

Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Bazı İmmunostimulan'ların Spesifik Olmayan Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkisi*

Süheyla KARATAŞ DÜĞENÇİ, Akın CANDAN

İstanbul Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, Balık Hastalıkları Anabilim Dalı, Beyazıt, İstanbul – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 14.11.2001

Özet: Bu çalışmanın amacı, farklı oranlarda β -glukan (MacroGard), *Schizosaccharomyces pombe*, *S. pombe* P450 içeren yemlerle beslenmenin gökkuşluğu alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) spesifik olmayan savunma mekanizması üzerine etkisini belirlemektir. Bu amaçla balıklar, % 0,1 ve % 1 oranlarında MacroGard, % 0,1 ve % 1 oranlarında *S. pombe*, % 0,1 ve % 1 oranlarında *S. pombe* P450 içeren yemler ile üç hafta boyunca beslenmiştir. Beslemeden sonra fagositoz, intraselüler ve ekstraselüler respiratory burst ve plazma toplam protein miktarı, spesifik büyüme oranı, kondüsyon faktörü değerleri hesaplanmıştır. Üç farklı immunostimulan ile üç hafta besleme sonunda, ekstraselüler ve intraselüler respiratory burst ve fagositik aktivitenin, % 1 MacroGard ve % 0,1 *S. pombe* P450 ilave edilmiş yemler ile beslenen gökkuşluğu alabalıklarında, kontrol grubuna ve diğer gruplara oranla önemli ölçüde yüksek olduğu görülmüştür ($P < 0,05$). Bütün gruplarda kontrol grubuna oranla yüksek respiratory burst aktivitesi görülmüştür. Fagositik aktivite % 0,1 MacroGard ile beslenen grup dışında kontrol grubuna oranla yüksek olarak kaydedilmiştir ($P < 0,05$). Plazma toplam protein miktarı bütün gruplarda kontrol grubuna oranla yüksek çıkmasına rağmen istatistiksel olarak bir farklılığa rastlanmamıştır ($P < 0,05$). Sonuç olarak, deneysel koşullarda farklı dozlarda MacroGard, *S. pombe* ve *S. pombe* P450 ilave edilmiş yemler ile beslenen gökkuşluğu alabalıklarının intraselüler ve ekstraselüler respiratory burst aktivitesi ve fagositoz gibi spesifik olmayan bağışıklık sistem parametrelerini artırdığı, ancak plazma protein miktarı üzerine % 1 MacroGard ve % 0,1 *S. pombe* P450 ile beslenen gruplar dışında etkili olmadığı görülmüştür. *S. pombe* P450 ticari bir ürün olan MacroGard kadar iyi spesifik olmayan bağışık yanıt oluşturduğu görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Gökkuşluğu alabalığı, spesifik olmayan bağışıklık sistemi, immunostimulan

The Effect of Some Immunostimulants on the Non-Specific Immune System of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum)

Abstract: The aim of this study was to determine the effect on non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of β -glucan (MacroGard), *Schizosaccharomyces pombe* and *S. pombe* P450. Over a period of 3 weeks, fish were given 0.1% and 1% MacroGard, 0.1% and 1% *S. pombe*, 0.1% and 1 % *S. pombe* P450 in their food. Then phagocytosis, intracellular and extracellular respiratory burst activity, total protein, and specific growth ratio and condition factor values were determined. After feeding for 3 weeks with three different immunostimulants, extracellular and intracellular respiratory burst and phagocytic activity were significantly increased in the groups fed 1% MacroGard and 0.1% *S. pombe* P450 compared with the control group and the other experimental groups ($P < 0.05$). Respiratory burst activity was higher in all the experimental groups than in the control group. Phagocytic activity was elevated in all the experimental groups except that fed 0.1 % MacroGard ($P < 0.05$). Total protein levels were higher in all the experimental groups than in the control group, but the difference was not significant ($P < 0.05$). The results indicate that rainbow trout fed different doses of MacroGard, *S. pombe* and *S. pombe* P450 all showed increased intracellular and extracellular respiratory burst activity, and phagocytic activity. However, there was no effect on total protein. In conclusion, *S. pombe* P450 could confer the same non-specific immunity as MacroGard.

Key Words: Rainbow trout, non-specific immune system, immunostimulants

* Süheyla KARATAŞ DÜĞENÇİ'ye ait Doktora tezinin bir bölümünden özetlenmiş olan bu çalışma T-763/251099 No'lu proje ile İstanbul Üniversitesi, Araştırma Fonu Tarafından Desteklenmiştir.

Giriş

Kültür balıkçılığında larval dönemde meydana gelen hastalıklar üretim süresince oluşan ekonomik kayıpların en önemli bölümünü oluşturmaktadır. Bu dönemdeki kayıpları azaltabilmek için kemoterapötikler kullanılmaktadır. İlaçların uygunsuz ve kontrolsüz kullanımı dirençli bakterilerin ortaya çıkışına ve giderek kullanılabilir, etkili antibiyotik sayısının azalmasına neden olmaktadır. Aşıların kullanımı bakteriyel balık hastalıklarından korunmak için oldukça etkili bir yöntemdir, günümüzde vibriosis, furunkulozis ve yersiniozis gibi hastalıklara karşı etkili aşilar ticari olarak üretilmiştir. Ancak hala viral ve bazı bakteriyel hastalıklara karşı etkili aşilar geliştirilememiştir. Bütün bu nedenlerden dolayı başka kontrol metotlarına da ihtiyaç olduğu açıktır (1-3).

Son yıllarda hastalıklara karşı dirençli bireyler elde etmek ve balıkların bağışıklık sistemlerini aktif hale geçirmek için biyolojik ve sentetik maddelerden oluşan immunostimulanlar kullanılmaya başlanmıştır (1,2). Gerek insan gerekse veteriner hekimlikte immunostimulant ve immunomodulatör en uygun immunoterapötik olarak düşünülmektedir (3,4). İmmunostimulanlar, tek başlarına verildiklerinde spesifik olmayan bağışıklık sistemini veya bir antijen ile birlikte verildiğinde spesifik bağışıklık sistemini uyaran ajanlar olarak tanımlanmıştır (2,5).

Kültür balıkçılığında immunostimulanların kullanımı ile balıkların çeşitli bakteriyel, viral ve paraziter hastalıklara karşı direnç kazandıkları, larval dönemde fırsatçı patojenler yüzünden meydana gelen mortalitenin azaldığı, antimikrobiyal maddelerin etkilerinde ve büyümede artış görüldüğü ve stresin olumsuz etkilerinin azaldığı bildirilmiştir (3,6-9).

Günümüzde karada, denizde ve havada olmak üzere çok geniş bir dağılım gösteren mayaların 700'den fazla türü bulunmaktadır. Kolay ve bol miktarda üretilmelerini, memeli hücrelerine benzerlikleri gibi özelliklerinden dolayı biomedikal ve temel biyolojik araştırmalarında, hastalıklara karşı koruyucu olarak, fermentasyon endüstrisi, çevre teknolojisi, gıda ve kimya endüstrisi gibi alanların ilgi odağı olmuştur. Maya hücre duvarını meydana getiren ana unsur polisakkaridlerdir ve bu polisakkaridlerde glukanlar, mannopteinler ve kitindir. β -glukan ve kitin'in balıklar ve memeliler için güçlü bir immunostimulan olduğu bilinmektedir (1,2,4,8,10-16).

İmmunostimulan olarak kullanılan pekçok madde bildirilmiştir. Ancak günümüzde bu maddelerin bir çoğu zor elde edilmesi, oral olarak uygulanamaması, pahalı olması gibi nedenlerden dolayı kullanılmamaktadır. Çok sayıda immunostimulanın (levamisol, β -glukan, lipopolisakkarid, kitin, FK 565, vitamin, hormonlar) alabalık, atlantik salmonu, sazan, levrek, yayın, kalkan ve çipura balıklarının bağışıklık sistemini aktive ettiği bildirilmiştir (13,14,16-19).

İmmunostimulanların enjeksiyon şeklinde balıklara uygulanması en etkili metot gibi görünmektedir (1,14,20,21). Ancak enjeksiyon şeklinde uygulama balıklarda strese neden olur ve pratik değildir. Bu nedenle oral olarak immunostimulanların kullanımı ile ilgili çalışmalara ihtiyaç vardır.

Maya hücre duvarından elde edilen ürünler ile ilgili çok fazla çalışma bulunmasına rağmen ham maya hücreleri ile ilgili çalışmalar oldukça azdır. Bununla birlikte farklı tipte maya hücreleri kültür balıkçılığında protein kaynağı olarak yem içerisinde kullanılmaktadır (22). *Lentinus edode*'den elde edilen Lentinan, *Sclerontium glukanum*'dan elde edilen scleroglukan, *Schizophyllum commune*'den elde edilen Schizophyllan, *Saccharomyces cerevisiae*'den elde edilen MacroGard ve bunların ticari ürünleri balıklarda immunomodulatör aktivitesi çalışılmış glukanlardır (4,6,12,14,18,23). Bundan başka bazı araştırmacılar liyofilize edilmiş maya hücrelerini (*Saccharomyces cerevisiae*) gökkuşuğu alabalıklarına oral olarak vererek immunostimulan aktiviteyi incelemişlerdir (13,24). Üniversitemiz Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında detaylı olarak çalışılan *Schizosaccharomyces pombe*'nin immunostimulan aktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

İmmunostimulanların spesifik bağışıklık mekanizmasından çok spesifik olmayan bağışıklık mekanizmasını aktive ettiği bildirilmiştir. Farklı tip immunostimulanların (β -glukanlar, liyofilize maya hücreleri, kitin, levamisol, hormonlar, lipopolisakkaridler) balıklara oral, immersiyon veya enjeksiyon şeklinde uygulanması ile spesifik olmayan savunma mekanizmasının önemli unsurları olan fagositozis, respiratory burst ve serum lizozim miktarlarında artış görülmüştür (7,11-14,17-19,24-26). Bu maddelerin etki mekanizmaları hakkında detaylı bilgi olmamasına rağmen β -glukanlar için Atlantik salmon makrofajları üzerinde spesifik bir reseptörün varlığı bildirilmiştir (27).

Fagositoz, tüm hayvanlarda spesifik olmayan savunma sisteminin en önemli parçasıdır. Konak tarafından tanınmayan antijenik karakterdeki tüm partiküller fagositik hücreler tarafından hücre içine alınarak sistemden elimine edilir. Balıklar memeli fagositlerinin respiratory burst aktivitesine benzer bir cevap oluştururlar. Bu mekanizma reaktif oksijen ile fagosite edilen materyalin intraselüler olarak öldürülmesidir. Respiratory burst'den ilk salınan ürün O_2 'dir, bu nedenle O_2 'nin doğru bir şekilde ölçülmesi respiratory burst'ün gücünü belirlemede önemli bir kriterdir. O_2 'nin ölçülmesinde iki metod kullanılmaktadır; bu metodlardan ferriksitokrom C'nin indirgenmesi metodu ekstraselüler O_2 'ni ortaya çıkarır. Diğer metod ise redoks boya nitroblue tetrazolium (NBT)'un indirgenmesi ile, intraselüler O_2 'ni ortaya çıkarır. Fagositoz olayı kemotaksis denilen fagositoz yapan hücrelerin yabancı maddeler tarafından uyarılması ve o bölgeye göçleri ile başlar. Fagositler, mikroorganizmaya tutunarak hücre içine alır ve sindirirler. Mikroorganizmanın içe alındıktan sonra öldürülmesi oksijenli ve oksijensiz olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Fagositoz başladığı zaman, oksidatif burst olarak isimlendirilen, fagositik hücreler tarafından moleküler oksijen tüketimi önemli ölçüde artar (28,29). Muramyl di peptid, lipopolisakaridler, glukon, kitin, levamisole, FK 565, vitaminler, yağlar, büyüme hormonu ve sitokinler gibi maddelerin balıklarda fagositozu aktive ettiği bildirilmiştir (25,26,30,31).

Plazma toplam protein miktarı, spesifik olmayan savunma mekanizmasının ölçülebilen humoral bileşikleridir (8,28).

Bu çalışmada, farklı dozlarda *Saccharomyces cerevisiae*'nin hücre duvarından elde edilen bir preparat olan MacroGard, ham maya hücresi (*Schizosaccharomyces pombe*) ve çeşitli ilaç, kansorejen ve çevre kirleticileri gibi substratları oksidasyona uğratabilen P450 3A4 geni transforme edilmiş *S. pombe* ile beslenmenin gökkuşağı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) spesifik olmayan savunma mekanizmaları üzerine etkileri incelenmiştir.

Materyal ve Metot

Deney Balıkları ve Deney Koşulları

Araştırmada, ortalama 54 g ağırlığında 350 adet gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Sapanca İçsu Ürünleri Üretimi Araştırma ve Uygulama Biriminden alınarak

kullanıldı. Balıklar birimin kuluçkahanesinde bulunan 1,74 m³ su hacminde yuvarlak fiberglas tanklarda tutuldu. Su sıcaklığı 11-12 °C olacak şekilde ayarlandı. Deney süresince herhangi bir ışık kaynağı kullanılmadı. Balıklar, her grupta 50'şer adet olacak şekilde biri kontrol olmak üzere 7 gruba ayrıldı. Bir hafta adaptasyonun sağlanması amacıyla ticari balık yemleri ve 21 gün vücut ağırlıklarının % 2'si oranında hazırlanmış yemlerle beslendi.

Schizosaccharomyces pombe'nin Üretilmesi

Daha önceden üretilip dondurulmuş olan örnek, maya ekstreli besi ortamında 30 °C'de 2 gün üretildi. Daha sonra içinde agar bulunmayan maya ekstreli sıvı besi ortamına ekimleri yapılarak 48 saat çalkalanmak sureti ile etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 4000 g'de 8 dakika +4 °C'de soğutmalı santrifüjde hücreler toplandı. Üst sıvı atıldı ve sediment tekrar sıvı ortamla süspansiyon hale getirildi. -20 °C'de dondurularak, liyofilize edildi.

Yemlerin Hazırlanması

Araştırmada kullanılan yemler Pınar Yem Sanayi ve Pazarlama A.Ş.'den elde edildi. Üç numaralı pelet yem kullanıldı. Yem'in özellikleri Tablo 1'de verildi. Kullanılan immunostimulanlardan MacroGard, Biotec (Mackzymal, Norveç) firmasından, *Schizosaccharomyces pombe* ura4-D18 ve P450 3A4 geni transforme edilmiş *Schizosaccharomyces pombe* İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalından temin edildi.

Pelet halde bulunan yemler bir öğütücü vasıtasıyla toz hale getirildi. Daha sonra önceden hazırlanmış olan maddeler yeme ilave edilerek, 20 dakika karıştırıldı ve uygun boyda pelet hale getirilerek 40 °C etüvde kurumaya bırakıldı. Kuruyan yemler kullanıncaya kadar cam kavanozlarda buzdolabında + 4 °C'de saklandı.

İmmunostimulan olarak kullanılacak maddeler % 0 (kontrol), 0,1 ve 1 oranında yeme ilave edildi.

Balıkların Boy ve Ağırlık Ölçümleri

Çalışmanın 1. ve 21. günlerinde Benzokain ile bayıltılan balıkların bireysel boy ve ağırlık ölçümleri alındı. Elde edilen veriler doğrultusunda 0-21 günlük dönem süresince grupların spesifik büyüme oranı, $SGR = (\ln W_t - \ln W_0) / 21 \times 100$, ($SGR =$ Spesifik büyüme oranı, $W_t =$ Son ağırlık, $W_0 =$ İlk ağırlık) ve 0 ve 21. günlerdeki kondüsyon faktörleri, $K = (W/L^3) \times 100$ ($K =$ Kondüsyon faktörü, $W =$ Canlı ağırlık, $L =$ Uzunluk) formülü esas alınarak hesaplandı (32).

Tablo 1. Deney sırasında kullanılan yemin özellikleri (Pınar alabalık yemi, Pelet No:3).

Temel Besin Değerleri	
Kuru madde (min)%	88,0
Ham protein (min)%	45,0
Ham selüloz (Max)%	3,0
Ham kül (Max)%	14,0
Kalsiyum (Min)%	2,0
Fosfor (Min)%	1,3
Ham yağ (Min)%	10,0
Vitaminler (Min/kg)	
A IU	18,000
D3 IU	2,000
E IU	200
C mg	150
B1 mg	20
B2 mg	30
Pantotenik asit mg	10
Pyridoxine mg	20
B12 mg	0,05
K mg	12
Niacin mg	220
Biotin mg	0,5
Folic asit mg	5
Inositol mg	210
Kolin mg	2,000
İz Elementler (Min/kg)	
Çinko mg	70
Manganez mg	60
Magnezyum mg	60
Demir mg	4
İyot mg	1,5
Bakır mg	2
Kobalt mg	0,5
Selenyum mg	0,05

İmmun Parametreler

Çalışmanın 22. gününde anestezi işleminden sonra heparinli enjektörler ile kaudal venadan 1cc kan örneği alındı. Alınan kandan lökosit izolasyonu yapıldı. Hemaglutinasyon tampon çözeltisi içeren Histopaque 1.119 ve 1.077 ile tabaka oluşturacak şekilde silikonlu tüplere ilave edildi. Tüm örnekler 500 g'de 15 dakika santrifüj edilerek lökositler özenle ayrıldı ve Hanks'Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma H 1387) ile iki kez yıkandı. Hücreler 2×10^6 hücre/ml olacak şekilde sayılarak ayarlandı (33,34).

Fagositik hücrelerin aktivitesi iki şekilde ölçüldü. Ekstraselüler süperoksit radikalleri ile Sitokrom C'nin indirgenmesi ve phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA,

Sigma P 8139) ile uyarılmış lökositlerce üretilen intraselüler süperoksit radikaller tarafından nitroblue tetrazolium'un (NBT, Sigma 840 A) indirgenmesi prensibine göre yapıldı. Bu amaçla 100 ml lökosit süspansiyonundan alındı ve üzerine eşit miktarda PMA (1 mg/ml) içeren ve HBSS'de hazırlanmış sitokrom C'den (Sigma C 0761) (2 mg/l) ilave edildi. Bu kimyasalları aynı düzeyde içeren diğer bir tüpe ise reaksiyonu katalize etmek amacıyla süperoksit dismutaz (SOD, Sigma 2515, 300 U/ml) solusyonu katıldı. Her iki karışım, 15 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletildikten sonra 550 nm'de sitokrom C körüne karşı spektrofotometrede okundu. Elde edilen absorbans değerlerinin farkının 15,87 ile çarpılması sonucu 10^5 lökosit için nmol O_2 -değeri belirlendi (33).

İntraselüler süperoksit radikal üretimini saptamak amacıyla nitroblue tetrazolium (NBT) PMA (1 mg/ml), SOD (300 U/ml) içeren fosfat tampon çözeltisinde % 0,2 oranında çözündürülerek lökosit çözeltisi ile eşit hacimde (100 µl) karıştırıldı. Elde edilen karışım düzenli olarak karıştırılarak 60 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 500 g'de üç dakika santrifüj edildi. Ayrılan hücreler % 70'lik metanol ile iki kez yıkanarak Dimetil sülfoksit (DMSO Sigma D 8776) (140 µl) ile 2 M KOH (120 µl) karışımında çözündürüldü ve 620 nm KOH/DMSO körüne karşı spektrofotometrede okundu (33).

Fagositozis deneyi kongo kırmızısı ile boyanmış maya hücrelerinin lökositler tarafından fagosite edilen düzeylerinin spektrofotometrik ölçümü prensibine dayanır. 250 µl lökosit solusyonu, otoklavlanmış ve kongo kırmızısı ile boyanmış 500 µl maya hücre süspansiyonu ile karıştırıldı (maya hücresi/lökosit sayısı 40/1 oranında). Oda sıcaklığında 60 dakika süre ile inkübe edildikten sonra karışımın üzerine 1'er ml HBSS ve Histopaque 1.077 (Sigma) ilave edildi. Maya hücrelerinden lökositleri ayırmak için örnekler 850 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen lökositler HBSS'de yıkandı ve 1ml tripsin-EDTA solusyonu (tripsin Sigma T 7418, EDTA, Sigma E 5134) (5.0 g/l tripsin ve 2.0 g/l EDTA) ile karıştırılarak 37 °C'de 12 saat süresince bekletildi, tripsin-EDTA körüne karşı spektrofotometrede (510 nm) okundu (35).

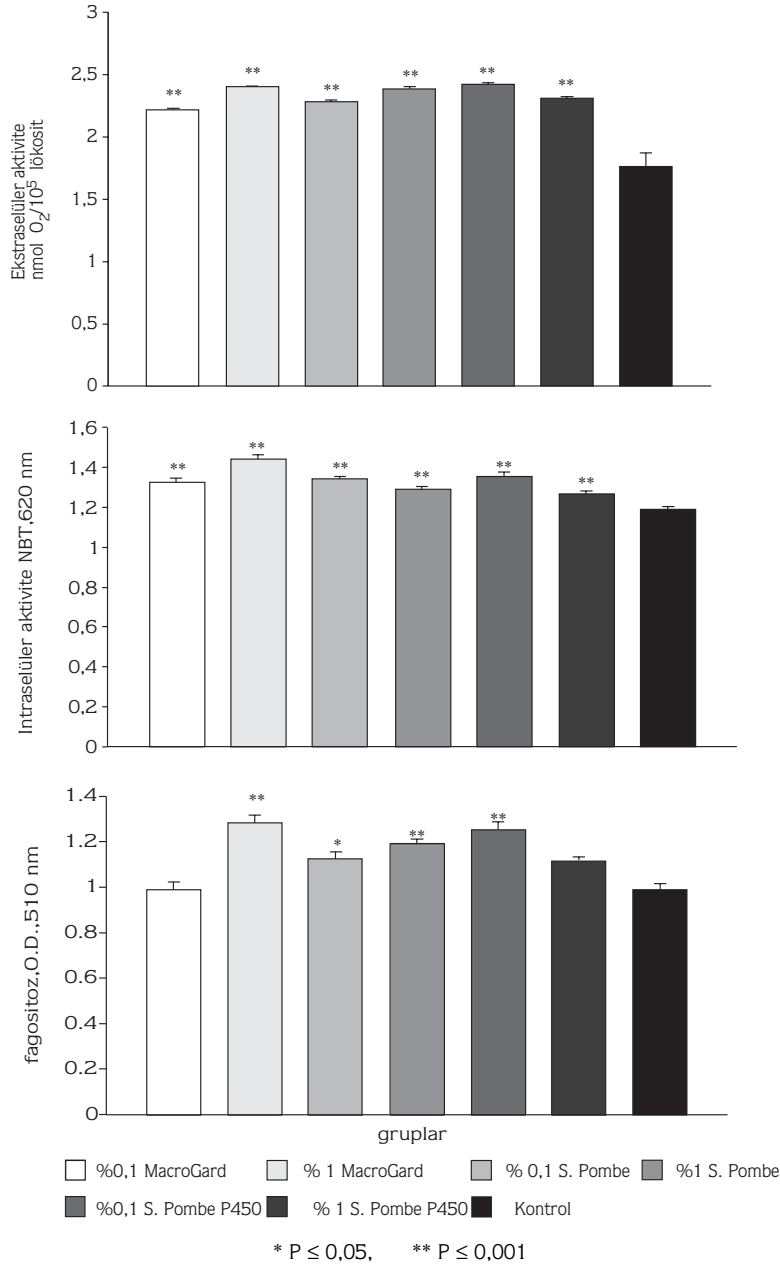
Çalışmanın 22. gününde anesteziye alınan balıkların dorsal aortalarından 1 cc kan alınarak protein düzeyinin belirlenmesi amacıyla plazmaları ayrıldı. Kan örneklerinin total plazma protein düzeyleri, ticari kitler kullanılarak Lowry yöntemiyle saptandı (Sigma P5656) (8).

İstatiksel Analizler

Bütün deneyler iki kez tekrarlandı ve her deney grubu için (n = 15) ortalama+SE hesaplandı. Çalışmada kullanılan tüm yöntemlerde sonuçlar, varyans analizleri ve Duncan testi SPSS for Windows Release 7.5 bilgisayar programı ile istatiki olarak değerlendirildi. Farklar $P \leq 0,05$ ve $P \leq 0.001$ düzeyinde istatiksel olarak önemli kabul edildi.

Bulgular

Spesifik olmayan bağışıklık sistemi üzerine kullanılan immunostimulanların etkisini belirlemek amacı ile incelenen parametrelerden fagositoz ve ekstraselüler ve intraselüler süperoksit radikal üretimi aktiviteleri ile ilgili veriler Şekil 1'de verildi. Ekstraselüler süperoksit radikal üretimi, kontrol grubuna oranla bütün gruplarda belirgin bir artış gösterdi. Ancak en yüksek ekstraselüler



Şekil1. Fagositoz ve ekstraselüler ve intraselüler süperoksit radikal üretimi.

süperoksit radikal üretiminin % 0,1 *S. pombe* P450 ile beslenen grupta olduğu görüldü ($P < 0,001$). Kullanılan immunostimulanlar arasında % 0,1 ve % 1 MacroGard dışında doza bağlı bir fark olmadığı gözlemlendi ($P < 0,05$). NBT indirgenmesi ve dolayısı ile intraselüler oksidatif radikal üretimi kontrol grubuna oranla bütün gruplarda yüksek olarak bulundu ($P < 0,001$). Veriler incelendiğinde en yüksek NBT indirgenmesinin % 1 MacroGard ile beslenen grupta olduğu saptandı. Kan lökositlerinin fagositik aktivitelerinin, % 0,1 MacroGard ile beslenen grup dışında kontrol grubuna oranla yüksek olduğu belirlendi. En yüksek fagositik aktivitenin ise % 1 MacroGard ile beslenen grupta olduğu saptandı.

Plazma toplam protein miktarının kontrol grubuna oranla yüksek olduğu ancak istatistiksel farklılığın sadece % 1 MacroGard ve % 0,1 *S. pombe* P450 beslenen gruplarda olduğu belirlendi ($P < 0,05$). Plazma protein miktarı ile ilgili veriler Şekil 2'de verildi.

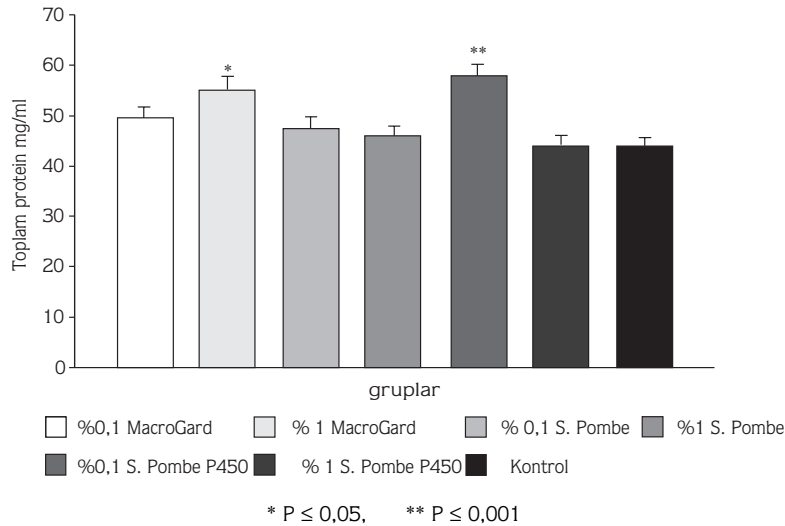
Balıkların spesifik büyüme oranları (SGR) sırası ile 1.214, 1.352, 1.621, 1.492, 1.475, 1.355, 0.869 ve kondüsyon faktörü değerleri ise bütün gruplarda 1'in üzerinde hesaplandı.

Tartışma

Bu çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* hücre duvarından elde edilen ticari bir preparat olan MacroGard, *Schizosaccharomyces pombe* ve çeşitli ilaç, kansorejen ve çevre kirleticileri gibi substratları oksidasyona uğratabilen

P450 3A4 geni transforme edilmiş *Schizosaccharomyces pombe*, gökkuşığı alabalıklarının yemlerine belirli dozlarda ilave edilerek 21 gün süresince balıklara verilmiştir. Bu maddelerin spesifik olmayan savunma mekanizmasının ve infeksiyonlara karşı konak savunmasında etkin bir unsur olarak kabul edilen fagositik hücrelerin aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Lökositlerin maya hücrelerini fagosite etme yeteneğinin, % 0,1 MacroGard ile beslenen grup dışında kontrol grubuna oranla yüksek olduğu belirlenmiştir. En yüksek fagositik aktivitenin ise % 1 MacroGard ve % 0,1 *Schizosaccharomyces pombe* P450 ile beslenen grupta olduğu saptanmıştır. Bu üç madde ile beslenen gruplarda fagositoz oranında meydana gelen artış bu maddelerin balıkların immun sistemini uyardıklarının en iyi göstergesidir. Daha önceki çalışmalarda liyofilize edilmiş maya hücrelerinin oral olarak balıklara verilmesiyle fagositozda önemli bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (13,24). Ortuno ve ark. (24), bu artışın beslenme periyodundan dört hafta sonra maksimum düzeye ulaştığını bildirmişlerdir.

NBT indirgenmesi ile saptanan en yüksek intraselüler ve ekstraselüler süperoksit radikallerin düzeyleri % 1 MacroGard ve % 0,1 *Schizosaccharomyces pombe* P450 ile beslenen grupta belirlenmiştir. Balıklarda spesifik olmayan savunma mekanizmasının önemli unsurlarından olan respiratory burst aktivitesindeki bu artış, balıklar diğer ticari β -glukan preparatları (MacroGard, EcoActiva) ve liyofilize *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* ile beslendiğinde de görülmüştür (13,23,24).



Şekil 2. Plazma toplam protein miktarı değerleri.

Bu çalışmada plazma protein miktarı % 1 MacroGard ve % 0,1 *Schizosaccharomyces pombe* P450 ile beslenen gruplarda yüksek olarak bulunmuştur. Protein miktarı bütün gruplarda kontrol grubuna oranla yüksek çıkmasına rağmen % 1 MacroGard ve % 0,1 *Schizosaccharomyces pombe* P450 beslenen gruplar dışında Siwicki ve ark.'nın (13) bulgularına uygun şekilde kontrol grubu ile aralarında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülmüştür. Çalışmada % 1 MacroGard ve % 0,1 *Schizosaccharomyces pombe* P450 ilave edilmiş yemler ile beslenen gruplarda toplam proteinin istatistiksel olarak farklı çıkması spesifik olmayan bağışıklık sisteminin humoral bileşikleri üzerine sadece bu iki maddenin ve dozun etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

MacroGard ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının diğer immunostimulanlar ile beslenen balıklara oranla spesifik olmayan savunma mekanizmasının en iyi şekilde uyarıldığı görülmüştür. % 0,1 ve % 1 *Schizosaccharomyces pombe*

ile beslenen balıklarda spesifik olmayan bağışıklık sistemi bağışıklık sisteminin ölçülen parametreleri açısından istatistiksel fark bulunmamıştır. % 0,1 *Schizosaccharomyces pombe* P450 ile beslenen balıklardada % 1 MacroGard kadar iyi spesifik olmayan cevap olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, deneysel koşullarda farklı dozlarda MacroGard, *Schizosaccharomyces pombe* ve *Schizosaccharomyces pombe* P450 ilave edilmiş yemler ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının intraselüler ve ekstraselüler respiratory burst aktivitesi ve fagositoz gibi spesifik olmayan bağışıklık sistem parametrelerini artırdığı, ancak plazma protein miktarı üzerine etkisi olmadığı görülmüştür. Ayrıca ticari bir formülasyon olan ve *S. cerevisiae* içeren MacroGard ile bu çalışmada kullanılan ham maya *S. pombe* ve *S. pombe* P450 ile gökkuşağı alabalıklarının spesifik olmayan bağışıklık sistemini aynı oranda uyarabildiği saptanmıştır.

Kaynaklar

1. Sakai, M.: Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 1999; 172: 63-92.
2. Anderson, D.P.: Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: Applications to Aquaculture. *Ann. Rev. Fish Dis.* 1992; 2: 281-307.
3. Vadstein, O.: The use of immunostimulation in marine larviculture: Possibilities and challenges. *Aquaculture*. 1997; 155: 401-417.
4. Robertsen, B., Engstad, R.E., Jørgensen, J.B.: β -Glucans as immunostimulants in fish. In: *Modulators of fish immune responses. Models for environmental toxicology/biomarkers, immuno stimulants*. Vol. 1. Ed. By Stølen, J. SOS Publications, Fair Haven, NJ, USA. pp. 83-99.
5. Van Assche, J.S.: Oral immunostimulation. *Fish Vaccination, Training Course*, Netherlands, 1998; 14-17 April.
6. Yano, T., Mangindan, E.P., Matsuyama, H.: Enhancement of resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by some β -1,3 glucans. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1989; 55: 1815-1819.
7. Robertsen, B., Rørstad, G., Engstad, R., Raa, J.: Enhancement of the non-specific disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Fish Dis.*, 1990, 13: 391-400.
8. Jeney, G., Galeotti, M., Jeney, Z., Anderson, D.P.: Prevention of stress in rainbow trout (*O. mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*. 1997; 154: 1-15.
9. Raa, J.: The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marine, D., Tapia-Salazar, M., Olvera-Novoa, M.A., Civera-Cerecedo, R., (Eds.). *Avances en Nutricion Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutricion Acuicola*. 19-22 Noviembre, 2000. Merida, Yucatan, Mexico, 47-56.
10. Di Luzio, N.: Update on the immunomodulating activities of glucans. *Springer Semin. Immunopathol.*, 1985; 8: 387-400.
11. Engstad, R.E., Robertsen, B.: The effect of structurally different yeast β -glucans on immune responses in Atlantic salmon (*S. salar*). *J. Mar. Biotech.* 1995; 3: 203-207.
12. Engstad, R.E., Robertsen, B., Frivold, E.: Yeast glucan induces increase in lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. *Fish Shellfish Immun.* 1992, 2: 287-297.
13. Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L.: Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994; 41: 125-139.
14. Chen, D., Ainsworth, A.J.: Glucan administration potentiates immune defence mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Dis.* 1992; 15: 295-304.
15. Galeotti, M.: Some aspects of the application of immunostimulants and a critical review of methods. *J. Appl. Ichthyol.* 1998; 14: 189-199.
16. Verlhac, V., Obach, A., Gabaudan, J., Schuep, W., Hole, R.: Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*O. mykiss*). *Fish Shellfish Immun.* 1998; 8: 409-424.

17. Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, G.: The non-specific immune response of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to *Pasteurella piscicida* following bath exposure to levamisole. European Assoc. Fish Pathologists. 1995; Seventh Internat. Conf. Palma de Malorca.
18. Jorgensen, J., Robertsen, B.: Yeast β -glucan stimulates respiratory burst activity of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. Dev. Comp. Immunol. 1995; 19: 43-57.
19. Verlhac, V., Gabaudan, J., Obach, A., Schuep, W., Hole, R.: Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 1996; 143: 123-133.
20. Dugger, D.M.: Bio-modulation of the non-specific immune response in marine shrimp with beta-glucan. Aquacul. Mag., 1999; January/February, 25: 1.
21. Dalmo, R.A., Bogwald, J., Ingebrigtsen, K., Seljelid, R.: The immunomodulatory effect of laminaran [β (1,3)-D-glucan] on Atlantic salmon *Salmo salar* L., anterior kidney leukocytes after intraperitoneal, peroral, and peranal administration. J. Fish Dis., 1996; 19: 449-457.
22. Rumsey, G.L., Winfree, R.A., Hughes, S.G.: Nutritional values of dietary nucleic acids and purine bases to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 1992; 108: 97-110.
23. Cook, M.T., Hayball, P.J., Hutchinson, W., Hutchinson, W., Nowak, B.F., Hayball, J.D.: Administration of a commercial immunostimulant preparation, EcoActiva™ as a feed supplement enhances macrophage respiratory burst and the growth rate of snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider)) in winter. Fish Shellfish Immunol., 2002; 12: 1-13.
24. Ortuno, J., Cuesta, A., Rodriguez, A., Esteban, M.A., Meseguer, J.: Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Vet. Immunol. Immunopathol, 2002; 85: 41-50.
25. Sakai, M., Kobayashi, M., Kawauchi, H.: In vitro activation of fish phagocytic cells by GH, prolactin and somatolactin. J. Endocrinol. 1996; 151: 113-118.
26. Sakai, M., Kobayashi, M., Kawauchi, H.: Enhancement of chemiluminescent responses of phagocytic cells from rainbow trout, *O. mykiss*, by injection of growth hormone. Fish Shellfish Immun. 1995; 5: 375-379.
27. Engstad, R.E., Robertsen, B.: Recognition of yeasts cell wall glucan by Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages. Dev. Comp. Immunol., 1993, 17: 319-330.
28. Yano, T.: The nonspecific immune system: Humoral defense. In: The Fish Immune System. Organism, Pathogen, and Environment. Iwama, G., Nakanishi, T. (eds.), San Diego, Academic Press, 105-156, 1996.
29. Verlhac, V., Gabaudan, J.: The effect of vitamin C on fish health. Vitamins, 1999; 1-29, Roche.
30. Secombes, C.J.: Enhancement of fish phagocyte activity. Fish Shellfish Immun. 1994; 4: 421-436.
31. Solem, S.T., Jørgensen, J.B., Robertsen, B.: Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*S. salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. Fish Shellfish Immun. 1995; 5: 475-491.
32. Priede, I.G., Secombes, C.J.: The biology of fish production. In: Laird, L., Needham, T. Salmon and Trout Farming. Ellis Horwood Ltd., England, 1988.
33. Secombes, C.J.: Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. Techniques in Fish Immunology, Fish Immunology Technical Communications 1. SOS Publications, USA, 137-154, 1990.
34. Çöteliöglü Ü.: Pratik Fizyoloji Ders Notları, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını Ders Notu No: 121, İstanbul, 2000.
35. Seeley, P.D., Gillespie, D., Weeks, B.A.: A simple technique for the rapid spectrophotometric determination of phagocytosis by fish macrophages. Mar. Environ. Res. 1990; 30: 37-41.