

Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Zeranol'un Anabolik Etkinliği ve Spesifik Olmayan İmmün Sisteme Yönelik Etkisinin İncelenmesi*

Oya KELEŞ

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Avcılar, İstanbul - TÜRKİYE

Akın CANDAN

İstanbul Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Balık Hastalıkları Anabilim Dalı, Beyazıt, İstanbul - TÜRKİYE

Tülay BAKİREL

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Avcılar, İstanbul - TÜRKİYE

Süheyla KARATAŞ

İstanbul Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Balık Hastalıkları Anabilim Dalı, Beyazıt, İstanbul - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 31.05.2001

Özet: Endokrin ve immün sistem arasındaki etkileşim doğrultusunda, sentetik bir östrojen bileşiği olan zeranolün Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) büyüme ve gelişim oranları ile spesifik olmayan immün sistem üzerine etkisi incelendi. Bu amaçla balıklara 0, 2,5, 5, 10 ve 20 ppm zeranol içeren yemler 21 gün süresince verildi. Elde edilen veriler istatistiksel yönden değerlendirildiğinde, boy uzunluğunun 5, 10 ve 20 ppm, canlı ağırlığın ise 10 ve 20 ppm zeranol verilen gruplarda kontrole oranla önemli düzeyde yüksek olduğu bulundu. Zeranol verilmesiyle elde edilen kondüsyon faktörü ve spesifik gelişim oranları da bu bulguları destekler niteliktedir. Spesifik olmayan immün sistemle ilgili deneylerde izole edilen lökositler, maya hücrelerini fagosite etme yeteneği ve intraselüler ile ekstraselüler süperoksit radikal üretimi sonucu belirlenen bakterisit aktivite yönünden incelendi. Lökositlerin fagositoz ve bakterisit aktivitesinin zeranolün dozuna bağlı olarak önemli düzeyde arttığı, total serum protein değerlerinde ise belirgin bir değişiklik gözlenmediği saptandı. Elde edilen veriler, zeranolün anabolizan etkisinin yanı sıra spesifik olmayan immün yanıtı uyardığını gösterir.

Anahtar Sözcükler: Zeranol, *Oncorhynchus mykiss*, anabolik etki, spesifik olmayan immunité.

The Investigation of the Anabolic Efficiency and Effect on the Nonspecific Immune System of Zeranol in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum)

Abstract: Considering the relation between the endocrine and immune systems, the effects of zeranol, a synthetic oestrogen compound, on the growth rate and nonspecific immune system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) were investigated. For this reason, fish were fed a diet containing 0, 2.5, 5, 10 and 20 ppm zeranol for 21 days. When the data was statistically analysed, the body length in the fish groups fed with 5, 10 and 20 ppm, and the body weight for those given 10 and 20 ppm zeranol, were found to be significantly higher than in the control group. The specific growth rate and the condition factor results also supported the above results. In experiments related to nonspecific immunity, leucocyte fractions were analysed for phagocytic activity to yeast cells and for bactericidal activity by the measurement of the production of intracellular and extracellular superoxide radicals. It was determined that the phagocytosis and bactericidal activity of cells were significantly increased in conjunction with dietary zeranol doses, but no significant changes in serum total protein levels were observed. The results of the present study showed that in addition to its anabolic effect, zeranol stimulated nonspecific immune responses in rainbow trout.

Key Words: Zeranol, *Oncorhynchus mykiss*, anabolic effect, nonspecific immunity.

Giriş

Ülkemizde kültür balıkçılığı, coğrafi konum ve iklimsel özelliklerin oldukça elverişli koşullara sahip olması nedeniyle hızla gelişen bir sektör niteliğindedir. FAO

gözlemlerinde ülkemizin 1998 yılı su ürünleri üretiminin 45,450 ton olduğu ve Batı Asya ülkeleri arasında 2. sırada yer aldığı bildirilmektedir (1). Bununla birlikte kültür balığı üretim potansiyeli tam olarak

* Bu araştırma, İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu (Proje No: 1218/181298) tarafından desteklenmiştir.

değerlendirilememekte; beslenme hataları ve hastalıklardan dolayı yeterli verim düzeyine ulaşamamaktadır. Balıkların büyüme ve gelişmesi, memelilerden farklı olarak proteinlerin basit bir birikimi sonucu kas dokusunun protein düzeyindeki artış ve hücre hiperplazisi ile gerçekleşmektedir (2). Balıkların büyüme özelliği ile ilgili bu bilgiler doğrultusunda yapılan ve hayvansal üretimi artırmayı hedefleyen araştırmalarda anabolizanların yanısıra yemlerdeki protein düzeyini yükseltmenin etkisi incelenmiştir. Büyümeyi hormonal yolla hızlandırmak amacıyla salmon, alabalık ve sazan gibi birçok balık türünde androjen anabolizan olarak etilestrenol ve metiltestosteron kullanımının, bağırsak granüler hücrelerin hipertrofisi ve proteolitik aktivite artışı gibi etkilere neden olduğu belirlenmiştir. Sindirim sistemi fonksiyonlarındaki bu değişikliklerin organizmada azot tutulması, ağırlık kazancı, yem ve proteinden yararlanma oranının yükselmesi gibi gelişim artırıcı metabolik etkiler ile sonuçlandığı belirlenmiş ve yapılan değerlendirmelerde, anabolizanların etkinliğinin yemlerin protein düzeyinin artırılmasına oranla daha belirgin yararlar sağladığı gözlenmiştir (2,3,4).

Anabolizanların büyüme ilerletici amaçla uzun süre uygulanmaları diğer biyolojik aktivitelerinin de önem kazanmasına yol açmaktadır. Özellikle endokrin ve immün sistem arasındaki yakın ilişki (5,6) gözönüne alınarak anabolizanların immün yanıt üzerindeki etkileri incelenmiştir. Androjen anabolizan olan trenbolon asetat ile balıklarda yapılan çalışmalarda, bileşiğin oral yolla kullanımının infeksiyonlara karşı koruma sağlayabildiği, özellikle epizootik ülseratif sendrom gibi yüzeysel infeksiyonlarda 20 ppm'lik dozun terapötik etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir. Mekanizma tam olarak bilinmemekle beraber protein biyosentezinde lokal artış sonucu epidermis hücrelerinin onarımının arttığı, travma ve diğer nedenlere bağlı olan epitelyal hasarın hızla ortadan kaldırıldığı ve deri kalınlığında artışa yol açtığı saptanmıştır (7).

Yine bir anabolik ajan olan Zeranol (6-6,10-dihydroxyundecyl- β -resorcylic acid-lactone) Fusarium türlerinden elde edilen zearalenonun sentetik türevidir. Anabolik amaçla uygulanmaları sırasında arınma sürelerine uyulmamasından kaynaklanan ve tüketiciye yansıyan kalıntıların, önemli sağlık sorunları yaratabileceği düşünülmektedir. Bu görüş doğrultusunda anabolizanların, Avrupa Topluluğu ülkelerinde terapötik endikasyon alanları dışında kullanımları yasaklanmasına

rağmen Amerika ve Anglosakson ülkelerinde yasal zorunluluklara uyulması koşuluyla kullanılmalarında herhangi bir kısıtlama bulunmamaktadır (8,9). Zeranolün anabolik etkisinin yanısıra immün sistem üzerindeki etkileri de incelenmiş ve tartışmalı sonuçlar elde edilmiştir. Zearalenon ve türevlerinin T hücre fonksiyonlarını etkilediği ve lenfosit blastogenesi inhibe ettiği saptanmıştır (10). Buna karşın humoral immüniteye yönelik incelemelerde, tavşanların B19 brucella aşısı ile immunizasyonundan sonra zeranol uygulamanın, serum protein düzeyleri ve antikor yanıtında artışa neden olduğu bildirilmiştir (8). Hormonal uygulamaların immün reaksiyonlara etkisinin incelendiği bir araştırmada ise zeranol implantasyonunun sığırlarda soğuk stresinin neden olduğu immunosupresyona karşı koruyucu etki oluşturduğu gözlenmiş ve bu immunostimulan etkinin zeranolün anabolizan etkisi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (11).

Bir östrojen türevi olan zeranolün immün yanıt modüle ettiğini bildiren araştırmalara rağmen östrojenlerin genel özelliğine uygun olarak immunosupressif bir etkiye de yol açabileceği yönünde görüşler bulunmaktadır (12,13). Zeranolün balıklarda anabolizan yararlığının yanısıra immün sisteme yönelik etkisi ile ilgili bir bilgiye rastlanmamıştır. Alabalıklar gibi teleost balıklarda immün sistem, memelilere benzer şekilde spesifik olmayan konakçı savunması ve spesifik immün fonksiyonlardan oluşmaktadır. Spesifik olmayan immün sistemin patojen mikroorganizmalara karşı çok aşamalı bir reaksiyon olduğu ve spesifik immün sisteme kıyasla daha fazla önem taşıdığı bildirilmiştir (14). Bu nedenle zeranolün balıklarda olası anabolizan etki sağlayabilecek dozlarının spesifik olmayan immün sistem üzerine etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot

Çalışmamızda kullanılan ortalama $49,07 \pm 1,92$ g ağırlığında ve $17,37 \pm 0,15$ cm uzunluğunda 100 adet Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) İ.Ü. Sapanca İç Su Ürünleri Üretimi ve Araştırma biriminden sağlandı. Balıklar biri kontrol olmak üzere 5 gruba ayrıldı ve 250-litrelik fiberglass tanklara yerleştirildi. Çalışma süresince 12 saat aydınlık/karanlık şeklinde uygulanan aydınlatma düzeni içinde oksijenle doyurulmuş ve dinlendirilmiş su (11 ± 2 °C) kullanıldı. Balıklar adaptasyonun sağlanması amacıyla üç hafta süresince ticari balık yetiştirme yemi ile

ad libitum olarak beslendi. Bu işlemi takiben, deney gruplarına ticari balık yetiştirme yemi ile hazırlanmış 0, 2,5, 5, 10 ve 20 ppm zeranol (Pitman-Moore Inc.) içeren pelet yemler 21 gün süresince canlı ağırlığının % 1 oranında olmak üzere günde iki kez verildi. Çalışma periyodunun sonunda 12 saat süreyle aç bırakılan balıklarda boy ve ağırlık ölçümleri alındıktan sonra her gruptan 10 balık lökosit izolasyonu, 10 balık ise total serum protein değerlerinin saptanması için ayrıldı.

DeneySEL İncelemeler

Boy ve Ağırlık Ölçümleri: Anabolizan etkinin değerlendirilmesi amacıyla, çalışmanın 1. ve 22. günlerinde lidokain anestezisi yapılan balıkların bireysel boy ve uzunluk ölçümleri alındı. Elde edilen veriler doğrultusunda, 0-21 günlük dönem süresince grupların spesifik gelişim oranı, $GO = (\ln SA - \ln \dot{A}) / 21 \times 100$, ($GO =$ spesifik gelişim oranı, $SA =$ son ağırlık, $\dot{A} =$ ilk ağırlık) ve 0 ve 21. günlerdeki kondüsyon faktörleri, $k = (C/U^3) \times 100$ ($C =$ canlı ağırlık, $U =$ uzunluk) formülü esas alınarak hesaplandı (4,15)

Lökosit izolasyonu: Zeranol'ün spesifik olmayan immun sistem üzerindeki etkisinin belirlenmesi için lökosit izolasyonu yapıldı. Bu amaçla çalışmanın 22. gününde deney gruplarından rastgele seçilen 10 balığın anestezisi işlemini takiben kaudal venden heparinli enjektörle 1'er cc kan alındı. Elde edilen kan örnekleri hemaglutinasyon tampon çözeltisi içeren Histopaque 1,119 ve 1,077 ile tabaka oluşturacak şekilde silikonlu tüplere ilave edildi. Tüm örnekler 4°C'de 15 dakika süresince santrifüj (500xg) edilerek lökositler özenle ayrıldı ve HBSS ile iki kez yıkandı. Lökositlerin fagositozis ve bakterisit aktivitesinin incelenmesi için canlı hücre sayısı 2×10^6 /ml'ye ayarlandı (16).

Bakterisit aktivite: Fagositik hücrelerin bakterisit aktivitesinin ölçümü ekstraselüler süperoksit radikaller ile sitokrom C'nin indirgenmesinin yanısıra phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) ile uyarılmış lökositlerce üretilen intraselüler süperoksit radikaller tarafından nitroblue tetrazolium'un (NBT) indirgemesi prensibine dayanır (16). Ekstraselüler süperoksit radikallerinin düzeylerinin saptanması için lökosit süspansiyonundan 100 µl alındı ve üzerine eşit miktarda PMA (1 mg/ml) içeren ve HBSS'de hazırlanmış sitokrom C'den (2 mg/L) ilave edildi. Bu kimyasalları aynı düzeyde içeren diğer bir tüpe ise reaksiyonu katalize etmek amacıyla süperoksit

dismutaz (SOD, 300 U/ml) solusyonu katıldı. Her iki karışım, 15 dakika süreyle oda ısısında bekletildikten sonra 550 nm de sitokrom C körüne karşı spektrofotometrede okundu. Elde edilen absorpsan değerlerinin farkının 15,87 ile çarpılması sonucu 10^5 lökosit için nmol O_2^- değeri belirlendi.

Intraselüler süperoksit radikal üretimini saptamak amacıyla nitroblue tetrazolium (NBT) PMA (1mg/ml) ve SOD (300 U/ml) içeren fosfat tampon çözeltisinde % 0,2 oranında çözündürülerek lökosit çözeltisi ile eşit hacimde (100 µl) karıştırıldı. Elde edilen karışım oda ısısında inkübe edildikten sonra 500xg'de üç dakika süresince santrifüj edildi. Ayrılan hücreler % 70'lik metanol ile iki kez yıkanarak DMSO (140 µl) ile 2 M KOH (120 µl) karışımında çözündürüldü ve 620 nm KOH/DMSO körüne karşı spektrofotometrede okundu.

Fagositozis deneyi: Bu deney, kongo kırmızısına boyanmış maya hücrelerinin lökositler tarafından fagosite edilen düzeylerinin spektrofotometrik ölçümü prensibine dayanır. Lökosit solüsyonu (250 µl), otoklavlanmış ve kongo kırmızısına boyanmış maya hücrelerinin süspansiyonu ile 1/40 oranında (500 µl) karıştırıldı. Oda ısısında 60 dakika süre ile inkübe edildikten sonra karışımın üzerine 1'er ml HBSS ve histopaque 1,077 ilave edildi. Maya hücrelerinden lökositleri ayırmak için örnekler 850xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen lökositler HBSS'de yıkandı ve 1 ml tripsin-EDTA solüsyonu (5,0 g/L ve 2,0 g/L EDTA) ile karıştırılarak 37 °C'de 12 saat süresince bekletildi, tripsin-EDTA körüne karşı spektrofotometrede (510 nm) okundu (17).

Serum protein düzeyinin saptanması: Çalışmanın 22. gününde anestezide alınan balıkların dorsal aortalarından 1 cc kan alınarak serumları ayrıldı. Kan örneklerinin total serum protein düzeyleri, ticari kitler kullanılarak Biuret yöntemiyle saptandı (16).

İstatistiksel analizler: Çalışmada kullanılan tüm yöntemlerde, gruplar arasındaki verilerin önemliliği belirlemek amacıyla one-way ANOVA testi uygulandı (18).

Bulgular

Zeranol'ün gökkuşağı alabalıklarında, ağırlık ve boy uzunluğu ile bu verilerden elde edilen spesifik gelişim oranı ve kondüsyon faktörleri üzerine etkisi Tablo 1'de gösterilmiştir. Deneyin başlangıcında boy ve ağırlık yönünden yapılan incelemelerde gruplar arasında önemli

Tablo 1. Gökkuşluğu alabalıklarında zeranolün boy, ağırlık, spesifik gelişim oranı ve kondüsyon faktörü üzerine etkisi.

Gruplar	Deneysel inceleme süresi (gün)						
	0		21		0-21	0	21
	Ağırlık (g)	Boy (cm)	Ağırlık (g)	Boy (cm)	Spesifik Gelişim Oranı Ağırlık (g)	Kondüsyon Faktörü	
0 ppm Z (K)	50,84±4,11	16,43±0,62	62,12±4,41	17,37±0,05	0,95	1,15	1,19
2,5 ppm Z	48,44±6,30	16,27±1,06	66,33±6,91	18,05±0,48	1,50	1,13	1,13
5 ppm Z	50,19±3,85	16,60±0,81	68,55±4,05	18,28±0,45**	1,48	1,10	1,12
10 ppm Z	52,92±3,38	17,29±0,85	77,46±6,38***	18,77±0,75***	1,81	1,02	1,17
20 ppm Z	52,97±3,71	17,27±0,60	80,81±5,29***	18,85±0,73***	2,01	1,03	1,21

K: Kontrol, Z: Zeranol

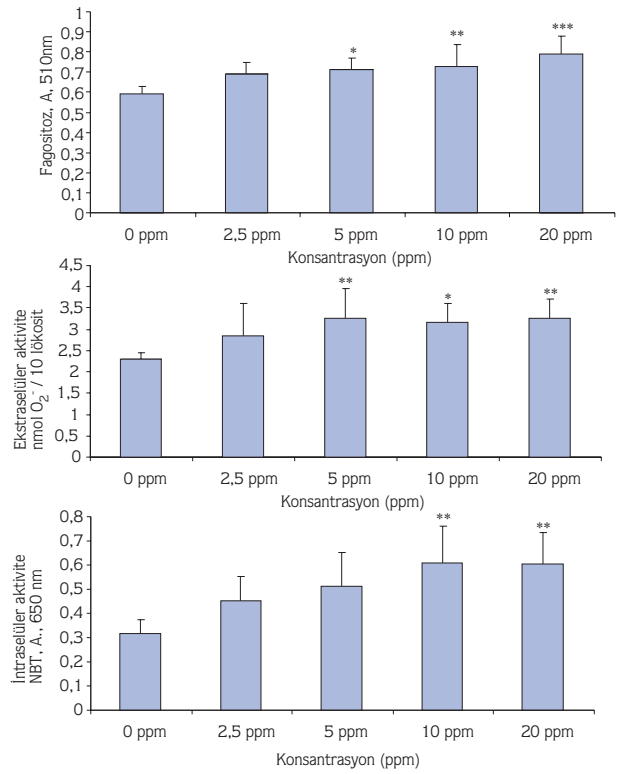
*p<0,05,

**p<0,01,

***p<0,001.

bir istatistiksel farklılığın bulunmadığı saptandı. Zeranol içeren yemlerle beslenen deney gruplarında kontrole oranla değişen düzeylerde canlı ağırlık ve boy uzunluğu artışı gözlemlendi. Veriler istatistiksel yönden incelendiğinde canlı ağırlığın 10 ve 20 ppm, boy uzunluğunun ise 5, 10 ve 20 ppm zeranol verilen gruplarda kontrole göre önemli düzeyde artış gösterdiği belirlendi. Spesifik gelişim oranının zeranol ile beslenen gruplarda kontrol grubuna oranla sırasıyla % 58, 56, 91,112 düzeyinde arttığı ve 21. güne ait kondüsyon faktörleri incelendiğinde ise sadece 20 ppm'lik gruba ait verinin kontrolden daha yüksek olduğu saptandı.

Gökkuşluğu alabalıklarında zeranolün spesifik olmayan immün sistem üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla kullanılan parametrelerden fagositozis ve bakterisit (ekstraselüler ve intraselüler süperoksit radikal üretimi) aktiviteleri ile ilgili veriler Şekil 1'de gösterilmiştir. Fagositik hücrelerin bakterisit aktivitelerine yönelik incelemelerde ekstraselüler aktivite, lökositlerin O₂⁻ üretimine bağlı olarak 5, 10 ve 20 ppm zeranol içeren yemler verilen gruplarda kontrole oranla belirgin bir artış gösterdi. NBT indirgenmesi ve dolayısıyla intraselüler oksidatif radikal üretimi zeranol verilen tüm gruplarda yükseldi. Veriler incelendiğinde 10 ve 20 ppm dozlarla elde edilen düzeylerin kontrole göre yaklaşık iki kat artış gösterdiği ve istatistiksel yönden önemli olduğu saptandı. Lökositlerin fagositozis aktivitesi ise zeranolün dozuna bağlı olarak değişim gösterdi ve zeranolün 2,5, 5, 10 ve 20 ppm'lik dozları ile elde edilen verilerin kontrol



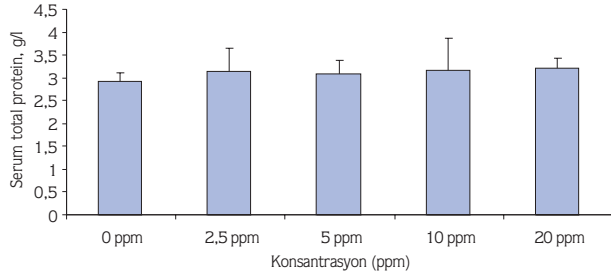
Şekil 1. Zeranolün gökkuşluğu alabalıklarında fagositozis ve bakterisit aktivite (ekstraselüler ve intraselüler süperoksit radikal üretimi) üzerine etkisi.

*p<0.05. ** p<0.01. ***p<0.001.

grubuna göre sırasıyla 1,17, 1,20, 1,24, 1,34 kez daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu değerler incelendiğinde lökositlerin 2,5 ppm'de önemsiz 20 ppm'lik dozda ise en

yüksek düzeyde fagositik aktiviteye sahip olduğu belirlendi.

Tüm gruplara ait serum total protein değerleri Şekil 2'de gösterilmiştir. İstatistiksel yönden yapılan incelemelerde, zeranol uygulamasının serum protein düzeylerinde önemli değişikliğe yol açmadığı gözlemlendi.



Şekil 2. Gökkuşuğu alabalıklarında zeranolün serum total protein düzeyi üzerine etkisi.

Tartışma

Hayvansal üretimi ve ürün kalitesini artırmaya yönelik olarak kullanılan anabolizanlar, proteinlerin asimilasyonu ve sindirilebilirliğini düzenleyerek büyüme için gerekli enerji ve nitrojen düzeyinde yükselme ve feçesle kayıplarda azalmaya neden olur. Çiftlik hayvanlarında kemik sentezinin yanısıra kas kitlesinin % 20'ye kadar ulaşan düzeylerde artması ile karakterize olan anabolik etkinin (9, 19), Gökkuşuğu alabalıklarında da bileşiğin dozuna bağlı olarak gerçekleştiği saptandı. Yemlerle verilen 10 ve 20 ppm'lik zeranol, kontrol grubuna göre önemli düzeyde canlı ağırlık artışı sağlanmasına rağmen 5, 10 ve 20 ppm'lik dozların boy uzunluğunda da artışa neden olduğu belirlendi. Ayrıca zeranol verilen gruplarda spesifik gelişim oranı ile kondüsyon faktörünün dengeli bir büyümenin göstergesi olarak 1'den büyük olması bileşiğin anabolizan etkisini destekler niteliktedir. Kondüsyon faktörünün sadece 20 ppm verilen grupta kontrole göre daha yüksek olması bu faktörün canlı ağırlıkla doğrusal orantısından kaynaklanmaktadır. 10 ppm zeranol verilen grupta ise önemli düzeyde canlı ağırlık artışı sağlanmasına rağmen kondüsyon faktörünün 21. günde kontrole göre daha düşük olması bu gruba ait başlangıç (0. gün) değerleri ile ilişkilidir. Anabolizanların etki mekanizmalarını açıklamak amacıyla yapılan araştırmalarda hücresel büyüme parametrelerini değiştirerek özellikle alabalıklarda hiperplazik bir yanıt şeklinde olan büyüme fonksiyonunu uyardığı saptanmıştır

(2). Bu araştırmada olduğu gibi, zeranolün kültür balıkçılığının özellikle yetiştirme döneminde anabolizan amaçla kullanılmasından kaynaklanabilen ve bu grup bileşiklerin yasaklama gerekçesi olarak kabul edilen kalıntıların, tüketime kadar geçen 9-10 ay gibi bir süreden sonra da varlığını sürdürmesi ve sağlık riski yaratması akılcı görünmemektedir. Bununla birlikte bileşiğin kullanım zamanının bilimsel olarak belirlenmesi için arınma süresinin saptanması ve bu süre içinde verim düzeyindeki değişimlerin incelenmesi gerekir. Ayrıca ruminantlarda anabolizanların kullanımının önemli bir sakıncası olarak görülen östrojen düzeyinin, implantasyon süresi içinde bile karaciğerde 2-5 kat artış göstermesine rağmen kas dokusunda normal sınırlar içinde olduğu saptanmıştır (19). Balıklarda sadece kas dokusunun insan gıdası olarak tüketilmesi, anabolizanların yemlerle uygulanması, balıkların vücut ağırlığının % 2'si oranında yem tüketmesi, yemden yararlanma oranının ruminantlara oranla yüksek oluşu (Salmonidler için ortalama 1-1,5 kg yem ile 1 kg canlı ağırlık elde edilmesi) ve metabolik fonksiyonların su sıcaklığı ile orantılı olarak artması gibi faktörler gözönüne alındığında bu grup bileşiklerin, ruminantlara oranla balıklarda daha güvenle kullanılması olasıdır. Ayrıca zeranolün östrojenik aktivitesinin düşük olduğu, bileşiğin ve metabolitlerinin mutajenik ve karsinojenik aktivitesinin bulunmadığı bilinmektedir (20).

Eksojen kaynaklı steroid ve steroid yapıda olmayan östrojen bileşiklerinin farmakolojik düzeyleri, immunolojik fonksiyonları etkileyerek hastalıklara karşı duyarlılığı değiştirmektedir. Anabolizan amaçla kullanılan ve yüksek düzeyde östrojenik aktiviteye sahip bir bileşik olan dietilstilbestrol'ün immun sisteme yönelik modülatör etkisi bilinmekte; düşük dozlarda immun yanıtın uyarılması, yüksek dozlarda ise baskılanması ile karakterize olan hücresel immunité ile ilgili etkilere neden olduğu bildirilmektedir. Ayrıca retikuloendotelial sistem üzerinde yapılan araştırmalarda da birçok fonksiyona sahip makrofajların özellikle yangısal etkinlikleri ile ilgili fagositoz özelliğini artırdığı ileri sürülmektedir (12, 21). Dietilstilbestrol'ün farmakolojik dozlarının *S. typhimurium* ve *L. monocytogenes* ile infekte farelerde ise makrofaj aktivitesini baskılayarak immunosüpressif bir etkiye neden olduğu ve konakçı duyarlılığını artırdığı saptanmıştır (22, 23). Buna karşın dietilstilbestrol'e kimyasal yapı ve biyolojik aktivite yönünden benzer fakat daha düşük östrojenik etki gücüne sahip olan zeranol gibi

resorsilik asidin laktonlu (RAL) türevlerinin *S. typhimurium* infeksiyonlarına bağlı mortalite oranını değiştirmede bulunmuştur. Bu etki farklılığının östrojenik aktiviteden bağımsız olarak şekillendiği ileri sürülmekte (22) ve zeranolün makrofajları aktive etme özelliğinin dietilstilbestrol kadar güçlü olmasına rağmen östrodiolün 1/5'i oranında östrojen reseptörlerine bağlandığı bildirilmektedir (12). Tüm bu araştırmalara karşın dietilstilbestrol'ün molar konsantrasyonlarına eş düzeylerde RAL türevlerinin makrofajlar üzerinde aynı etkiye yol açtığı yönünde görüşler bulunmaktadır (24).

Bu çalışmada zeranol'ün spesifik olmayan immün sistemi etkilediği ve infeksiyonlara karşı konakçı savunmasında etkin unsurlar olarak kabul edilen fagositik hücrelerin aktivitesini doza bağlı olarak arttırdığı saptandı. Lökositlerin maya hücrelerini fagosite etme yeteneğinin zeranolün 5, 10 ve 20 ppm'lik dozlarıyla önemli düzeyde uyarılması deri, mukoza ve yüzeysel yaralar aracılığıyla organizmaya giren bakteri, virüs ve mantar gibi balık patojenlerine karşı lökosit aktivitesini artırabileceğinin göstergesidir. Fagositozis memelilerde olduğu gibi balıklarda da kemotaksis, opsonizasyon, endositozis, degranülasyon ve bakterisit aktiviteden oluşmaktadır. Bu olaylar dizisinin en önemli aşaması olarak bilinen bakterisit aktivite, uyarılan lökositlerde NADPH ve SOD ile katalize edilen enzimatik reaksiyonlar sonucu şekillenen reaktif oksijen ürünler (O_2^- , H_2O_2) aracılığıyla gerçekleşir (25, 26, 27). NBT indirgenmesiyle saptanan intraselüler süperoksit radikallerin düzeyleri zeranol'ün 10 ve 20 ppm dozları ile önemli oranda yükselmesine rağmen ekstraselüler radikallerin üretiminin 5, 10 ve 20 ppm ile belirgin bir artış gösterdiği saptandı. Reaktif oksijen ürünlerinin düzeyindeki bu artışlar mikroorganizmalara karşı toksik etkinin göstergesi olarak kabul edilmekte ve zeranol'ün 5 ppm'lik dozu ile de ekstraselüler bir etki elde edilmesi, genel kanıya (27) uygun olarak intraselüler mikroorganizmalara karşı

bakterisit aktivitenin daha düşük olduğunu destekler niteliktedir. Bu çalışmada incelenen parametrelerden total serum proteini spesifik olmayan immün sistemin humoral unsuru olarak kabul edilmektedir (16). Balıklarda fagositozisin humoral faktörler ile uyarılması yönünde bir etkileşimin varlığı (14) bilinmesine rağmen zeranol uygulanması ile total serum protein değerlerinde önemli olmayan artışlar elde edilmesi, humoral immünite üzerindeki etkinin dolaylı bir bulgusu olabilir. Zeranol'ün immün sisteme yönelik bu etkileri balık lökositlerinde östrojen reseptörlerinin bulunması ve bileşiğın memelilere oranla daha düşük bağlanma affinitesine (östrodiolün 1/150 ve 1/300'ü oranında) sahip oluşundan kaynaklanabilir (28). Ayrıca immün sistem ile etkileşim, anabolizan etkiye neden olan büyüme hormonu salgılanmasındaki artışın dolaylı bir sonucu olarak da gerçekleşebilir. Bilindiği gibi büyüme hormonu gelişim ve metabolizma üzerindeki etkilerinin yanısıra balıklarda ortama adaptasyonu kolaylaştıran osmoregülatör bir aktiviteye ve gonadal steroidogenesisi uyarıcı özelliğe sahiptir. Alabalıklarda yapılan araştırmalarda büyüme hormonunun makrofajların aktivitesini ve T hücre fonksiyonlarını artırarak infeksiyon etkenlerine karşı etkin rol oynadığı saptanmış ve benzeri bulgular sonucunda bu hormon immunomodülatör etkiye sahip terapötik bir ajan olarak tanımlanmıştır (29).

Sonuç olarak balıklarda zeranolün yemlerle verilmesiyle boy ve ağırlık artışı sağlanarak doza bağlı anabolik etki elde edildi. Bunun yanısıra lökositlerin fagositozis ve bakterisit aktivitesini artırarak spesifik olmayan immün sistemi uyardığı saptandı. Zeranolün kültür balığı yetiştiriciliğinde patojen mikroorganizmalara karşı koruyucu bir işlev görebileceği ve yetiştiriciliğın ilk döneminde spesifik immünitenin henüz gelişmemesinden kaynaklanan yüksek mortalite oranını düşüreceği kanısındayız.

Kaynaklar

1. Okumus, I., Düzgün, E., Çelikkale, M.S.: Development Present Status and Future Trends of Aquaculture in Turkey. World Aquaculture Society, 2000; May 2-6. Nice, France.
2. Lone, K.P., Ince, B.W.: Cellular Growth Responses of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Fed Different Levels of Dietary Protein, and an Anabolic Steroid Ethylestrenol. Gen. Comp. Endocr., 1983; 49, 32-49.
3. Habibi, H.R., Ince, B. W.: Effects of Steroids and Sex Reversal on Intestinal Absorption of L - (^{14}C) Leucine *in vivo*, in Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. Gen. Comp. Endocr., 1983; 52, 438-444.
4. Ince, B.W., Lone, K.P., Matty, A.J.: Effect of Dietary Protein Level, and an Anabolic Steroid, Ethylestrenol, on the Growth, Food Conversion Efficiency and Protein Efficiency Ratio of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). Br. J. Nutr., 1982; 47, 615-624.

5. Harris, J., Bird, D. J.: Modulation of fish immune system by hormones. *Vet. Immunol. Immunoproph.*, 2000; 77, 163-176.
6. Sakai, M., Kajita, Y., Kobayashi, M., Kawauchi, H.: Immunostimulating effect of growth hormone: In vivo administration of growth hormone in rainbow trout enhances resistance to *Vibrio anguillarum* infection. *Vet. Immunol. Immunoproph.*, 1997; 57, 147-152.
7. Munday, B.L., Crawford, B.J., Ebert, M.A.: Does Trenbolone Acetate have Potential as a Prophylactic Against Superficial Infections of Fish. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 1996; 16, (4): 122-124.
8. Ciuchini, F., Macri, A., Mantovani, Al.: The Effect of Zeranol, an Anabolic Agent, on the Serum Immunoglobulins of Rabbits Immunized with B.19 Brucellosis Vaccine. *Vet. Res. Commun.*, 1988; 12, 433-439.
9. Şener, S.: Anabolik Ajanlar. Türkiye'de Veteriner İlaçları Üretimi, Pazarlaması, Güvenli Kullanımı ve Kalıntı Sorunları Sempozyumu, 13-14 Ekim, Ankara, 1994; 62-75.
10. Cooray, R.: Effects of some mycotoxins on mitogen-induced blastogenesis and SCE frequency in human lymphocytes. *Food Chem. Toxicol.*, 1994; 22, 529-534.
11. Kelley, K.W.: Immune responses and plasma hormone concentrations in cold-exposed, xeranol-implanted calves. *Am. J. Vet. Res.*, 1984; 45, (12): 2617-2621.
12. Luster, M.I., Hayes, H.T., Korach, K., Tucker, A.N., Dean, J.H., Greenlee, W.F., Boorman, G.A.: Estrogen Immunosuppression is Regulated Through Estrogenic Responses in the Thymus. *J. Immunol.*, 1984; 133, (1): 110-115.
13. Luster, M.I., Pfeifer, R.W., Tucker, A.N.: The Immunotoxicity of Natural and Environmental Estrogens. *Immunotoxicology and Immunopharmacology*, Raven Press, New York, eds. Dean, J.H., Luster, M.I., Munson, A.E., Amos, H., 315-326, 1985.
14. Hutchinson, T.H., Manning, M.J.: Effect of In Vivo Cadmium Exposure on the Respiratory Burst of Marine Fish (*Limanda limanda* L.) Phagocytes. *Mar. Environ. Res.*, 1996; 41, (4): 327-342.
15. Priede, I.G., Secomber, C.J.: The biology of fish production. In: Laird, L.M., Needhan, T. *Salmon and Trout Farming*. Ellis Horwood Ltd., England, 1988.
16. Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Z., Anderson, D.P.: Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, 1997; 154, 1-15.
17. Seely, K.R., Gillespie, P.D., Weeks, B.A.: A simple technique for the rapid spectrophotometric determination of phagocytosis by fish macrophages. *Mar. Environ. Res.*, 1990; 30, 1-5.
18. Graph PAD InStat, Copright C: Graphpad Software, Version 1,15 Dept. Animal Health, RVC B10023, 1990.
19. Kaya, S., Piriñçi, İ.: Gelişmeyi Hızlandırıcılar ve Yem Katkı Maddeleri. Alınmıştır: Veteriner Uygulamalı Farmakoloji, Medisan Yayınevi, Ankara, Edt. Kaya, S., Piriñçi, İ., Bilgili, A., 259-271, 1997, Seri No: 28.
20. Aksoy, A.: Zeranol ve Nandrolon'un (19- Nortestesteron Hekzafenilpropionat) Akkaraman Irkı Erkek Kuzularda Canlı ağırlık Artışı, FSH, LH, Total Testesteron ve Bazı Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkileri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Van, 1996.
21. Kalland T.: Immunotoxicity of Diethylstilbestrol in Man. *Immunotoxicology and Immunopharmacology*, Raven Press, New York, eds. Dean, J.H., Luster, M.I., Munson, A.E., Amos, H., 407-414, 1985.
22. Edwards, C. K., Jacobs, M. J., Myers-Keith P., Yunger, L.M.: Murine macrophage activation with resorcylic acid lactones (RALs): comparison with diethylstilbestrol and 17 β - estradiol. *Immunopharmacology*, 1989; 17, 107-118.
23. Dean, J.H., Lauer, L.D., Murray, M.J., Luster, M. I., Neptun, D., Adams, D.O.: Functions of Mononuclear Phagocytes in Mice Exposed to Diethylstilbestrol: A Model of Aberrant Macrophage Development. *Cell. Immunol.*, 1986; 102, 315-322.
24. Luster, M.I., Boorman, G.A., Hayes, H.T., Dean, J.H., Hong, L., Pfeifer, R., Korach, K.S., Rhodes, L.: Environmental estrogens and their effects on immune responses. *Immunotoxicology*, Springer-Verlang, Berlin, ed. Mullen, P.M., 37, 984.
25. Chung, S., Secombes, C.J.: Activation of rainbow trout macrophages. *J. Fish Biol.*, 1987; 31, 51-56.
26. Chung, S., Secombes, C.J.: Analysis of Events Occuring within Teleost Macrophages during the Respiratory Burst. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1998; 89B, (3): 539-544.
27. Johnston, R. B., Godzik, C.A., Cohn, Z.A.: Increased Superoxide Anion Production by Immunologically Activated and Chemically Elicited Macrophages. *J. Exp. Med.*, 1978; 148, (1): 115-127.
28. Arukwe, A., Grotmol, T., Haugen, TB., Knudsen, FR., Goksoyr, A.: Fish model for assessing the in vivo estrogenic potency of the mycotoxin zearalenone and its metabolites. *Sci. Total Environ.*, 1999; 236, (1-3): 153-161.
29. Murphy, W.J., Longo, D.L.: Growth hormone as an immunomodulating therapeutic agent. *Immunol. Today*, 2000; 21, (5): 211-215.