

Aynalı Sazanlarda (*Cyprinus Carpio* Linnaeus, 1758) Parazit Enfestasyonlarının Serum Glikoz, Kortizol ve Kan Hemogloblin Düzeylerine Etkileri

*Azime KÜÇÜKGÜL GÜLEÇ¹, Aysel ŞAHAN²

¹Tunceli Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Anabilim Dalı, 62000 Tunceli-Türkiye

²Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Anabilim Dalı,01330 Adana-Türkiye

Yayın Kodu (Article Code): 10-1A

Özet: Bu çalışmada, rengi değişmiş, vücut şekli bozuk, davranışları düzensiz ve iştahsız olan aynalı sazanlar (*Cyprinus carpio* L., 1758), parazitolojik yönden incelenmiş, belirlenen parazitlerin kan hemogloblin, plazma kortizol ve glikoz miktarları üzerine olan etkileri değerlendirildi. Uygulama için 30 adet parazitli ve 30 adet sağlıklı balık kullanılmıştır. Makroskobik olarak saptanan değişiklikler kaydedilmiş, bulunan ektoparazitler toplanarak % 5 formole alınmıştır. Daha sonra laktofenole konularak saydamlaştırılmış, böylece detaylı incelemeleri yapılmıştır. Balıklarda *Argulus* sp (% 20), *Ichthyophthirius multifiliis* (% 33) ve *Dactylogyrus vastator* (% 47) olarak saptanan üç tip parazit saptanmıştır. Parazit ile enfestasyon uygulaması sırasında, makroskobik olarak incelenen balıkların mukus miktarında artış, birtakım davranış bozuklukları ve vücudun farklı bölgelerinde hemorajik odaklar görülmüştür. Elde edilen verilere göre plazma kortizol, glikoz ve kan hemogloblin seviyelerinde önemli artışlar belirlenmiştir. Deneysel amaçlı uygulanan bu stres faktörü, sazanlarda önemli fizyolojik yanıtlar oluştururken, belirtilen stres faktörlerine karşıda istenilen ölçüde cevap alınabilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Cyprinus carpio*, parazit, kortizol, glikoz, hemogloblin

Effects to Plasma Glucose, Cortisol and Haemoglobin Levels of Parasite Infestations in Carp (*Cyprinus Carpio* Linnaeus, 1758)

Abstract: In this study, mirror carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) individuals that discolored, distorted and being erratic and a poor its behaviors, parasitological aspects were examined and the effects on blood hemoglobin, plasma cortisol and glucose, of were assessed. In application, 30 parasited and 30 healthy fish was used. Macroscopically detected changes were recorded founded ectoparasites were collected and taken in 5 % formalin. Then put the transparent lactophenole customized, so that detailed studies are carried out. Individual fish in *Argulus* sp (20 %), *Ichthyophthirius multifiliis* (33 %) and *Dactylogyrus vastator* (47 %) identified as three types of parasites were found. In the application of infestation through parasites, an increase in the mucus amounts of the fish which was investigated through microscope, behavioral abnormalities, and hemorrhagic focuses on different parts of the body were observed. A significant increased was observed in the plasma cortisol, glucose and blood haemoglobin levels. The stressors applied on an experimental basis have lead to important physiological results in *C. carpio* and satisfactory outcomes were obtained concerning the above-mentioned stress factors.

Key words: *Cyprinus carpio*, parasite, cortisol, glucose, hemogloblin

*E-mail: agulec@tunceli.edu.tr

Giriş

Balıklar içinde yaşadıkları ortamla sıkı ilişki içinde olan canlılardır. Bu nedenle suda oluşabilecek küçük değişimler dahi balık tarafından hemen algılanır ve bazen de bir stres kaynağı olabilir. Yetiştiricilik ortamlarındaki bazı zorunlu işlemler (rutin bakım, yemleme, hasat, deneysel ve tedavi amaçlı kullanımlar v.b) stresörlere (stres oluşturan durumlar) örnek olarak verilebilir. Doğadaki yaşam koşullarında stresörler ile karşı karşıya kalan balıklar, kendilerini bu stresörlere karşı savunurlar. Bu savunmayı strese gösterdikleri yanıtlarla belli ederler. Bu durumda stres, biyolojik varlığa fiziksel, kimyasal veya biyolojik bir etki ulaştığında o varlığın kendini korumak için göstermiş olduğu tepkiler bütünlüğü şeklinde ifade edebilir (Cengizler 2000).

Diğer omurgalılarda olduğu gibi, stres altındaki balıklar, fizyolojilerindeki doğal değişiklikler ve stres hormonlarındaki artış ile değişik tipten stres faktörlerine yanıt verirler (Bonga 2003).

Bildirilen tüm çalışmalar, stres süresince ya da sonrasında kan değerlerinin göze çarpar bir şekilde etkilendiğini göstermektedir. Gerek hematolojik gerekse stres belirteçleri olarak kabul edilen hormonlar olası bir stres durumunda canlıdaki fizyolojik, morfolojik ve biyolojik değişimlerin incelenmesinde oldukça önemli rol oynamaktadır (Haond ve ark, 2003, Grutter ve Pankhurst 2000).

Hematolojik incelemeler özellikle beslenme durumu, hastalıklar, parazitler ve çevresel faktörlerin değişmesinden dolayı oluşan durumlarda, yani stres fizyolojisinde yararlı olabilir. Herhangi bir olumsuz durum stres kaynağı olarak algılandığında, canlıda stres reaksiyonu başlar ve sonuçta kanda bulunan hormonlar (adrenalin, kortizol, epinefrin, norepinefrin v.b) ve hematolojik parametrelerin (hemoglobün, hemotokrit, laktat v.b.) seviyeleri yükselir.

Stres hormonlarının salgılanma süresi kısa olursa koruyucu, uzun olursa hastalık yapıcı özellik taşırlar. Hematolojik parametrelerde strese verilen yanıt, oksijen taşımada sıkıntı, eritrositlerin yapılarında bozulma ve karbonhidrat metabolizmasında değişimler ile kandaki seviyelerinin yükselmesi şeklinde kendini gösterir (Stoltze and Buchmann 2001, Barton 2000). Bahsedilen bu stres durumlarında, stresörlerin öncelikle kan bileşenleri üzerine olan etkileri nedeniyle bu parametrelerin stres sonrası ölçümlerinin yapılması, hastalıkların erken teşhisi ve tedavisi açısından büyük önem taşımaktadır.

Materyal ve Metot

Araştırmada 60 adet aynalı sazan kullanıldı. Bunların 30 adedi parazitle enfeste olup deney grubunu, 30'u ise kontrol grubunu oluşturdu. Devlet Su İşleri Genel Müdürlüğü 6. Bölge Su Ürünleri Başmühendisliği yetiştiricilik ünitesinden temin edilen balıklar Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Tatlı Su Balık Üretim İşletme'sine getirildi. Araştırma (1.5x2.5x1m) boyutlarında, %1'lik formalin ile dezenfekte edilmiş 6 adet beton havuzda yürütüldü. Analize alınacak her balıkta boy, ağırlık ölçümleri yapıldı. Deneme süresince havuzlardaki suyun oksijen içeriği, pH'sı ve sıcaklığı belirlendi.

Araştırma süresince havuzlarda su sıcaklığı ortalama 24.2 ± 0.599 °C, pH 7.2 ve çözünmüş oksijen miktarı ise ortalama 5.6 ± 0.429 mg/L olarak ölçüldü. Araştırma havuzlarında fotoperiyot uygulandı (12 saat karanlık:12 saat aydınlık) havalandırma ise, hava taşları ile sağlandı.

Uygulamada rengi değişmiş, vücut şekli bozuk, davranışları düzensiz ve iştahsız olan 30 adet aynalı sazanın (*Cyprinus carpio* L., 1758) parazitolojik muayenesi amacıyla balıklarda iç ve dış parazit taramaları yapıldı. Bu amaçla öncelikle hasta balıkların vücut yüzeyleri ile

solungaçları incelendi. Solungaçlar ile ağız içerisindeki parazitler toplanarak balıktan uzaklaştırılıp % 4'lük formol solüsyonuna alındı (Bullock 1989). Bununla birlikte aynı balık örneklerinin otopsileri yapılarak karaciğer, safra kesesi, bağırsak içeriği, hava kesesi ve böbrekleri incelenip herhangi bir endoparazitin olup olmadığı araştırıldı. Kan parazitlerinin varlığını araştırmak için kalpten kan örneği alınarak frotileri hazırlandı. Daha sonra bu frotiler Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında Giemsa boyama yöntemi ile boyandı (Toparlak ve Tüzer 1994). Sağlık taramasından geçirilen 30 adet balık ise kontrol grubu olarak kullanıldı ve bu balıklar için optimum koşullar sağlandı.

Parazit ile enfeste olan balıklar, gerekli incelemeleri yapıldıktan sonra, kan alımında olası bir stresten kaçınmak için % 25'lik fenoksiethanol kullanılarak anestezi edildi ve kaudal toplardamarlarından 2 ml'lik şırınga yardımıyla her bir balıktan 2-3 ml kan analizin türüne göre EDTA veya normal deney tüplerinde alındı. Hemoglobin (Hb) miktarı analizi için Ç. Ü. Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuvarı kullanıldı. Serum glikoz ve kortizol miktarları analizi için ise kan örnekleri Ç.Ü. Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Biyokimya Laboratuvarına götürülerek -20 °C'de analiz edilinceye kadar bekletildi.

Hemoglobin (Hb) miktarı tayini için Syanmethemoglobin yönteminden faydalandı. EDTA'lı tüplerdeki kan örneklerine önceden hazırlanan drabkin solüsyonundan 5 ml konuldu, üzerine EDTA'lı kanın 0.02 ml'si özel Hb pipeti aracılığı ile ilave edildi (Şahan ve Cengizler 2002). Deney tüpü içindeki kanın, drabkin ile karışım siyanomethemoglobine dönüşmesi için karışım 10 dakika bekletilerek spektrofotometrede incelendi.

540 nm dalga boyunda okunan değer, önceden hazırlanmış standart ile oluşturulmuş skalaya karşılık gelen değer olarak ifade edildi (Blaxhall ve ark. 1973).

Biyokimyasal analizlerde her balıktan alınan kan, antikoagülsüz cam tüplere konularak 15 °C'de, 10 dk. 4000 dev/dk'da santrifüj edildi ve -20 °C'de analiz edilene kadar bekletildi. Total glikoz değeri, kolorometrik (spektrofotometre benzeri yöntem) yöntem ile belirlendi (Burtis ve Ashwood 1999). Plazma örneği, spektrofotometre cihazının çalışma ilkelerine göre işleyen Technicon marka cihazda okundu.

Plazma kortizol seviyesini belirlemek amacıyla ise RIA (radioimmunoassay) tekniğinden faydalandı. Teknik için, (1 vial of ACS: 180 Cortisol lite reagent, 1 vial of ACS: 180 Cortisol Solid Phase) BAYER'den temin edilen kitler kullanıldı (Pankhurst ve Sharples 1992).

İstatistiksel Analizler

Denemede parazit ile enfeste balıklarda hemoglobin, glikoz ve kortizol değerlerindeki değişimler istatistiki açıdan değerlendirildi. Analizlerde, stressiz ve stresli gruplar arasında Bağımsız Örnekler T Testi (Independent-Samples T Test) uygulandı. Stres gruplarının kendi aralarındaki farkların belirlenmesi amacıyla ise DUNCAN Çoklu Aralık Testinden (Duncan Multiple Range Test) faydalandı.

Uygulamalar sonunda, oluşan farklılıklar için önem düzeyleri belirlendi (P<0.05; P>0.05). Sözü edilen tüm istatistiki analizler için SPSS 10.0 Paket Programından yararlanıldı (Hayran ve Özdemir 1995).

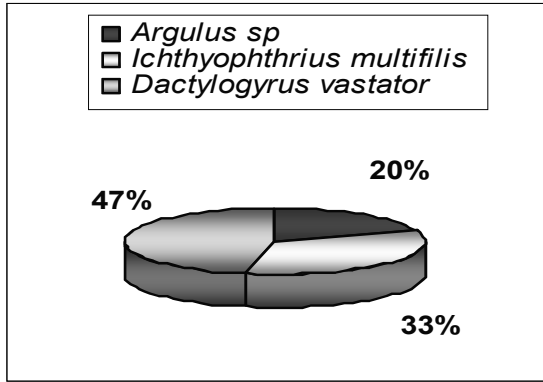
Bulgular

Stres boyunca uygulama havuzlarındaki suyun oksijen içeriği 5.6-6.5 mg/l, sıcaklık

24-28 °C, pH ise 6.35-7.25 arasında değişim gösterdiği belirlendi.

Araştırmada görülen ektoparazit türlerinin konakçının deri ve solungaç dokularına çok nadirde olsa yüzgeç diplerine yerleştiği gözlemlendi. Mikroskop altında elde edilen bulgulara göre *Argulus* sp, *Ichthyophthrius multifilis* ve *Dactylogyrus vastator* olmak üzere üç parazit saptanmış olup bu parazitlerin vücutta bulunma oranları Tablo 1’de gösterildi.

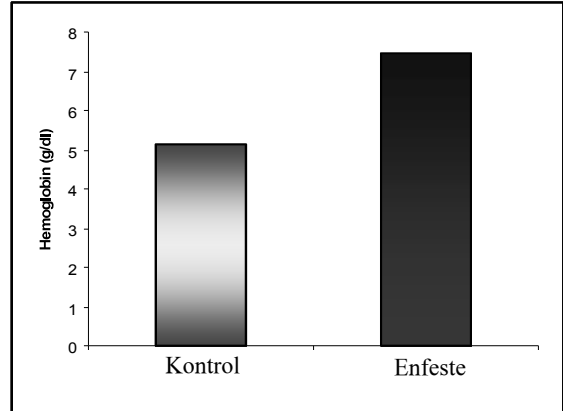
Tablo 1. Deney grubundaki balıklarda parazitlerin bulunma oranları



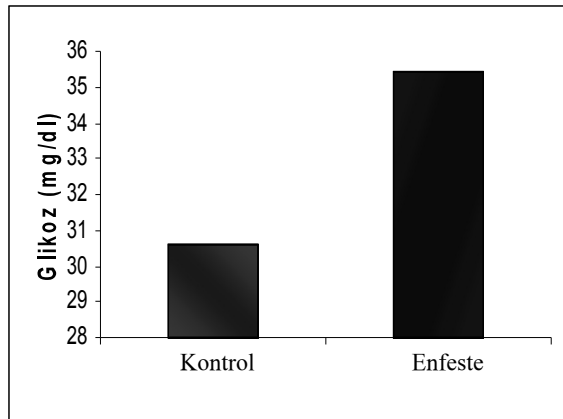
Parazit ile enfeste balıklar deney süresince morfolojik olarak incelenip; iştahsızlık, havuzun dip kısımlarında hareketsiz durma, yüzme bozuklukları, solungaçlarda solgunluk, vücut rengindeki değişiklikler kaydedildi.

Yapılan analizlerde stres faktörü olarak düşünülen yoğun parazitli balıklardaki kan hemoglobin, serum kortizol ve glikoz üzerine etkileri belirlenip, kontrol ve deney grupları karşılaştırıldı. İstatistiksel açıdan önemli bulunan veriler için tüm parametrelerde artışlar saptanmıştır ($P<0.05$). Parazitli balıklara ait tüm kan değerleri ve Şekil 1, 2, 3 ve Tablo 2’de gösterilmiştir.

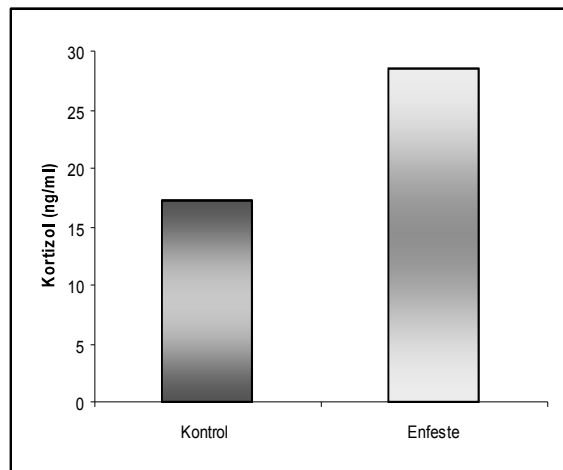
Şekil 1. Ortalama Hemoglobin Değeri



Şekil 2. Ortalama Glikoz Değeri



Şekil 3. Ortalama Kortizol Değeri



Tablo 2: Balıklarda (*Cyprinus carpio*) Stres Faktörüne Bağlı Olarak Belirlenen Kan Hemoglobinin, Serum Glikoz ve Kortizol Değerleri

Parazit	Hemoglobin (g/dl)		Glikoz (mg/dl)		Kortizol (ng/ml)	
	Kontrol	Deney	Kontrol	Deney	Kontrol	Deney
n=30	Ort±SH	Ort±SH	Ort±SH	Ort±SH	Ort±SH	Ort±SH
	5.16±0.20	7.47±0.35	30.60±3.33	35.40±3.32	17.13±4.38	28.54±1.83

* : p<0,05

Ort±SH : Aritmetik Ortalama±Standart Hata

& : 24 °C’de Elde Edilen Değerler

özellikle kortizol, kortizon gibi stres durumlarında salgılanan hormonların ve

Tartışma

Bilindiği gibi bir canlının stres ile karşılaşması halinde fizyolojisinde, biyolojisinde veya kan tablosu üzerinde birtakım değişimler gözlenir. Bu durum özellikle balıklar gibi bulunduğu ortamla sıkı bir birliktelik gösteren canlılar için çok daha önemlidir.

Balıklar yaşadıkları ortam gereği sıklıkla strese girer ve bunun sonucunda parazit ve patojene maruz kalırlar. Birçok hastalık etkeni doğada düşük oranlarda mevcuttur, ancak normal şartlarda problem oluşturmazlar. Çoğunlukla popülasyonda aktif bir hastalığın gelişmesi için diğer olumsuzluklarında mevcut olması gerekir. Balığın doğal savunma mekanizması, mukusun normal şekilde salgıladığı deri ve bağışıklık sisteminin diğer bileşenleri, hastalık etkenlerini kontrol altında tutar. Ancak yetiştirme şartlarında stok yoğunluğunun artması, düşük miktarda çözünmüş oksijen, besin değeri düşük olan yemler, tedavi amacıyla uygulanan her türlü medikament, elle yakalama gibi faktörler balığı strese sokar. Doğal savunma sistemleri zayıflar ve bulaşıcı hastalıklara karşı koruma yetenekleri azalır (Cengizler 2000). Bunun yanında uygun portantre bulup giren parazitler sadece balığın savunma sistemini zayıflatmakla kalmaz,

kan glikozunun yükselmesini de sağlar. Bu hormonlar balığın metabolik ve fizyolojik durumunda da değişimlere neden olur. Parazitin stres üzerine olan etkileri birçok çalışmada ifade edilmiştir (Ruane ve ark. 1999, Woo ve ark. 1987).

Bu çalışmada ise parazit enfestasyonunun, balıkta stres indikatörü parametreleri üzerine olan etkileri ortaya çıkarılmaya çalışıldı. Bu amaçla, yetiştiricilik koşullarında yoğun parazit ile enfeste olan *C. carpio* bireyleri makroskobik olarak incelendi ve kan örnekleri alınarak plazma kortizol, glikoz ve kan hemoglobin değerlerindeki değişimleri izlendi.

Makroskobik olarak incelenen balıklarda parazitten dolayı konakların zarar gördükleri, mukus yapısında farklılıklar, yüzmede bozukluk elde edilen bulgular arasındadır. Kan örnekleri incelendiğinde tüm parametrelerin etkilendiği saptanmış olup bu etkilenmenin artma eğiliminde olduğu gözlemlendi (P>0.05).

Cengizler ve ark. (2001) Seyhan Nehri’nden yakaladıkları aynalı sazanlarda, ekto-endo parazitleri ve bu parazitlerin balıklarda oluşturdukları zararları

incelemişlerdir. Elde edilen bulgular çalışma bulgularımızla benzerlikler göstermektedir.

Yapılan birçok çalışmada, balıklarda strese karşı yanıtı ortaya çıkarabilmek için parazit yoğunluğunun oldukça yüksek seviyelerde olması gerektiği ve ancak bu şekilde canlıda kronik bir stres oluşturabileceği vurgulanmıştır (Grutter ve Pankhurst 2000, Jorgensen ve Buchmann 2007).

Bu araştırmalar sonunda, uygun koşullar altında yaratılan strese bağlı olarak verilen Neuroendokrin yanıt yani HPI'nın uyarılması şeklinde ifade edilir. Bu durumda kortizol ve glikoz hormonlarında görülen artışlar şeklinde kendini gösterir. Araştırmamızda elde edilen bulgular da bunu açık bir şekilde göstermektedir.

Yapılan bir başka çalışmada, bir kopepod olan deniz biti (*Lepeophtherius salmonis*, Kroyer) ile yoğun olarak enfeste olmuş Atlantik alabalığı (*Salmo salar*)'nın fizyolojik yanıtları incelenmiştir (Burka ve ark. 2000). Buna göre, kopepodların yaşam evresi ve her balıktaki miktarı baz alınarak, plazma kortizol ve glikoz değerlerindeki değişimler belirlenmiştir. Sonuç olarak, deniz bitinin yaşam evrelerine bağlı olarak plazma kortizol ve glikoz değerlerinde istatistiksel olarak önemli düzeylerde yükselmeler olduğu görülmüştür ($P<0.05$). Elde edilen bulgular yaptığımız çalışmanın bulgularına benzerlik göstermektedir.

Deneysel amaçlı oluşturulan ya da doğrudan oluşan kronik veya akut stres sonucu, plazmada kortizol değerlerindeki artışlar balıkların immün yanıtını baskılar (Balm 1993). Sonuç olarak, balık bu durumun üstesinden gelebilmek için çaba gösterir ve enerji kaybeder. Yani kortizol seviyelerinde görülen artışlar ikincil bir yanıt oluşturur ki buda glikoz değerlerinde görülen yükselmedir (Wedemeyer ve Mcleay 1981). Bundan dolayı, balıklar da dahil olmak üzere, omurgalıların büyük bir

kısmı davranışsal değişimler gösterirler (Grutter ve Pankhurst 2000, Pankhurst ve ark. 1999). Bu çalışmada, parazit ile yoğun şekilde enfeste olan sazanların incelemeleri sonunda izlenen birtakım farklılıklar immün sistemin baskılanmasına ve fonksiyon yetersizliğine neden olmuştur. Dolayısıyla plazma kortizol ve glikoz değerlerinde gözlenen değişimlerin immün sistemde meydana gelen yetersizliklerin bir sonucu olabileceği kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

Balm PHM 1993. Immune-endocrine interactions. Pp. 195-221. In. G.K. Iwama, A.D. Pickering, J.P. Sumpter, C.B. Schreck (Editors). Fish stress and health in aquaculture. Cambridge University Press, Cambridge.

Barton BA 2000. Salmonid fishes differ in their cortisol and glucose responses to handling and transport stress. *North American Journal of Aquaculture*, 62, 12-18.

Blaxhall PC, Daisley KW 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5, 771- 882.

Bullock AM 1989. Laboratory methods. Pp. 347-402 In. R.J. Roberts, B.Tindall, (Editors). *Fish Pathology*, London.

Burka JF, Sims DE, Brimacombe M et al. 2000. The physiological response of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to a single experimental challenge with sea lice (*Lepeophtherius salmonis*). *Journal of Fish Diseases*, 23, 165-172.

Burtis AC, Ashwood ER 1999. Tietz textbook of clinical chemistry. 3rd Edition, Chapter 20, Philadelphia, Saunders, 1100 pp.

Cengizler İ 2000. Balık hastalıkları. Ç.Ü. Su ürünleri Fakültesi Yayınları, Adana.

- Cengizler I, Aytac N, Sahan-Azizoglu A, ve ark. 2001.** Ecto-endo parasite investigation on mirror carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) captured from The River Seyhan, Turkey. II. European Conference of Travel Medicine, Venice, Italy.
- Grutter AS, Pankhurst NW 2000.** The effects of capture, handling, confinement and ectoparasite load on plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish (*Hemigymnus melapterus*). *Journal of Fish Biology*, 57, 91-401.
- Haond C, Nolan DT, Ruane NM, Rotllant J, Wendelaar Bonga SE 2003.** Cortisol influences the host-parasite interaction between the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the crustacean ectoparasite *Argulus japonicus*. *Parasitology*, 127, 551-60.
- Hayran M, Özdemir O 1995.** Institute of medicine physicians, statistic and computer (HYB). Medical Research issue Unit MEDAR, Ankara, 484 pp.
- Jorgensen TR, Buchmann K 2007.** Stress response in rainbowtrout during infection with *Ichthyophthirius multifiliis* and formalin bath treatment. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 37, 25-28.
- Pankhurst NW, Hilder PI, Pankhurst PM 1999.** Reproductive condition and behavior in relation to plasma levels of gonadal steroids in the spiny damselfish *Acanthochromis polyacanthus*. *General and Comparative Endocrinology*, 115, 53-69.
- Pankhurst NW, Sharples DF 1992.** Effects of the capture and confinement on plasma cortisol concentrations in the snapper (*Pagrus auratus*). *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 43, 345-356.
- Ruane NM, Wendelaar Bonga SE, Balm PHM 1999.** Differences between rainbow trout and brown trout in the regulation of the pituitary-interrenal axis and physiological performance during confinement. *General Comarative. Endocrinology*, 115, 210-219.
- Stoltze K, Buchmann K 2001.** Effect of *gyrodactylus derjavini* infections on cortisol production in rainbow trout fry. *Journal of Helminthology*, 75, 291-294.
- Şahan A, Cengizler İ 2002.** Determination of some hematological parameters in spotted barb (*Capoeta barroisi*, 1894) and roach (*Rutilus rutilus*, 1758) living in Seyhan River (Adana City Region), (in Turkish). *Turkish Journal Veterinary Animal Sciences*, 26, 849-858.
- Toparlak M, Tüzer E 1994.** Paraziter hastalıkların tanısında laboratuvar teknikleri. Pfizer, Hayvan Sağlığı.
- Wedemeyer G, Mcleay DJ 1981.** Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In. A.D. Pickering (Editor). *Stres and Fish*. Academic Press, London.
- Wendelaar Bonga SE 2003.** The Stress Response in Fish. *Physiological Reviews*, 77, 591-625.
- Wendelaar Bonga SE 2003.** The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77, 591-625.
- Woo PTK, Leatherland JF, Lee MS 1987.** Cryptobia salmositica: cortisol increases the susceptibility of *Salmo gairdneri* Richardson to experimental cryptobiosis. *Journal of Fish Diseases*, 10, 75-83.

