

Levamisolün Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, W)'nın Bazı Kan Parametrelerine Etkisinin Araştırılması^{*}

Mustafa DÖRÜCÜ¹

Ünal İSPİR¹

Cebrahil TÜRK²

¹Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Hastalıklar Bilim Dalı, 23119 Elazığ

² Fırat Üniversitesi Kemaliye Hacı Ali Akın MYO, Su Ürünleri Programı, Kemaliye/Erzincan
mdorucu@firat.edu.tr

Özet

Bu araştırmada gökkuşığı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*)'larına, bir immünostimulant olan levamisolün 1, 5 ve 10 µg ml⁻¹ dozu ile 1 saat banyo uygulamasından sonra, bazı hematolojik parametrelerdeki değişimler araştırıldı. Uygulamanın 1, 7 ve 14. gününde kontrol ve deney balıklarının kuyruk venasından alınan kan ile; eritrosit ve lökosit sayısı, hematokrit, hemoglobin miktarı ve eritrosit indeksleri (MCV, MCH, MCHC) saptandı. Araştırma sonunda; levamisol uygulanan balıkların hematokrit hemoglobin, eritrosit değer ve eritrosit indekslerinde pek fazla bir değişim görülmemiştir. Ancak lökosit sayısında uygulamanın ilk gününden itibaren bir farklılığın olduğu (p<0.05) tespit edildi.

Anahtar kelimeler: levamisol, Gökkuşığı alabalığı, hematolojik parametreler

The Effect of Levamisole on Some Blood Parameters of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W)

Abstract

In this study, alteration in some haematological parameters of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to 1, 5 and 10 µg ml⁻¹ levamisole for one hour were investigated. On days 1st, 7th and 14th after bath treatment with levamisole; erythrocyte and leukocyte numbers, hematocrit, haemoglobin level and erythrocyte indexes (MCV, MCH, MCHC) were determined. There were no changes in hematocrit, haemoglobin and erythrocyte level and erythrocyte indexes of fish exposed to levamisole. However, there was a significant difference in leukocyte numbers from the first day of exposure (p<0.05).

Keywords: levamisole, Rainbow trout, haematological parameters

^{*}Bu araştırma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Koordinatörlüğü tarafından 788 nolu proje olarak desteklenmiştir.

1. Giriş

Balık yetiştiriciliği, dünyada hızla gelişen ve önem kazanan bir endüstri kolu haline gelmiştir. Tatlı su balıkları içerisinde gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, W.) yetiştiriciliğinin en yaygın olarak yapıldığı balık türüdür. Ancak gelişen sanayi ve teknoloji ile birlikte çevresel koşullarda meydana gelen olumsuzluklar sonucu; bakteriyel, paraziter ve fungal hastalıklar baş göstermekte ve yüksek mortalitelere neden olmaktadır. Bu nedenle, özellikle son yıllarda levamisol ve benzer immüno stimulantlar bu problemleri ortadan kaldırmak için uygulama alanına sokulmuştur [1, 2].

Levamisol sentetik bir Phenylimidazoldiazde olup, 1970'lerden beri insan ve veteriner hekimlikte antiparaziter olarak kullanılmaktadır [1 - 3]. Levamisolün Avrupa yılan balıklarında *Anguilla crassus* parazitine [4], Sazanlarda *Saprolegnia* enfeksiyonuna [5] karşı etkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca levamisolün balıklarda immüno stimulant olarak kullanılması konusunda hiçbir çelişki bulunmamaktadır [6 – 13]. Levamisolün bazı hayvanlarda kullanımından sonra toksik etki ve dokularda birikimi söz konusu olduğu halde [14] balıklarda böyle bir bilgiye rastlanılmamıştır.

Kan dokusu organizmada meydana gelen fiziksel ve kimyasal değişiklikleri doğru ve tam olarak yansıtmaktadır [15]. Bu nedenle memeliler ve balıklarda kanın analizi; metabolik bozukluklar ve sepsisemik hastalıklarda geniş uygulama alanı bulmaktadır. Bununla birlikte immüno stimulantların vücutta oluşturduğu fizyolojik değişiklikleri ortaya koyması bakımından da önemlidir [1].

Levamisolün gökkuşağı alabalığının, kan hücrelerine etkisi üzerine literatür eksikliği bulunmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada, banyo şeklinde uygulanan levamisolün farklı dozlarının bazı hematolojik parametrelere etkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metod

2.1. Balık

Çalışmada kullanılan ortalama ağırlığı 58.85 (42.0 – 87.3) g olan 120 adet gökkuşağı alabalığı Fırat Üniversitesi Kemaliye Hacı Ali Akın M.Y.O. Su ürünleri Araştırma ve Uygulama Biriminden temin edildi. Balıklar, 11°C'deki suyun sürekli akıtılarak su sirkülasyonunun sağlandığı 400 L'lik fiberglas tanklara kondu ve ticari bir alabalık yemi ile günlük olarak beslendi.

2.2. Deneysel Plan ve Levamisol Uygulaması

Balıklar her grupta 30 adet olacak şekilde, biri kontrol üçü deneysel olmak üzere dört gruba ayrıldı. Deneysel grup balıklara sırasıyla 1, 5 ve 10 µg ml⁻¹ levamisol ile 1 saatlik banyo

uygulaması yaptırıldı. Kontrol grubu balıklarına ise sadece fosfat buffer salin (PBS) uygulandı. Daha sonra balıklar içinde 400 L su bulunan ve düzenli su sirkülasyonunun sağlandığı teknelere alındı. Levamisol uygulamasından 1, 7 ve 14. gün sonunda balıklar bir anestezi madde (Benzocain, 50 ppm) ile bayıltılarak kuyruk venasından tüm kanı, içinde ETDA bulunan tüplere alındı.

Hemoglobin miktarı (g/100 cc), Cyanmetheamoglobin yöntemine göre, Drabkin's ayırıcı kullanarak spektrofotometrede belirlendi [16] .

Hematokrit değeri (%) mikrohematokrit yöntemle saptandı. Kan örnekleri 5 dakika 12.500 rpm'de santrifüj edilerek okundu. Eritrosit ve lökosit sayımları, Natt Herrick solüsyonu kullanılarak Thoma lamında aynı anda yapıldı [17].

Ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama eritrosit hemoglobini (MCH) ile ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) elde edilen bulgulara göre Jain [18]'in bildirdiği formüllerle hesaplandı.

Gruplar arasında hematolojik parametrelerdeki farklılıklar Minitab Statistical Software Release 10 paket programı kullanılarak Varyans Analizi (One – Way ANOVA) ile test edildi. Grupların zamana bağlı olarak kan parametrelerindeki değişim ise Korelasyon ile analiz edildi.

3. Bulgular

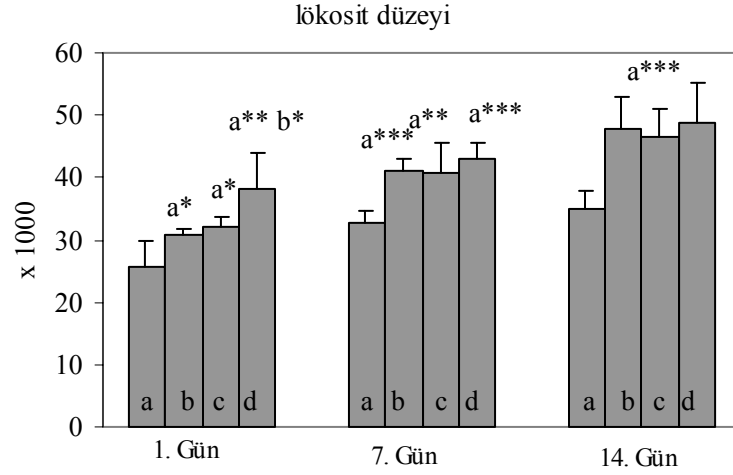
Levamisol (1, 5 ve 10 µg ml⁻¹; 1 saat) ile maruz bırakılan gökkuşığı alabalıklarında hematokrit ve hemoglobin seviyesi, eritrosit ve lökosit sayısı ile eritrosit indekslerinde meydana gelen değişimler Tablo 1'de verilmiştir. Lökosit sayısında zamana bağlı olarak görülen değişim Grafik I'de görülmektedir.

Levamisolün 1, 5 ve 10 µg ml⁻¹ dozu ile 1 saatlik banyo uygulanan her üç grupta da hematokrit, hemoglobin ve eritrosit sayısında elde edilen bulgular kontrol grubuna göre, çalışma sonuna kadar istatistiki olarak farklı olmayan bir değişimin olduğu tespit edildi (p>0.05). Buna rağmen, lökosit sayısının deneysel grupların her üçünde de kontrol grubundan daha fazla olduğu görüldü (p<0.05). Levamisol uygulamasından sonra 7. günde her üç grupta da hiperkromik anemi görüldüğü halde 14. günde bu aneminin ortadan kalktığı görülmektedir. Aynı şekilde uygulamanın ilk gününde her üç grupta da makrositik aneminin görüldüğü ancak 7. ve 14. günde böyle bir oluşumun olmadığı tespit edildi.

Levamisol uygulamasından sonra eritrosit (r: 0.906) ve lökosit (r: 0.896) değerlerinde zamana bağlı bir değişimin olduğu görüldü.

Tablo 1. Gökkuşığı alabalığında levamisolün bazı hematolojik parametrelere etkisi. a: kontrol grubu, b: 1 µg ml⁻¹ levamisol uygulanan grup, c: 5 µg ml⁻¹ levamisol uygulanan grup, d: 10 µg ml⁻¹ levamisol uygulanan grup, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Uygulamadan sonraki günler				
		1	7	14
Parametre	Gruplar	Ortalama ± SD	Ortalama ± SD	Ortalama ± SD
Hematokrit (%)	Kontrol	35.60 ± 3.05	36.20 ± 2.28	35.40 ± 3.05
	1 µg ml ⁻¹	36.80 ± 1.30	35.80 ± 2.77	36.60 ± 3.36
	5 µg ml ⁻¹	35.00 ± 2.92	35.00 ± 2.55	35.40 ± 6.11
	10 µg ml ⁻¹	35.20 ± 1.92	36.00 ± 1.87	36.00 ± 7.11
Eritrosit	Kontrol	1.144 ± 0.09	1.224 ± 0.06	1.210 ± 0.20
	1 µg ml ⁻¹	1.104 ± 0.09	1.232 ± 0.59	1.418 ± 0.04
	5 µg ml ⁻¹	1.072 ± 0.07	1.450 ± 0.04 ^{a*** b*}	1.320 ± 0.13
	10 µg ml ⁻¹	1.110 ± 0.12	1.228 ± 0.20	1.290 ± 0.21
Hemoglobin (g/100 ml)	Kontrol	6.86 ± 0.25	6.56 ± 0.81	6.72 ± 1.16
	1 µg ml ⁻¹	6.68 ± 0.86	6.88 ± 0.69	6.28 ± 0.41
	5 µg ml ⁻¹	6.70 ± 1.23	6.84 ± 0.26	6.42 ± 0.80
	10 µg ml ⁻¹	6.64 ± 1.26	6.72 ± 1.07	6.58 ± 0.96
Lökosit (Adet)	Kontrol	25.80 ± 4.09	32.6 ± 2.07	35.00 ± 2.92
	1 µg ml ⁻¹	30.80 ± 0.83 ^{a*}	41.2 ± 1.92 ^{a***}	47.80 ± 5.07 ^{a***}
	5 µg ml ⁻¹	32.00 ± 1.58 ^{a*}	40.6 ± 5.03 ^{a**}	46.40 ± 4.72 ^{a***}
	10 µg ml ⁻¹	38.20 ± 5.89 ^{a** b*}	43.0 ± 2.45 ^{a***}	48.80 ± 6.30 ^{a***}
MCV (µ ³)	Kontrol	313.2 ± 40.7	295.95 ± 16.23	298.8 ± 50.9
	1 µg ml ⁻¹	330.5 ± 29.9	292.39 ± 18.02	258.2 ± 23.4
	5 µg ml ⁻¹	327.2 ± 26.7	241.55 ± 19.27 ^{a***,b**}	272.8 ± 68.0
	10 µg ml ⁻¹	320.3 ± 39.3	285.50 ± 57.70	278.4 ± 24.8
MCH (µg)	Kontrol	60.67 ± 11.41	53.59 ± 6.22	55.23 ± 7.67
	1 µg ml ⁻¹	61.37 ± 13.57	56.88 ± 11.23	44.34 ± 3.44
	5 µg ml ⁻¹	62.77 ± 12.76	47.14 ± 4.70	48.66 ± 3.79
	10 µg ml ⁻¹	60.42 ± 13.29	53.29 ± 6.22	51.84 ± 8.87
MCHC (%)	Kontrol	19.36 ± 2.39	18.09 ± 1.69	19.14 ± 4.02
	1 µg ml ⁻¹	18.49 ± 3.58	19.33 ± 2.69	17.26 ± 1.86
	5 µg ml ⁻¹	19.12 ± 3.14	19.52 ± 1.46	18.75 ± 4.81
	10 µg ml ⁻¹	19.39 ± 2.02	18.63 ± 2.62	18.83 ± 4.07



Grafik I. Levamisolün gökkuşluğu alabalığı'nın lökosit düzeyine etkisi. a: kontrol grubu, b: $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ levamisol uygulanan grup, c: $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ levamisol uygulanan grup, d: $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ levamisol uygulanan grup, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

4. Tartışma

Levamisol, dünyanın bir çok bölgesindeki balık üretim tesislerinde özellikle bakteriyel enfeksiyonların engellenmesinde immünostimulant olarak kullanılmaktadır [1]. Levamisolün balıklarda immünostimulant olarak kullanılması üzerine hiçbir çelişki bulunmamasına rağmen [6 – 13], balıkların eritrosit sayısı ve hemoglobin gibi kan profili üzerine etkisi henüz tam olarak ortaya konulamamıştır.

Hematokrit düzeyi balık sağlığı için genel bir indikatördür. Bu parametre, balık sağlığı hakkında ip uçları vermekte ve immünostimulantlardan kaynaklanan anormallikleri açıklamaya yardım etmektedir. Yüksek sıcaklık altında dahi oldukça değişkenlik gösterebilecek hematokrit değer üzerine immünostimulantların çok az etkili olabileceği bildirilmiştir [1]. Kakuta [19], bir immünostimulant olan laktoferrinin sazanlarda hematokrit düzeye pozitif etki gösterdiğini bildirmiş olmasına rağmen İspir [12], gökkuşluğu alabalıklarında levamisolün hematokrit düzeye etkisinin olmadığını tespit etmiştir. Bu çalışmada da gruplar arasında hematokrit düzey bakımından kontrol grubuna göre istatistiki farklılık göstermemesi ($p>0.05$) önceki bilgileri doğrulamaktadır.

Siwicki ve Anderson [20], immünostimulantların bazı hematolojik parametreler üzerine etkili olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da, levamisolün eritrosit ve hemoglobin değer ile eritrosit indeksleri üzerinde fazla etkili olmadığı tespit edilmiştir. Bu parametrelerin bazıları zamana bağlı olarak bir azalma veya artma göstermesine rağmen kontrol grubuna göre anlamlı farklılık ($p>0.05$) arz etmemiştir.

Tüm hayvanlarda olduğu gibi balıklarda da patojenik mikroorganizmalara karşı ilk savunma non spesifik immün mekanizmalar ile olmaktadır [21]. Non – spesifik savunma da

lökositler tarafından yönlendirilmektedir [22]. Balıklarda levamisol ile yapılan çalışmalarda lökosit düzeyindeki değişimlerde önemli farklılıkların olduğu görülmüştür. Anderson ve Jeney [23], *Aeromonas salmonicida*'ya karşı bazı immüno stimulantların etkisini araştırmış ve levamisolün lökosit düzeyini artırdığını ortaya koymuşlardır. Siwicki [6], sazanlarda yüksek doz levamisolün lökosit düzeyinde azalmalara neden olduğunu tespit etmişse de optimal levamisol dozunun önemli artışlara neden olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada da banyo şeklinde levamisol uygulanan balıklarda lökositoz oluşması önceki bilgileri doğrular niteliktedir.

Çalışmada, levamisol uygulamasından sonra görülen makrositik ve hiperkromik anemiyi, levamisol uygulamasıyla birlikte oluşan strese bağlı olarak hematopoetik dokularda meydana gelebilecek yıkımlara bağlamak mümkündür [1].

Levamisolün yüksek dozlarının immunosupresyona neden olduğu bilinmektedir [10, 24]. Ancak bu çalışmada en yüksek doz olan 10 µg ml⁻¹ levamisol uygulanan balıklarda lökosit düzeyi, uygulamanın ilk gününden itibaren artmaya başlamış ve 14. gün sonunda dahi kontrol grubundan istatistiki olarak farklı çıkmıştır (p<0.05).

Bu çalışmada, hastalıklara karşı banyo şeklinde levamisol uygulamasının etkilerini kan hücrelerindeki değişimin ortaya konmasıyla fizyolojik olarak bakılmıştır. Ancak çalışmada immuno – hematoloji içinde değerlendirilen fizyolojik olaylarda değişimin pek olmaması; incelenen parametreler çerçevesinde, levamisolün balıkların kan profili üzerine etkili olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, lökosit düzeyindeki artış, bu maddenin yüksek mortaliteye neden olan enfeksiyonların kontrolünde banyo şeklinde uygulanmasının faydalı olabileceğinin açık bir göstergesidir.

Kaynaklar

1. D.P. Anderson, Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. Ann. Rev. Fish Dis. 2, 281 – 307, 1992.
2. M. Sakai, Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture, 172: 63 – 92, 1999.
3. P. A. Janssen, The levamisole story. Prog. Drug Res. 20: 347 – 383, 1976.
4. H. Taraschewski, C. Runner, and H. Mehlhorn, 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, 1988.
5. M. Prost and A. Sopinska, Levamisole-an agent immunostimulant et therapeutique contrala saproleginose de la carpe; In: Problems of chemotherapy in aquaculture: From theory to reality. Office of International Epizootics, 12-15 March 1991. Pp. 373 – 377, 1991.
6. A. K. Siwicki, Immunomodulating activity of levamisole in carp spawners, *Cyprinus carpio* L. J. Fish Biol., 31 (Supp. A): 245 – 246, 1987.
7. A. K. Siwicki, Immunostimulating influence of levamisole on non-specific immunity in carp, *Cyprinus carpio* L. Dev. Comp. Immunol., 13: 87 – 91, 1989.
8. T. Baba, Y. Watase, and Y. Yoshinaga, Activation of mononuclear phagocyte function by levamisole immersion in Carp. Nippon Suisan Gakkaishi, 59 (2), 301-307, 1993.

9. V. Mulero, M. A. Estaban , J. Munoz. and J. Mesenguer, Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish & Shellfish Immunology 8: 49 – 62, 1998.
10. V. Mulero, M. A. Estaban and J. Mesenguer, *In vitro* levamisole fails to increase seabream (*Sparus aurata* L.) phagocyte functions. Fish & Shellfish Immunology 8: 315 – 318, 1998.
11. V. L. Findlay and B. L. Munday, Immunomodulatory effects of levamisole on the nonspecific immune system of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Aquaculture, 23: 369 – 378, 2000.
12. Ü. İspir, Levamisolün gökkuşluğu alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*, W.) immun sistemine etkisinin araştırılması. Fırat Üniv. Fen Bilimleri Enst. Yüksek Lisans Tezi, 44 s. Elazığ. 2001.
13. A. Cuesta, M. A. Esteban, and J. Meseguer, Levamisole is a potent enhancer of gilthead seabream natural cytotoxic activity. Vet. Immun. Immunopat. 89: 169 – 174, 2002.
14. J. G. Babish, G. C. Coles, J. P. Tritschler, W. H. Gutenmann, and D. J. Lisk, Toxicity and tissue residue depletion of levamisole hydrochloride in your goats. American Journal Vet.Res. 51: 1126 – 1130, 1990.
15. M. Kocabatmaz ve G. Ekingen, Değişik tür balıklardan kan örneği alınması ve hematolojik metodların standardizasyonu. TÜBİTAK Veteriner ve Hayvancılık Araştırma Grubu. Proje No: VHAG – 557. 72 s. 1982.
16. R. K. Cannan, Hemoglobin (as Cyanmethemoglobin) in Blood. Clin. Chem. 4, 246 – 251, 1958.
17. T. Konuk, Pratik Fizyoloji. A. Ü. Vet. Fak. Yay. 314, Ders kitabı 215, 250 s, Ankara. 1981.
18. N. C. Jain, 1993, Essentials of Veterinary Hematology. Lea & Febiger, Philadelphia. 417 p.
19. I. Kakuta, Reduction of stress response in carp, *Cyprinus carpio* L., held under deteriorating environmental conditions, by oral administration of bovine lactoferrin. J. Fish Dis., 21, 161 - 167, 1998.
20. A. K. Siwicki, D. P. Anderson, Immunostimulation in fish: measuring the effects of stimulants by serological and immunological methods. Abstract Symposium on Fish Immunology, Lysekil, Sweden, 1993.
21. G. T. Rijkers, Non-lymphoid defense mechanisms in fish. Dev. Comp. Immunol. 6: 1 – 13, 1982
22. K. M. Treves – Brown, Applied Fish Pharmacology. P. 251 – 259, Kluwer Academic Publisher, London. 2000.
23. D. P. Anderson, and G. Jeney, Immunostimulants added to injected *Aeromonas salmonicida* bacterin enhance the defense mechanisms and protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Vet. Immun. Immunopat., 34, 379 – 389, 1992.
24. A. K. Siwicki and M. Cossarini – Dunier, Effect of levamisole on the lymphocyte and macrophage activity in carp (*Cyprinus carpio*). Ann. Recher. Vet. 21: 95 – 100, 1991.