A), 57 – 60.
- Siwicki, A. K., Anderson, D. P. and Dixon, O. W., 1989, Comparisons of nonspecific and specific immunomodulation by oxolinic acid, oxytetracycline and levamisole in Salmonids, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 23, 195 – 200.
- Siwicki, A.K. Anderson; D.P. and Dixon, O. W., 1990, *In vitro* immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spleen cells with levamisole. *Developmental and Comparative Immunology*, 14, 231 – 237.
- Siwicki, A.K. and Anderson; D.P., 1993, Immunostimulation in fish: measuring the effects of stimulants by serological and immunological methods. Abstract Symposium on Fish Immunology, Lysekil, Sweden.
- Siwicki, A.K., Anderson; D.P. and Rumsey, G.L, 1994, Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout effects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41, 125 – 139.
- Studnicka, M., Siwicki, A. and Ryka, B., 1986, Lysozyme level in carp (*Cyprinus carpio*L.). *Bamidgeh*, 1, 22 – 25.
- Taraschewski, H., Runner, C. and Mehlhorn, H., 1988, Treatment of fish parasites 3. Effects of levamisole HCL, metrifonate, febendazole, mebendazole and ivermectin on *Anguillicola crassus* (nematodes) pathogenic in the air bladder of eels. *Parasitol. Res.*, 74: 281 – 289.
- Tizard, I., 1992, *Veterinary Immunology: an Introduction*, W. B. Saunders Company, Mexico, 498 p.
- Vadstein, O., 1997, The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture*, 155, 401 – 407.

- van Muiswinkel, W. B., 1992, Fish immunology and fish health, Netherlands Journal of Zoology, 42 (2-3), 494 – 499.
- Verlhac, V., Gabaudan, J., Schüep, W. and Meier, W., 1996, Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout. Journal of Fish Diseases, 21, 127 – 137.
- Wahli, T., Verlhac, V., Gabaudan, J., Schüep, W. and Meier, W., 1998, Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases, 21, 127-137.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997, The stress response in fish. Physiological Reviews, Vol.:77, no: 3.
- Yoshida, T., Kruger, R. and Inglis, V., 1995, Augmentation of non specific protection in African catfish, *Clarias gariepinus*, by the long – term oral administration of immunostimulants. Journal of Fish Diseases, 18, 195 – 198.

