



**POLEN ENJEKTE EDİLEN PULLU SAZAN
(*Cyprinus carpio*)' DA BAZI HEMATOLOJİK VE
İMMÜNOLOJİK PARAMETRELERİN
ARAŞTIRILMASI**

Erkan KOLGAR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı**

Danışman: Doç. Dr. M. Enis YONAR

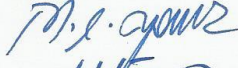


T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLEN ENJEKTE EDİLEN PULLU SAZAN (*Cyprinus carpio*) DA BAZI
HEMATOLOJİK VE İMMÜNOLOJİK PARAMETRELERİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Erkan KOLGAR
(Enstitü No: 152128103)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 10 Mayıs 2019
Tezin Savunulduğu Tarih : 11 Haziran 2019

Tez Danışmanı : Doç. Dr. M. Enis YONAR (F.Ü) 
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Kenan KÖPRÜCÜ (F.Ü) 
Doç. Dr. Ünal İSPİR (M.T.Ü) 

HAZİRAN-2019

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. M.Enis YONAR'a, polen örneklerinin palinolojik identifikasyonu yapan Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Sayın Sibel SİLİCİ'ye, araştırmanın yürütülmesi için gereken altyapıyı sağlayan Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dekanlığı'na, çalışmayı maddi yönden destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Yönetim Birimine teşekkür ederim.

Erkan KOLGAR

ELAZIĞ- 2019

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	VIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Literatür Bilgisi	2
1.1.1. Arı Polenİ	2
1.1.2. Balıklarda İmmun Sistem	4
2. MATERYAL ve METOT	8
2.1. Materyal	8
2.1.1. Çalışma Alanı	8
2.1.2. Balık Materyali	9
2.1.3. Polen Örnekleri	9
2.2. Metot	9
2.2.1. Polen Örneklerinin Analizi	9
2.2.2. Polenin Deneysel Olarak Uygulanması	10
2.2.3. Kan Örneklerinin Alınması ve İşlenmesi	11
2.2.4. Oksidatif Radikal Üretiminin (Nitrobluetetrazolium-NBT aktivitesi) Belirlenmesi	12
2.2.5. Eritrosit (RBC) ve Lökosit (WBC) Sayılarının Belirlenmesi	12
2.2.6. Hematokrit (Ht) Düzeyinin Belirlenmesi	12
2.2.7. Hemoglobin (Hb) Düzeyinin Belirlenmesi	12
2.2.8. Total Protein (TP) Düzeyinin Belirlenmesi	13
2.2.8. Total İmmunoglobulin (TI) Düzeyinin Belirlenmesi	13
2.2.10. İstatistiksel Analizler	13
3. BULGULAR	14
3.1. Polen Örneklerinin Analiz Sonuçları	14
3.2. Oksidatif Radikal Üretimindeki (NBT aktivitesi) Değişimler	14

3.3.	Eritrosit Sayısındaki Değişimler	16
3.4.	Lökosit Sayısındaki Değişimler	17
3.5.	Hematokrit Düzeyindeki Değişimler	18
3.6.	Hemoglobin Düzeyindeki Değişimler	19
3.7.	Total Protein Düzeyindeki Değişimler	20
3.8.	Total İmmunoglobulin Düzeyindeki Değişimler	21
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR	23
5.	ÖNERİLER	27
6.	KAYNAKLAR	28
7.	ÖZGEÇMİŞ	35



ÖZET

Bu çalışmada, sazan (*Cyprinus carpio*)’ da bazı hematolojik ve immunolojik parametreler üzerine polenin etkisi araştırıldı. Polenin 1 mg/kg balık ve 10 mg/kg balık dozları intraperitoneal olarak balıklara enjekte edildi. Enjeksiyondan sonraki 3., 7. ve 10. günde balıklardan kan örnekleri alındı. Kan örneklerinde hematolojik [eritrosit sayısı, hematokrit ve hemoglobin düzeyleri] ve immunolojik [lökosit sayısı, oksidatif radikal üretimi (nitrobluetetrazolium-NBT aktivitesi), total protein ve total immunoglobulin düzeyleri] parametreler analiz edildi.

Kontrol grubuyla kıyaslandığında, denemenin 3., 7. ve 10. günlerinde polen uygulanan grupların hematolojik ve immünolojik parametrelerinde istatistiksel olarak önemli bir artış tespit edildi ($p < 0,05$). Yalnız polen uygulanan gruplar birbiriyle kıyaslandığında hematolojik ve immünolojik parametrelerinin denemenin 3., 7. ve 10. günlerinde birbirinden farklılık gösterdiği tespit edildi ($p < 0,05$).

Anahtar Kelimeler: Bağışıklık, Balık, Hematoloji, Kan, Polen,Sazan.

SUMMARY

Investigation of Some Haematological and Immunological Parameters in Pollen Injected Carp (*Cyprinus carpio*)

In this study, effects of pollen on haematological and immunological parameters in carp (*Cyprinus carpio*) were investigated. 1 mg / kg fish and 10 mg / kg fish of pollen were injected intraperitoneally into the fish. Blood samples were taken from the fish on 3rd, 7th and 10th days after injection. Hematological [erythrocyte count, haemoglobin and haematocrit levels] and immunological [leucocyte count, oxidative radical production (nitroblue tetrazolium-NBT activity), total plasma protein and total immunoglobulin levels] parameters were analysed in blood samples.

When compared to the control group, statistically significant increase in the haematological and immunological parameters of the pollen treated groups were detected on the 3rd, 7th and 10th days of the experiment ($p < 0,05$). When pollen groups are compared with each other, the haematological and immunological parameters were found to be different on the 3rd, 7th and 10th days of the experiment.

Key words: Imunity, Fish, Hematology, Blood, Pollen, Carp.

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Çalışmanın yürütüldüğü akvaryumlar	8
Şekil 2.2. Balıklardan kan örneklerinin alınması.....	11



TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Kestane poleninim kimyasal analizinden elde edilen sonuçlar	14
Tablo 3.2. Kestane poleninim yağ asidi profili	15
Tablo 3.3. Kestane poleninim belirlenen antioksidan özellikleri	15
Tablo 3.4. Kontrol ve deneme gruplarında oksidatif radikal üretimi	16
Tablo 3.5. Kontrol ve deneme gruplarında eritrosit (RBC) sayısı	17
Tablo 3.6. Kontrol deneme gruplarında lökosit (WBC) sayısı	17
Tablo 3.7. Kontrol ve deneme gruplarında hematokrit (Ht) düzeyi	18
Tablo 3.8. Kontrol ve deneme gruplarında hemoglobin (Hb) düzeyi	19
Tablo 3.9. Kontrol ve deneme gruplarında total protein (TP) düzeyi	20
Tablo 3.10. Kontrol ve deneme gruplarında total immunoglobulin (TI) düzeyi	21

1. GİRİŞ

Su ürünleri açısından su kaynaklarından yararlanma avcılık ve yetiştiricilik şeklinde olmaktadır. Fakat teknolojinin gelişmesiyle birlikte artan sanayileşme, deniz ve iç suların kirlenmesine ve bu kaynaklardan yararlanma oranının azalmasına dolayısıyla avcılık yoluyla elde edilen miktarın düşmesine neden olmaktadır. Bu nedenle son zamanlarda tüm dünyada kültür balıkçılığına verilen önem bir hayli artmıştır. Fakat kültür balıkçılığında yetiştiriciliğin yoğun olarak yapılması veya balıkların yoğun olarak stoklanması enfeksiyöz hastalıklar açısından balıklar için büyük bir tehlike yaratmaktadır. Enfeksiyöz hastalıklar balıklar arasında çok kısa sürede yayılabilmektedir (Ellis, 1988; Arda vd., 2005). Balık hastalıkları sonucunda oluşan ekonomik kayıplar su ürünleri sektörünün gelişimi açısından büyük önem taşımaktadır. Günümüzde balık hastalıklarının birçoğunun tedavisi için halen etkin bir çözüm geliştirilememiş olması ve var olan tedavi yöntemlerinin ise balıklar için ekstra bir stres kaynağı olması, bilim insanlarını balık sağlığını arttırmaya sevk etmiştir (Ergönül vd., 2012).

Enfeksiyöz hastalıkların tedavisi için kullanılan kemoterapötik maddelerin, balıkların karaciğer, böbrek, bağırsak, deri gibi organlara zarar vermesi, kas dokusunda birikerek insanlara geçmesi, bakterilerin direnç oluşturması, su zeminine çökerek sedimentasyon oluşturması, bağışıklık sistemini olumsuz yönde etkilemesi, etkisinin kısa süreli olması, oksidatif strese neden olması ve antioksidan mekanizmayı baskılaması, tüm enfeksiyonlara karşı etkili olmaması gibi nedenlerle kullanımı sınırlı olmaktadır (Arda vd., 2005; Sağlam ve Yonar, 2009). Bu sebeple enfeksiyöz hastalıkların kimyasal maddelerle kontrol altına alınmasında önemli sorunlarla karşılaşmaktadır. Bu olumsuzlukların önüne geçebilmek için hastalığın çıkmasını engelleyecek korunma önlemlerinin alınması, aşılama, doğal ya da sentetik immunostimulanlar ile balıkların direncini azaltarak hastalıkların oluşumuna sebep olan stres faktörlerine karşı antioksidanların kullanılabilirliği konusu oldukça önem kazanmıştır. Diğer taraftan yetiştiricilik koşullarının zaman zaman yetersizliği balıklarda strese neden olmaktadır. Bu da bağışıklık sisteminin etkinliğini azaltabilmektedir. Bu yüzden hastalık oluşmadan alınacak önlemler büyük önem taşımaktadır.

Polen, tohumların oluşmasından hemen önce açan çiçeklerin orta kısmındaki erkek üreme organının başçık bölgesinde yer alan ve bitkinin bütün kalıtsal özelliklerini taşıyan,

küçük hücrelerden oluşmuş tozlara verilen isimdir. Bitkilerin çiçeklenme dönemleri boyunca görülen polenler çiçek tozu olarak da isimlendirilirler. Çiçekli bitkilerde erkek cinsiyet hücresi olan polen, dişi organın tozlaşmasını sağlar. Başlıca protein kaynağı olarak polen, arıların büyümesinde ve salgı bezlerinin gelişmesinde mutlaka gereklidir. Arı kolonilerinin yavru üreterek devamlılığını sağlayabilmesi ancak polenle mümkün olabilmektedir (Çankaya ve Korkmaz, 2008). Antimikrobiyal, antioksidan ve immunomodulator özellikler gösteren polen, ihtiva ettiği besinler nedeniyle son zamanlarda bir hayli dikkat çekmektedir (Yang vd., 2007; Eraslan vd., 2009; Xu vd., 2009; Abbass vd., 2012). Polenin ihtiva ettiği besin maddeleri arasında yüksek miktarda protein ve karbonhidrat bulunmakla birlikte yağ asitleri, vitaminler, mineral maddeler, enzimler ve aminoasitler de yapılan kimyasal analizler neticesinde yapısında bulunmuştur. Bunun yanında flavonoid, karotenoid, steroid ve renk maddelerinin varlığı da polenin kimyasal yapısında gösterilmiştir (Abbas vd., 2012).

Bu çalışmada pullu sazana enjeksiyon yoluyla uygulanan polenin immunostimulan etkisinin araştırılması ve dolayısıyla polenin balıklarda immunostimulan olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu yüksek lisans tez çalışması; maddi olarak SÜF.18.05 numaralı proje kapsamında Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (FÜBAP) tarafından desteklenmiştir.

1.1. Literatür Bilgisi

1.1.1. Arı Polen

Çiçek tozu anlamına gelen polen, bitkilerin çiçeklenme dönemleri boyunca görülen sarı, kırmızı, mor, yeşil ve siyaha kadar değişen farklı renklerde olabilen çok çekirdekli haploit kromozoma sahip dişi organın tozlaşmasını sağlayan çiçekli bitkilerin (Angiosperm) erkek üreme organında (stamen) oluşan erkek gametofitlerdir (Gülhan, 2014; Fişne, 2016; Tümerdem, 2016). Polenler vejetatif ve generatif olmak üzere iki hücreden meydana gelmiş n kromozumlu mikrosporlardır (Fişne, 2016). Polenler mikrospor ana hücresinin mayoz bölünme geçirmesiyle oluşur. Böylece dört haploid hücre

yani tetratlar meydana gelir. Tetrattan ayrılan mikrosporlar polen tanesi olarak adlandırılırlar (Tümerdem, 2016).

Polenin esas görevi aynı türün dişi üreme organına (ginekeum) ulaşip; ovaryumdaki yumurtanın döllenmesini sağlamak ve böylece neslin devamlılığını gerçekleştirmektir. Baharla birlikte çiçekler açmaya başlayınca, çiçekler arasında tozlaşmalar da başlar. Tozlaşma, polenlerin çiçeğin dişi organına taşınması olarak bilinir. Çiçekli bitkilerin % 20'si polenlerini rüzgâr yoluyla taşıırken (anemogam), diğerleri polenlerini böcekler (entomogam), kuşlar (ornitogam) veya diğer etmenler yoluyla taşır veya ulaştırırlar. Böcekler içerisinde poleni en etkili şekilde toplayan bal arıdır ve topladıkları polene kendi salgılarını da eklediklerinde arı poleni oluşur (Fişne, 2016). Polinasyon için çiçekli bitkilerin arılara, arıların da yaşamlarını sürdürebilmeleri için besinsel ihtiyaçlarını karşılamada çiçeklere ihtiyaçları vardır. Yapılan arkeolojik araştırmalarda bu iki canlı grubunun birlikte evrimleştiğini gösteren kanıtlar bulunmuştur. Arılar, nektar ve polen toplamak için yüzlerce çiçeği ziyaret etmektedir. Topladıkları nektarı karbonhidrat kaynağı olarak, polenleri ise protein kaynağı olarak kullanmaktadırlar. Bu nedenle, polenin bitkisel zenginliği ve kalitesi arıların gelişim süreçlerinin yanı sıra çoğalmalarında da temel faktördür. Bal arılarının polen kaynakları buldukları doğal floradır. Floranın polen değeri ise bölgede bulunan polenli bitki türlerinin çeşitliliği, yoğunluğu ve çiçeklenme süresinin uzunluğu ile ilişkilidir (Gülhan, 2014).

İnsan metabolizması için çok değerli besin maddelerini içeren polen, yüksek derecede protein ve karbonhidrat kaynağı olmasının yanısıra zengin vitamin ve mineral madde deposudur (Gülhan, 2014). Polenin kimyasal içeriğini, aminoasitler, proteinler, karbonhidratlar, lipidler (doymuş ve doymamış yağlar ve onların türevleri), şekerler ve su oluşturmaktadır. Ayrıca polenler çeşitli vitaminler, organik asitler, mineraller ve elementler bakımından da oldukça zengin hücrelerdir. Polenlerde A vitamini, B1 vitamini, B2 vitamini, B3 vitamini, B5 vitamini, B6 vitamini, B9 vitamini B12 vitamini, C vitamini, D vitamini, E vitamini, biyotin, K vitamini ve folik asit bulunmaktadır. Polenlerde bulunan başlıca aminoasitler; sistin, lisin, triptofan, histidin, fenilalanin, arjinin, metiyonin, lösin, izolösin, glutamin ve valin'dir. Bu aminoasitlerin polendeki oranları %7-30 arasında değişiklik göstermekte olup, polen içerisinde en fazla bulunan aminoasitler lösin (%7.1) ve lisin (%6.4), en az bulunanlar ise triptofan (%1.4) ve metiyonin (%1.9)' dir (Gülhan 2014; Tümerdem, 2016). Doğada bulunan 31 yağ asitinden 16'sı polenlerde de belirlenmiş olup, bunlardan en önemli olanı palmitik asit'tir. Bunu myristik, linoleik, oleik, stearik ve diğer

asitler izlemektedir. Fruktoz, sukroz ve glukoz gibi şekerler de polenlerde farklı oranlarda bulunan karbonhidratlardır. Ayrıca polenlerde polisakkaritlerden; kalloz, pektin, selüloz ve lignin de önemli miktarda bulunmaktadır (Tümerdem, 2016). Mineral ve iz element bakımından oldukça zengin olan polen içeriğinde; kalsiyum, fosfor, demir, bakır, potasyum, magnezyum, manganez, silis, sülfür, sodyum, nikotinamid, iyot, klorin, bor ve molibden bilinen mineraller arasında yer alıp, iz elementlerden ise alüminyum, titanyum, çinko ve nikel bulunmaktadır. Bunun yanısıra çeşitli madensel tuzlar, karotenoidler, steroidler, esansiyel yağ asitleri ve hormon benzeri büyüme faktörleri, diastaz, fosfataz ve amilaz gibi değerli enzimler ile renk pigmentleri de tespit edilmiştir. Arı polenin yapısında bulunan flavonoidler ve fenolik bileşikler; güçlü antioksidan, antimikrobiyal, antiinflammatuvar, antikarsinojen, vazodilatör, antiallerjik, antiviral, çevresel kontaminantlara karşı koruyucu fonksiyonlara sahip olma gibi çeşitli biyolojik aktiviteler gösterirler (Gülhan, 2014).

1.1.2. Balıklarda İmmun Sistem

Balıklar buldukları ortam nedeni ile birçok patojen mikroorganizma ile karşı karşıyadır. Ancak vücudun savunma sistemi patojen mikroorganizmaları etkisiz hale getirdiğinden bu karşılaşmanın çok az bir kısmı tehlikeli sonuçlar doğurmaktadır. Balıkların immün sisteminin memeliler ile birbirine benzediği bildirilmiştir. Ön böbrek, timus ve dalak balıkların en önemli immün sistem organlarıdır. Balıklarda vertebranın iki yanında yerleşmiş olan böbrek, ön ve arka böbrek olmak üzere iki lob halinde görülmektedir. Ön böbrek önemli bir hematopoetik organ olup, morfolojik olarak yüksek vertebratlardaki kemik iliği ile benzerlik göstermektedir. Ön böbrek, antikorların bol miktarda üretildiği yerdir. Timus, solungaçların dorsolateral bölgesinde yerleşmiş ve genellikle bir çift lobdan oluşmuş, T hücrelerinin gelişmesinin başladığı önemli bir lenfoid organdır. Timusun en önemli görevi yabancı antijenlere karşı yanıt verebilecek lenfositlerin çoğalmasını sağlarken, vücudun kendi antijenlerine karşı reaksiyon verebilecek lenfositleri ortadan kaldırmaktır. Antikor yanıtına yardımcı olmak timusun diğer bir önemli görevidir. Dalak, kırmızı ve beyaz pulpa olarak ayrılmıştır. Kırmızı pulpa, organın önemli bir kısmını teşkil etmekte ve makrofaj ile lenfosit hücre popülasyonunu

kapsamaktadır (Ellis, 1981; Ellis, 1988; Van Muiswinkel, 1992; Dalmo vd., 1997; McL Pres ve Evensen, 1999; Sakai, 1999; Magnadottir vd., 2005; Magnadottir, 2006).

İmmun sistem diğer canlılarda olduğu gibi balıklarda da spesifik ve non-spesifik bağışıklık olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Ellis, 1981; Van Muiswinkel, 1992; Dalmo vd., 1997).

Balıklarda spesifik bağışıklığın en önemli elamanları immunuoglobulinlerdir. Glikoprotein karakterinde olup B lenfositlerinin başkalaşımı sonucu oluşan, plazma hücreleri tarafından sentezlenip antijenlerle birleşerek spesifik bir reaksiyon veren immunuoglobulinler, diğer bir ifadeyle antikorlar, balıklarda serumda, doku sıvılarında, sindirim kanalında ve mukusta bulunmaktadır. Memelilerde IgG, IgM, IgA, IgE ve IgD olmak üzere beş immunoglobulin sınıfı bulunmasına rağmen (Diker, 1998; Arda vd., 1994), balıklarda bunlardan sadece IgM' nin varlığı kesin olarak belirlenmiştir (Darson, 1981; Tizard, 1992). Bunun dışında immün sistemi güçlendirilmiş *Carassius carassius*' larda IgG benzeri (Roberts, 1978), *Myxinidae* ailesine ait balıklarda ise molekül ağırlığı 118 kDa olan ve IgN adı verilen, IgM benzeri ikinci bir immunoglobulinin var olabileceği ifade edilmiştir. Kıkırdaklı balıkların serumunda IgM' nin pentametrik (19 S) ve monometrik (7 S) formları; kemikli balıklarda ise tetrametrik (17 S) ve monometrik formları bulunur (Tizard, 1992).

Balıklarda non-spesifik bağışıklık ise vücudun enfeksiyonlara karşı cevap vermesini sağlayan, enfeksiyonun meydana gelmesini engelleyen veya geciktiren deri, mukus, gastrointestinal bölge, fagositik hücreler gibi birçok faktörden ibarettir.

Yüksek omurgalılarınkinden farklı olarak balıkların derisi, keratin içermeyen epidermis hücrelerinden oluşur. Sağlam derinin epitel örtüsü mikroorganizmaların girişini önleyen önemli ve iyi bir bariyer görevi görmekte dolayısıyla birçok patojenik mikroorganizma sağlam deriden geçememektedir. Deri ve solungaçlardan salgılanan mukus sayesinde epitel hücrelerin sayısı artmaktadır. Bu epitel hücreler, mikroorganizmalara karşı vücudun ilk savunma hattını oluştururlar (Ellis, 1981; Demir, 1992; Arda vd., 1994).

Balık ile çevresi arasında koruyucu bir tabaka görevi gören mukusun miktarı, çevredeki patojen mikroorganizmaların artması, fiziksel ve kimyasal tahrişler ve enfeksiyonlara tepki sırasında artar. Mikroorganizmaların vücuda girebilmeleri için kıvam olarak çok yoğun ve akışkan olan mukusu geçmesi ve epitel hücrelere tutunması gerekir. Mukoid tabakanın devamlı hareket halinde olması mikropların hücrelere direk temasını

zorlaştırmaktadır (Ellis, 1981; Arda vd., 1994). Derideki mukus komponentleri; antimikrobiyal sistemde önemli etkiye sahip olmaktadır. Mukus, patojenlerin yıkımlanmasında önemli bir etkiye sahip olan pentraksin gibi lektinler, komplement proteinleri, antibakteriyel peptidler ve IgM gibi immun parametreleri içermektedir (Magnadottir., 2006).

Gastrointestinal sistem, besinlerin sindiriminde görevli organlar grubu olarak bilinmesine rağmen yapılan araştırmalar sonucunda bu görevinin yanı sıra vücudun çeşitli etkenlere karşı korunmasında da etkili olduğu belirlenmiştir. Gastrointestinal bölge mikrobiyal invazyon için bir bariyer görevi görür. Çevredeki kuvvetli patojenlere karşı midenin düşük pH'sı, safra, tripsin ve pepsin gibi enzimlerin salgılanması bu sistemin immun sistem açısından önemli görevlerindedir (Ellis, 1981; Dalmo vd., 1997).

Balıklarda non-spesifik savunmanın anahtar hücrelerini, granülositler ve monositler/makrofajlar oluşturmaktadır. Balıklardaki non-spesifik sitotoksik hücreler (NCC) memelilerde bulunan doğal öldürücü hücrelere (NK) emsal olarak kabul edilmektedir (Dalmo vd., 1997). Memelilerde olduğu gibi balıklarda da granülositler nötrofil, eozinofil ve bazofil olmak üzere üç farklı hücre tipine ayrılmıştır. Balıklarda nötrofillerle birlikte, az olmakla beraber eozinofil ve bazofillerin varlığı ispatlanmıştır (Ellis, 1977; 1981).

Fagositik hücreler diğer canlılarda olduğu gibi balıklarda da non-spesifik savunma mekanizmalarının en önemli unsurunu oluşturur. Fagositik hücreler, makrofajlar ve nötrofiller olmak üzere iki tip olup, makrofajlar balıklar ve diğer omurgalılarda immun sistemin en önemli elemanıdır. Makrofajlar birçok dokuda bulunmasına rağmen lenf düğümleri, dalak ve karaciğerde fazladır. Bunlar vücutta humoral ve hücrel savunma mekanizmalarında ve diğer immunolojik aktivitelerde direkt veya dolaylı olarak önemli görevler üstlenirler. Makrofajlar özellikle 1-10 µm boyutundaki partikülleri, hücrel atıkları ve vücuttaki ölü ve hasta hücreleri yutup vücuttan uzaklaştırarak immun sisteme katkıda bulunurlar. Makrofajlar nötrofillerden daha geç fagositoza başlamalarına rağmen ömürleri boyunca sürekli fagositoz yapabilirler. Fagositik hücrelerin ikincisi olan nötrofiller ise balıklarda böbreklerde ve az miktarda dalakta bulunurlar (Ellis,1981; Diker, 1998). Balık nötrofillerinin memeli nötrofillerine morfolojik ve histokimyasal boyama bakımından benzediği ifade edilmektedir. Balıklarda nötrofillerin fagositik aktivitesi kesin olarak açıklanmış olsa da çelişkili ifadeler de vardır (Ellis, 1977; 1981). Örneğin; Ellis (1976) pisi balıklarında (*Pleuronectes platessa*) nötrofillerin karbon taneciklerini fagosit

edemediğini bildirirken, gökkuşuğu alabalığında deneysel olarak oluşturulan yara iltihaplanmasında makrofajların ve nötrofillerin fagositozu kesin olarak gösterilmiştir (Finn ve Nielson, 1971). Peleteiro ve Richards (1990), gökkuşuğu alabalığı epidermisinde fagositik hücrelerin birkaç tipinin varlığını tespit etmişlerdir.

Balıklar da memeli fagositlerinin gerçekleştirdiği solunum patlaması (respiratory burst) aktivitesine benzer bir savunma oluşturabilirler. Fagositik hücrelerin metabolik aktivitelerinde, bir uyarıyla karşılaşıldığı zaman hızlı oksijen (O₂) tüketimine bağlı olarak artış gözlenir. Bu artışı ifade etmek için “metabolik” veya “respiratory burst (RB)” ifadesi kullanılmıştır (Babior, 1978). RB, kemotaktik hareketinin başlangıcından itibaren başlar ve fagositoz olayının sonuna kadar devam eder. Bu mekanizma, O₂ tüketimindeki belirgin artış ve bunun sonucu olarak süperoksid (O₂⁻) radikalının aktivasyonu ile karakterizedir (Diker, 1998).

Ayrıca balıklarda sitokinler, interferonlar ve yirmi serum proteinin oluşturduğu komplement sistem, NK hücreleri (doğal öldürücü hücreler), tripsin, lizozim, CRP(C-reaktif protein), seruloplazmin, lizozim, transferin, kitinaz, katepsin, ve proteinaz inhibitörleri gibi çeşitli antimikrobiyal maddeler non-spesifik humoral bağışıklıkta görevlidir (Jolles ve Jolles, 1984; Grinde vd., 1988; Murai vd., 1990; Nakanishi vd., 1991; Dalmo vd., 1997; Ellis, 1999, Jiang vd., 2004; Lange vd., 2004a; Lange vd., 2004b; Magnadottir vd., 2005).

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışma Alanı

Tez çalışması, Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi' nde bulunan ve yaklaşık hacmi 200 L olan 12 farklı cam akvaryum (3 tekrar ve her bir tekrar için 4 akvaryum) kullanılarak yapıldı (Şekil 2.1).

Tez çalışmasına başlamadan önce akvaryumlar dezenfekte edildi ve akvaryumların üstü balıkların atlamalarını engellemek için kapatıldı. Hava kompresörü kullanılarak akvaryumlar sürekli havalandırıldı. Akvaryumdaki suyun sıcaklığı 23 ± 1 °C' ye ayarlandı.



Şekil 2.1. Çalışmanın yürütüldüğü akvaryumlar

2.1.2. Balık Materyali

DSİ 9. Bölge Müdürlüğü Keban Su Ürünleri Şube Müdürlüğü'nden sağlanan, ortalama ağırlığı 40 ± 5 g olan 360 adet pullu sazan (*Cyprinus carpio*) Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesine canlı olarak getirilerek her bir akvaryumda 30 balık olacak şekilde stoklandı. Stoklanmadan önce balıklar makroskobik olarak muayene edildi.

2.1.3. Polen Örnekleri

Çalışmada kullanılan kestane (*Castanea sativa*) poleni örnekleri, Zonguldak bölgesinde sabit olarak arıcılık işiyle uğraşan arıcılardan kestane balının üretim sezonunda kovanların önüne polen tuzağının takılmasıyla elde edildi. Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Sayın Sibel SİLİCİ tarafından polen örneklerinin palinolojik identifikasyonu gerçekleştirildi.

10 g tartılan polen örneği 20 ml distile suda çözülerek 10 dakika 1.000 g' de santrifüj edildi. Süpernatantın sıvı kısmı döküldükten sonra sedimente 20 ml distile su tekrar eklenerek 5 dakika 1.000 g' de santrifüj edildi. Su kısmı tekrar dökülerek kurutma kâğıdı üzerine test tüpü ters çevrildi. Lam üzerine aktarılan sedimentin üzerine gliserin jelatin karışımı eklendikten sonra ısıtıcı tablada 40 °C' de jelin erimesi sağlandı. Preparat üzerine lamel kapatıldı. Polen tanecikleri referans polen preparatları ve polen atlasları kullanılarak mikroskopta tanımlandı ve sayıldı. Her bir örnekte en az 5.000 polen sayılmak suretiyle arı ekmeklerini en yüksek oranda temsil eden polen türleri tespit edildi.

2.2. Metot

2.2.1. Polen Örneklerinin Analizi

Standart AOAC 920.153, 991.36 ve 960.52 metotları kullanılarak polenin kimyasal analizi yapıldı. ISO 12966-2:2011 metodu yardımıyla ise yağ asitlerinin analizi gerçekleştirildi.

Polen örneklerindeki ana şeker kompozisyonu yüksek performanslı likid kromatografi [High Performance Liquid Chromatography-Refractive Index Detector (HPLC-RID, Agilent 1100 Series, USA), equipped with a manual injection quaternary pump (U.S.A) and Zorbax carbohydrate column (4.6x250 mm, 5 µm particle size] ile saptandı.

Polen örneklerinin antioksidan özellikleri Singleton ve Rossi (1965), Gyamfi vd. (1999), Leblanc vd. (2009) ile Ulusoy ve Kolaylı (2014) tarafından bildirilen metotlar kullanılarak tespit edildi.

2.2.2. Polenin Deneysel Olarak Uygulanması

Tez çalışmasında, canlı olarak getirilerek 12 farklı akvaryuma her bir akvaryumda 30 balık olacak şekilde stoklanan balıkların 15 gün süreyle adaptasyonu sağlandı. Adaptasyon sırasında ticari bir balık yemi balıklara günde iki kez alabildikleri kadar verildi.

Adaptasyon süresi sonunda balıklar aşağıdaki gibi 4 gruba ayrıldı.

Grup 1 (K): Kontrol grubu;

Grup 2 (PBS): Phosphat buffer saline (PBS) enjekte edilen grup;

Grup 3 (P-1): 1 mg/kg balık dozunda polen enjekte edilen grup;

Grup 4 (P-10): 10 mg/kg balık dozunda polen enjekte edilen grup.

Deneme 10 gün sürdü. Tez çalışması 3 tekrarlı yapıldı ve her bir tekrar için 90 toplamda 360 balık kullanıldı. Araştırma Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Başkanlığı' nca onaylandı (Protokol No: 2018/42).

2.2.3. Kan Örneklerinin Alınması ve İşlenmesi

Polen enjeksiyonundan sonraki 3., 7. ve 10. günlerde her bir tekrardan 10 balık alınarak 25 mg/L konsantrasyonundaki benzokain (25 mg/L) yardımıyla anestezi edildi. Balıkların kanları kavdal pedünkül bölgesinden ensize edilmesinden sonra kavdal venasından alınarak EDTA içeren antikoagülanlı tüplere dolduruldu (Şekil 2.2). Böylece kan örnekleri alındı. Kan alındıktan sonra balıklar tekrar makroskopik olarak muayene edildi.

Kan örneklerinde oksidatif radikal üretimi (nitrobluetetrazolium-NBT aktivitesi), eritrosit (RBC) ve lökosit (WBC) sayısı, hematokrit (Ht) ve hemoglobin (Hb) düzeyi belirlendikten sonra plazmaları çıkarıldı. Bunun için kan örnekleri 3500 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi ve plazmaları ayrıldı. Plazmada total protein (TP) ve total immunoglobulin (TI) düzeyi belirlendi.



Şekil 2.2. Balıklardan kan örneklerinin alınması

2.2.4. Oksidatif Radikal Üretiminin (Nitrobluetetrazolium-NBT aktivitesi) Belirlenmesi

Mikrotiter tabaklara 0,1 ml kan konulduktan sonra üzerine eşit miktarda % 0,2 NBT solusyonu ilave edildi. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyondan sonra bu süspansiyondan 0,5 ml alınarak 1 ml N, N-dimetyl formamide içeren cam tüplere ilave edildi. Bu tüpler 3000 x g' de 5 dakika santrifüj edilerek üstteki tabaka 540 nm'de spektrofotometrede okundu (Siwicki vd., 1994).

2.2.5. Eritrosit (RBC) ve Lökosit (WBC) Sayılarının Belirlenmesi

Eritrosit pipetinin 0,5 işaretine kadar kan, 101 işaretine kadar ise Natt-Herrick çözeltisinden çekildi. Hazırlanmış olan karışımdan bir damla hücre sayma kamarasına damlatıldı ve dağılması beklendi. Sonra beş büyük kare (80 küçük kare) içindeki eritrositler ile tüm küçük karelerdeki lökositler sayıldı. Belirlenen eritrosit sayısı 10.000 ile lökosit sayısı ise 1000 ile çarpılarak bir milimetreküp kandaki eritrosit ve lökosit sayısı belirlendi (Natt and Herrick, 1952).

2.2.6. Hematokrit (Ht) Düzeyinin Belirlenmesi

Heparinli hematokrit kapiller tüpler 2/3 oranında kanla dolduruldu ve tüpler 5 dakika için 12500 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra hematokrit yüzdesi özel bir cetvel üzerine konularak skaladan okundu.

2.2.7. Hemoglobin (Hb) Düzeyinin Belirlenmesi

Cam tüplere 0,02 ml kan üzerine ise 5 ml Drabkin's solusyonu eklendi. Karışım 10 dakika karanlıkta bekletildi ve spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okunarak hemoglobin düzeyi belirlendi (Drabkin, 1946).

2.2.8. Total Protein (TP) Düzeyinin Belirlenmesi

Biüret yöntemi kullanılarak total protein düzeyindeki değişimler belirlendi. Bunun için spektrofotometrik tüplere önce 0,9 ml distile su ve üzerine 0,1 ml plazma bırakıldıktan sonra, bunların üzerine 4 ml biüret ayırıcı ilave edildi. Karanlıkta 30 dakika bekletilen örnekler 540 nm'de spektrofotometrede köre karşı okundu (Siwicki vd., 1994).

2.2.9. Total İmmunoglobulin (TI) Düzeyinin Belirlenmesi

Total İmmunoglobulin düzeyinin tespit edilmesi için total protein düzeyinin belirlenmesinde izlenen yöntem kullanıldı. Fakat plazma örnekleri tüplere bırakılmadan önce deiyonize suda bekletilen % 12'lik polietilenglikolle oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 5000 x g'de 10 dakika santrifüj yapılarak üstte kalan kısımdan 0,1 ml kullanıldı. Elde edilen sonuçlar protein değerinden çıkarılarak toplam immunoglobülin değeri belirlendi (Siwicki vd., 1994)

2.2.10. İstatistiksel Analizler

Denemede elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri SPSS 12.0 istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol ve deneme grubu balıklarının incelenen parametrelerinde oluşan değişimler tek yönlü varyans analizi ile test edildi. Bağımlı gruplarda (günler için) istatistiksel farklılığı ortaya çıkarabilmek amacıyla tekrarlı ölçümlerde varyans analizi kullanıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verildi.

3. BULGULAR

Adaptasyon ve deneme esnasında balıklarda herhangi bir ölüm olayı gerçekleşmedi. Çalışmaya başlamadan önce ve yine kan alımını takiben makroskobik olarak muayene edilen balıklarda herhangi bir bulguyla karşılaşılmadı.

3.1. Polen Örneklerinin Analiz Sonuçları

Polen örneklerinin kimyasal analizinden elde edilen sonuçlar Tablo 3.1' de sunulmuştur. Ayrıca polen örneklerinin yağ asidi kompozisyonu Tablo 3.2' de, antioksidan özellikleri ise Tablo 3.3' de gösterilmiştir.

3.2. Oksidatif Radikal Üretimindeki (NBT aktivitesi) Değişimler

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında PBS ile polen enjekte edilen P-1 ve P-10 gruplarının NBT aktivitesinde zamana bağlı olarak oluşan değişimler Tablo 3.4' de sunulmuştur.

Tablo 3.1. Kestane polenin kimyasal analizinden elde edilen sonuçlar

Kuru Madde (%)	90,36 ± 0,42
Kül (%)	3,01 ± 0,04
Ham Lif (%)	3,97 ± 0,26
pH	5,26 ± 0,01
Protein (%)	21,27 ± 0,01
Yağ (%)	1,75 ± 0,42
Şekerler	
Fruktoz (%)	16,81 ± 0,01
Glukoz (%)	15,60 ± 0,17
Galaktoz (%)	5,67 ± 0,36
Sukroz (%)	2,56 ± 0,34

Tablo 3.2. Kestane poleninini yağ asidi profili

Yağ Asidi	Kısaltma	RT (min)	İçerik (%)
Myristic acid	C:14	12,5	1,39
Palmitic acid	C:16	15,3	10,94
Palmitoleic acid	C:16:1	16,4	7,87
Margaoleic acid	C:17:1	18,6	15,51
Stearic acid	C:18	19,8	2,41
Oleic acid	C:18:1	20,9	32,9
Linoleic acid	C:18:2	22,1	11,9
α-Linolenic acid	C:18:3	22,4	5,79
Arachidic acid	C:20	26,0	5,07
Arachidonic acid	C:20:4	29,6	6,08

RT: Hafıza zamanı

Tablo 3.3. Kestane poleninini belirlenen antioksidan özellikleri

	Total Fenolik Madde (mg GAE/kg)	Antiradikal Aktivite (% inhibition)	Total Flavonoid Madde (mg catechin/kg)
Metanolik ekstrakt	16939,9 ± 125,8	95,17 ± 0,21	1778,89 ± 93,88
Su ekstraktı	4664,6 ± 247,8	24,39 ± 1,12	314,05 ± 19,65

GAE: Gallic acid equivalents

P-1 ve P-10 gruplarında NBT aktivitesinin denemenin 3., 7. ve 10. günlerinde kontrol ve PBS gruplarından istatistiksel olarak farklı olduğu görüldü ($p < 0,05$).

Yalnız P-1 ve P-10 grupları karşılaştırıldığında NBT aktivitesinin 3., 7. ve 10. günlerde birbirinden farklılık gösterdiği tespit edildi ($p < 0,05$).

PBS grubundaki NBT aktivitesinin denemenin 3., 7. ve 10. günlerinde kontrol grubundan herhangi bir farklılık göstermediği saptandı ($p > 0,05$).

P-1 grubunda 7. gündeki NBT aktivitesinin 3. gündeki NBT aktivitesinden, 10. gündeki NBT aktivitesinin ise hem 3. hem de 7. gündeki NBT aktivitesinden farklı olduğu görüldü ($p < 0,05$).

P-10 grubunda NBT aktivitesinin 7. günde 3. günden, 10. günde ise hem 3. hem de 7. günden farklılık gösterdiği belirlendi ($p < 0,05$).

Tablo 3.4. Kontrol ve deneme gruplarında oksidatif radikal üretimi (NBT aktivitesi) (mg/ml)

Günler	Deneme Grupları			
	K	PBS	P-1	P-10
3. gün	1,22 ± 0,08 a, A	1,23 ± 0,09 a, A	1,58 ± 0,14 b, A	1,71 ± 0,16 c, A
7. gün	1,23 ± 0,09 a, A	1,22 ± 0,10 a, A	1,86 ± 0,11 b, B	1,98 ± 0,19 c, B
10. gün	1,22 ± 0,07 a, A	1,22 ± 0,09 a, A	1,99 ± 0,15 b, C	2,10 ± 0,15 c, C

^{a,b,c} Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

^{A,B,C} Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

K: Kontrol grubu; PBS: PBS enjekte edilen grup; P-1: 1 mg/kg balık dozunda polen enjekte edilen grup; P-10: 10 mg/kg balık dozunda polen enjekte edilen grup.

3.3. Eritrosit Sayısındaki Değişimler

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında PBS ile polen enjekte edilen P-1 ve P-10 gruplarının eritrosit sayısında zamana bağlı olarak oluşan değişimler Tablo 3.5' de sunulmuştur.

P-1 ve P-10 gruplarında eritrosit sayısının denemenin 3., 7. ve 10. günlerinde kontrol ve PBS gruplarından istatistiksel olarak farklı olduğu görüldü ($p < 0,05$).

Yalnız P-1 ve P-10 grupları karşılaştırıldığında eritrosit sayısının 3., 7. ve 10. günlerde birbirinden farklılık gösterdiği tespit edildi ($p < 0,05$).

PBS grubundaki eritrosit sayısının denemenin 3., 7. ve 10. günlerinde kontrol grubundan herhangi bir farklılık göstermediği saptandı ($p > 0,05$).

P-1 grubunda 3., 7. ve 10. gündeki eritrosit sayıları arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık belirlenmedi ($p > 0,05$).

Benzer şekilde P-10 grubunda da 3., 7. ve 10. gündeki eritrosit sayıları arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık belirlenmedi ($p > 0,05$).

Tablo 3.5. Kontrol ve deneme gruplarında eritrosit (RBC) sayısı ($\times 10^6$)

Deneme Grupları				
Günler	K	PBS	P-1	P-10
3. gün	1,35 \pm 0,12 a, A	1,36 \pm 0,10 a, A	1,58 \pm 0,12 b, A	1,65 \pm 0,16 c, A
7. gün	1,35 \pm 0,11 a, A	1,35 \pm 0,13 a, A	1,60 \pm 0,11 b, A	1,66 \pm 0,15 c, A
10. gün	1,34 \pm 0,10 a, A	1,35 \pm 0,12 a, A	1,59 \pm 0,13 b, A	1,66 \pm 0,13 c, A

^{a,b,c} Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

^{A,B,C} Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

K: Kontrol grubu; PBS: PBS enjekte edilen grup; P-1: 1 mg/kg balık dozunda polen enjekte edilen grup; P-10: 10 mg/kg balık dozunda polen enjekte edilen grup.

3.4. Lökosit Sayısındaki Değişimler

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında PBS ile polen enjekte edilen P-1 ve P-10 gruplarının lökosit sayısında zamana bağlı olarak oluşan değişimler Tablo 3.6' da sunulmuştur.

Tablo 3.6. Kontrol deneme gruplarında lökosit (WBC) sayısı ($\times 10^3$)

Deneme Grupları				
Günler	K	PBS	P-1	P-10
3. gün	36,41 \pm 2,74 a, A	36,75 \pm 2,30 a, A	41,63 \pm 3,11 b, A	47,01 \pm 3,22 c, A
7. gün	36,58 \pm 2,99 a, A	36,11 \pm 2,52 a, A	45,06 \pm 2,60 b, B	50,59 \pm 3,45 c, B
10. gün	35,98 \pm 3,15 a, A	36,19 \pm 2,06 a, A	50,31 \pm 3,79 b, C	54,05 \pm 2,97 c, C

^{a,b,c} Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

^{A,B,C} Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

K: Kontrol grubu; PBS: PBS enjekte edilen grup; P-1: 1 mg/kg balık dozunda polen enjekte edilen grup; P-10: 10 mg/kg balık dozunda polen enjekte edilen grup.

P-1 ve P-10 gruplarında lökosit sayısının denemenin 3., 7. ve 10. günlerinde kontrol ve PBS gruplarından istatistiksel olarak farklı olduğu görüldü ($p < 0,05$).

Yalnız P-1 ve P-10 grupları karşılaştırıldığında lökosit sayısının 3., 7. ve 10. günlerde birbirinden farklılık gösterdiği tespit edildi ($p < 0,05$).

PBS grubundaki lökosit sayısının denemenin 3., 7. ve 10. günlerinde kontrol grubundan herhangi bir farklılık göstermediği saptandı ($p > 0,05$).

P-1 grubunda 7. gündeki lökosit sayısının 3. gündeki lökosit sayısından, 10. gündeki lökosit sayısının ise hem 3. hem de 7. gündeki lökosit sayısından farklı olduğu görüldü ($p < 0,05$).

P-10 grubunda lökosit sayısının 7. günde 3. günden, 10. günde ise hem 3. hem de 7. günden farklılık gösterdiği belirlendi ($p < 0,05$).

3.5. Hematokrit Düzeyindeki Değişimler

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında PBS ile polen enjekte edilen P-1 ve P-10 gruplarının hematokrit düzeyinde zamana bağlı olarak oluşan değişimler Tablo 3.7' de sunulmuştur.

Tablo 3.7. Kontrol ve deneme gruplarında hematokrit (Ht) düzeyi (%)

Deneme Grupları				
Günler	K	PBS	P-1	P-10
3. gün	28,55 ± 3,10	28,87 ± 3,10	35,80 ± 4,40	41,20 ± 4,05
	a, A	a, A	b, A	c, A
7. gün	29,10 ± 3,35	28,65 ± 3,52	36,73 ± 3,65	40,86 ± 3,72
	a, A	a, A	b, A	c, A
10. gün	28,40 ± 2,72	28,90 ± 3,08	36,12 ± 4,21	41,65 ± 4,55
	a, A	a, A	b, A	c, A

^{a,b,c} Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

^{A,B,C} Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

K: Kontrol grubu; PBS: PBS enjekte edilen grup; P-1: 1 mg/kg balık dozunda polen enjekte edilen grup; P-10: 10 mg/kg balık dozunda polen enjekte edilen grup.

P-1 ve P-10 gruplarında hematokrit düzeyinin denemenin 3., 7. ve 10. günlerinde kontrol ve PBS gruplarından istatistiksel olarak farklı olduğu görüldü ($p < 0,05$).

Yalnız P-1 ve P-10 grupları karşılaştırıldığında hematokrit düzeyinin 3., 7. ve 10. günlerde birbirinden farklılık gösterdiği tespit edildi ($p < 0,05$).

PBS grubundaki hematokrit düzeyinin denemenin 3., 7. ve 10. günlerinde kontrol grubundan herhangi bir farklılık göstermediği saptandı ($p > 0,05$).

P-1 grubunda 3., 7. ve 10. gündeki hematokrit düzeyleri arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık belirlenmedi ($p > 0,05$).

Benzer şekilde P-10 grubunda da 3., 7. ve 10. gündeki hematokrit düzeyleri arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık tespit edilmedi ($p > 0,05$).

3.6. Hemogloblin Düzeyindeki Değişimler

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında PBS ile polen enjekte edilen P-1 ve P-10 gruplarının hemogloblin düzeyinde zamana bağlı olarak oluşan değişimler Tablo 3.8' de gösterilmiştir.

Tablo 3.8. Kontrol ve deneme gruplarında hemogloblin (Hb) düzeyi (g/dl)

Deneme Grupları				
Günler	K	PBS	P-1	P-10
3. gün	7,34 ± 0,45	7,32 ± 0,60	9,28 ± 0,52	10,55 ± 0,66
	a, A	a, A	b, A	c, A
7. gün	7,28 ± 0,52	7,35 ± 0,53	9,31 ± 0,80	10,69 ± 0,87
	a, A	a, A	b, A	c, A
10. gün	7,37 ± 0,39	7,33 ± 0,49	9,35 ± 0,59	10,48 ± 0,70
	a, A	a, A	b, A	c, A

^{a,b,c} Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

^{A,B,C} Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

K: Kontrol grubu; PBS: PBS enjekte edilen grup; P-1: 1 mg/kg balık dozunda polen enjekte edilen grup; P-10: 10 mg/kg balık dozunda polen enjekte edilen grup.

P-1 ve P-10 gruplarında hemogloblin düzeyinin denemenin 3., 7. ve 10. günlerinde kontrol ve PBS gruplarından istatistiksel olarak farklı olduğu görüldü ($p < 0,05$).

Yalnız P-1 ve P-10 grupları karşılaştırıldığında hemogloblin düzeyinin 3., 7. ve 10. günlerde birbirinden farklılık gösterdiği tespit edildi ($p < 0,05$).

PBS grubundaki hemogloblin düzeyinin denemenin 3., 7. ve 10. günlerinde kontrol grubundan herhangi bir farklılık göstermediği saptandı ($p > 0,05$).

P-1 grubunda 3., 7. ve 10. gündeki hemogloblin düzeyleri arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık belirlenmedi ($p > 0,05$).

Benzer şekilde P-10 grubunda da 3., 7. ve 10. gündeki hemogloblin düzeyleri arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık tespit edilmedi ($p > 0,05$).

3.7. Total Protein Düzeyindeki Değişimler

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında PBS ile polen enjekte edilen P-1 ve P-10 gruplarının total protein düzeyinde zamana bağlı olarak oluşan değişimler Tablo 3.9' da sunulmuştur.

Tablo 3.9. Kontrol ve deneme gruplarında total protein (TP) düzeyi (mg/ml)

Deneme Grupları				
Günler	K	PBS	P-1	P-10
3. gün	27,33 ± 3,08 a, A	27,19 ± 3,45 a, A	31,45 ± 2,74 b, A	34,20 ± 3,22 c, A
7. gün	27,48 ± 2,16 a, A	27,26 ± 3,96 a, A	35,62 ± 4,07 b, B	38,75 ± 2,47 c, B
10. gün	27,60 ± 3,62 a, A	27,51 ± 3,11 a, A	38,01 ± 4,86 b, C	42,13 ± 5,11 c, C

^{a,b,c} Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

^{A,B,C} Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

K: Kontrol grubu; PBS: PBS enjekte edilen grup; P-1: 1 mg/kg balık dozunda polen enjekte edilen grup; P-10: 10 mg/kg balık dozunda polen enjekte edilen grup.

P-1 ve P-10 gruplarında total protein düzeyinin denemenin 3., 7. ve 10. günlerinde kontrol ve PBS gruplarından istatistiksel olarak farklı olduğu görüldü ($p < 0,05$).

Yalnız P-1 ve P-10 grupları karşılaştırıldığında total protein düzeyinin 3., 7. ve 10. günlerde birbirinden farklılık gösterdiği tespit edildi ($p < 0,05$).

PBS grubundaki total protein düzeyinin denemenin 3., 7. ve 10. günlerinde kontrol grubundan herhangi bir farklılık göstermediği saptandı ($p > 0,05$).

P-1 grubunda 7. gündeki total protein düzeyinin 3. gündeki total protein düzeyinden, 10. gündeki total protein düzeyinin ise hem 3. hem de 7. gündeki total protein düzeyinden farklı olduğu görüldü ($p < 0,05$).

P-10 grubunda total protein düzeyinin 7. günde 3. günden, 10. günde ise hem 3. hem de 7. günden farklılık gösterdiği belirlendi ($p < 0,05$).

3.8. Total İmmunoglobulin Düzeyindeki Değişimler

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında PBS ile polen enjekte edilen P-1 ve P-10 gruplarının total immunoglobulin düzeyinde zamana bağlı olarak oluşan değişimler Tablo 3.10' da sunulmuştur.

Tablo 3.10. Kontrol ve deneme gruplarında total immunoglobulin (TI) düzeyi (mg/ml)

Deneme Grupları				
Günler	K	PBS	P-1	P-10
3. gün	12,28 ± 2,14	12,41 ± 2,60	14,95 ± 2,04	15,86 ± 3,10
	a, A	a, A	b, A	c, A
7. gün	12,33 ± 2,52	12,21 ± 2,22	16,02 ± 3,30	18,75 ± 2,04
	a, A	a, A	b, B	c, B
10. gün	12,15 ± 2,08	12,34 ± 2,86	17,91 ± 3,58	20,06 ± 2,23
	a, A	a, A	b, C	c, C

^{a,b,c} Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

^{A,B,C} Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

K: Kontrol grubu; PBS: PBS enjekte edilen grup; P-1: 1 mg/kg balık dozunda polen enjekte edilen grup; P-10: 10 mg/kg balık dozunda polen enjekte edilen grup.

P-1 ve P-10 gruplarında total immunoglobulin düzeyinin denemenin 3., 7. ve 10. günlerinde kontrol ve PBS gruplarından istatistiksel olarak farklı olduğu görüldü ($p < 0,05$).

Yalnız P-1 ve P-10 grupları karşılaştırıldığında total immunoglobulin düzeyinin 3., 7. ve 10. günlerde birbirinden farklılık gösterdiği tespit edildi ($p < 0,05$).

PBS grubundaki total immunoglobulin düzeyinin denemenin 3., 7. ve 10. günlerinde kontrol grubundan herhangi bir farklılık göstermediği saptandı ($p > 0,05$).

P-1 grubunda 7. gündeki total immunoglobulin düzeyinin 3. gündeki total immunoglobulin düzeyinden, 10. gündeki total immunoglobulin düzeyinin ise hem 3. hem de 7. gündeki total immunoglobulin düzeyinden farklı olduğu görüldü ($p < 0,05$).

P-10 grubunda total immunoglobulin düzeyinin 7. günde 3. günden, 10. günde ise hem 3. hem de 7. günden farklılık gösterdiği belirlendi ($p < 0,05$).

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Herhangi bir yan etkisi olmayan, doğal olarak elde edilebilen ve ayrıca güçlü antioksidan ve antimikrobiyal özelliklere sahip polenin kimyasal özellikleri bölgedeki coğrafik yapıya ve floraya göre değişebilmektedir (Eraslan vd., 2009; Yıldız vd., 2013). Karbaril pestisidine karşı arı polenin koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, kullanılan arı polenin yapısında organik asitler, flavonoidler, esterler, aldehitler, hidrokarbonlar, terpenler, alkol, keton ve diğer bazı bileşikler GC-MS analizi ile belirlenmiştir (Eraslan vd., 2009). Yıldız vd. (2013) tarafından yapılan diğer bir araştırmada ise ratlarda karbon tetraklorid kullanılarak oluşturulan karaciğer hasarına karşı arı polenin koruyucu etkisi incelenmiştir. Sonuçta araştırmada kullanılan ve Zonguldak bölgesinden toplanan polen örneklerinde dominant türün kestane olduğu yapısında nem, kül, protein, nişasta ve yağları içerdiği belirlenmiş, bununla birlikte toplam fenolik madde, total flavonoid ve total karotenoid miktarı gibi antioksidan özellikleri saptanmıştır. Bu çalışmada da kestane tipi polen kullanılmış, polenin kimyasal analiz sonuçlarına göre yapısında nem, kül, protein, nişasta, şeker ve farklı yağ asitleri belirlenmiş ayrıca güçlü antioksidan aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bu bulgular diğer çalışmalardan elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Nonspesifik immün direncin en önemli unsurlarından birini oluşturan fagositoz balıklarda patojenik etkenlere karşı vücudu korumaktadır. Fagositozda makrofajlar ve polimorfnükleer lökositler (özellikle nötrofiller) birinci derecede görev alırlar ve fagositoz olayı kemotaksis, opsonizasyon, absorpsiyon, intraselüler yıkım ve sindirim gibi farklı safhalarda meydana gelir. Fagositik hücrelerin aksiyon mekanizması respiratory burst (solunum patlaması) sırasında reaktif oksijen türlerinin üretilmesi şeklindedir. Nötrofillerin fagositik aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan NBT testi nötrofillerin oksidatif radikal üretiminin belirlenmesi esasına dayanmaktadır (Siwicki ve Studnicka, 1987). El-Asely vd. (2014) tilapia (*Oreochromis niloticus*)' larda polen uygulamasının balıklarda fagositik hücre (nötrofil ve monositler) sayısını denemenin 10 gününde, fagositik oran ve indeksi ise denemenin 10. 20. ve 30. gününde istatistiksel olarak önemli oranda arttırdığını ifade etmiştir. Bir arı ürünü olan ve kimyasal yapısı polenle benzerlik gösteren propolis su ve etanolik ekstraktının *in vivo* olarak enjeksiyonla 5 mg, yemle 0,1 ve 10 g kg⁻¹ dozunda verildiği çipura balıklarında fagosit yüzdesinin arttığı görülmüştür (Cuesta vd., 2005).

Abd-El-Rhman (2009) tarafından da benzer sonuçlar elde edilmiş, aynı balık türüne propolisin etanolik ekstraktının enjekte edilmesiyle fagositik aktivitenin arttığı görülmüştür. Mişe Yonar vd. (2014) tarafından yapılan başka bir çalışmada da 10 mg/kg balık dozunda ve 10 gün süreyle oral yolla uygulanan propolisin sazanlarda NBT aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Benzer şekilde Yöntürk (2018) % 1, 2 ve 4 oranında ve 21 gün süreyle polen içeren yemlerin oral yolla verildiği alabalıklarda NBT aktivitesinin arttığı saptanmıştır. Yukarıdaki çalışmalarla paralel olarak balıklarda immunostimulanların kullanılması sonucunda fagositik hücrelerin sayısının artmasıyla ya da reaktif oksijen türlerinin üretilmesi neticesinde nonspesifik immun cevabın aktive olabileceği belirtilmiştir (Barman vd., 2013). Bu çalışmada NBT aktivitesinde belirlenen artışla bu bilgi teyit edilmiş, polen enjekte edilen P-1 ve P-10 gruplarında NBT aktivitesinin yani nötrofillerin oksidatif radikal üretiminin arttığı görülmüştür.

Balıklarda eritrosit sayısı, hematokrit ve hemoglobin düzeyi ile eritrosit indeksleri (MCV, MCH ve MCHC) gibi hematolojik parametrelerdeki değişimler balık sağlığı için genel bir gösterge olarak kabul edilmekte ve bu parametreler balık sağlığı hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Ayrıca kan parametrelerindeki değişimler normal ve patolojik süreçlerin iyi anlaşılabilmesi hakkında da ipuçları vermektedir (Li vd., 2011; Dotta vd., 2014). Arılardan elde edilen ürünlerin balıklarda bazı hematolojik değerlere etkisini araştıran bazı çalışmalar yapılmıştır. Örneğin Selamoğlu Talas ve Gulhan (2009), güçlü bir antioksidan olan propolisin 0,01 g/L, 0,02 g/L ve 0,03 g/L konsantrasyonlarında uygulandığı alabalıklarda eritrosit sayısı ile hematokrit ve hemoglobin düzeyinin düştüğünü saptamışlardır. Yonar ve Silici (2010), 5 ve 10 g/kg yem dozunda uygulanan propolisin gökkuşağı alabalıklarında eritrosit sayısını önemli oranda arttırdığını belirlemişlerdir. El-Asely vd. (2014) sırasıyla % 1, % 2,5 ve % 4 oranında polen içeren yemlerin uygulandığı tilapia (*Oreochromis niloticus*)' larda hematokrit düzeyinin denemenin 10., 20. ve 30. günlerinde istatistiksel olarak önemli oranda arttığını gözlemlemişlerdir. Tilapiaların hematokrit düzeyinde belirlenen bu artış % 1, 2 ve 4 oranında ve 21 gün süreyle polen içeren yemlerin oral yolla verildiği alabalıklarda da saptanmıştır (Yöntürk, 2018). Talas ve Gulhan (2013) farklı konsantrasyonlarda (0,5, 2,5, 5, 10, 20 ve 30 ppm) 96 saat süreyle uygulanan polen alabalıklarda eritrosit sayısı ile hematokrit ve hemoglobin düzeyini kontrol grubuna göre arttırdığını ifade etmişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada da kontrol ve PBS grubuna göre polen enjekte edilen P-1 ve P-10 gruplarında eritrosit sayısı ile hematokrit ve hemoglobin düzeylerinin istatistiksel

olarak farklılık gösterdiği, yine yalnız polenin uygulandığı P-1 ve P-10 grupları karşılaştırıldığında da gruplar arasında istatistiksel bir farklılığın bulunduğu tespit edilmiştir.

Lökositler nonspesifik bağışıklıkta çok önemli bir rol oynamaktadır. Lökosit sayısı veya aktivitesi balıkların genel sağlık durumunu gösterebilir (Yonar vd., 2019). El-Asely vd. (2014), sırasıyla % 1, % 2,5 ve % 4 oranında ve 30 gün süreyle polenin uygulandığı tilapia (*Oreochromis niloticus*)' larda nötrofil ve monosit sayılarının kontrol grubuna göre çalışmanın 10., 20. ve 30. günlerinde istatistiksel olarak önemli oranda arttığını göstermişlerdir. Talas ve Gulhan (2013) 96 saat süreyle 0.5, 2.5, 5, 10, 20 ve 30 ppm konsantrasyonlarında uygulanan polenin alabalıklarda lökosit sayısını arttırdığını belirtmişlerdir. Polenin 1 ve 10 mg/kg dozunda enjekte edildiği bu çalışmada da yukarıdaki araştırmacıların elde ettiği sonuçlarla uyumlu bir şekilde sazanların lökosit sayısı istatistiksel olarak artmıştır. Bu sonuç polenin immunostimulan etkisini göstermektedir.

Nonspesifik bağışıklığın humoral unsuru olarak kabul edilen. toplam plazma proteini (Jeney vd., 1997) üzerine bitkisel kökenli farklı immnustimulanların etkilerinin araştırıldığı bazı çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin Immanuel vd., (2009) tilapia (*Oreochromis mossambicus*)' da dört farklı bitkisel tıbbi ekstraktın, Das vd., (2013) ise *Labeo rohita* türü balıklarda fesleğen (*Ocimum sanctum*)' in total protein düzeyine etkisini incelemişlerdir. Her iki çalışmada da bitkisel ekstrakt uygulanan balıklarda total protein düzeyinin arttığı görülmüştür. Düğenci vd., (2003) ökseotu, ısırgan otu ve zencefilden oluşan üç farklı bitkisel ekstraktın oral olarak uygulandığı gökkuşağı alabalığında plazma protein düzeyinin kontrol grubuna göre yükseldiğini belirtmişlerdir. Polen kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada ise % 1, % 2,5 ve % 4 düzeyinde polen içeren yemin verildiği tilapia (*Oreochromis niloticus*)' larda total plazma protein düzeyinin % 2,5 ve % 4 oranında polen uygulanan gruplarda istatistiksel olarak önemli oranda arttığı belirlenmiştir (El-Asely vd., 2014). Benzer şekilde % 1, 2 ve 4 düzeyinde ve 21 gün süreyle polenin yemle oral olarak verildiği alabalıklarda da total plazma protein düzeyinin arttığı gözlemlenmiştir Yöntürk (2018). Bu çalışmada P-1 ve P-10 gruplarında total protein düzeylerinin kontrol ve PBS gruplarına göre arttığı saptanmıştır. Bu sonuç yukarıda adı geçen farklı doğal immunostimulan veya polen kullanan araştırmacıların bulgularıyla paralel bulunmuştur.

İmmunoglobülinler balıklarda spesifik bağışıklığın en önemli unsurlarından birisini oluşturmaktadır. Bilindiği gibi antikorlar; vücudun antijenik uyarımları sonucu plazma

hücreleri tarafından sentezlenen ve antijenlerle birleşerek reaksiyon verebilen glikoprotein karakterindeki moleküller olup B lenfositlerin başkalaşması ile ortaya çıkar (Tizard, 1992; Arda vd, 1994; Dalmo vd., 1997; Diker, 1998). Siwicki vd. (1994) farklı immunostimulanların yemle oral olarak uygulandığı alabalıklarda antikor düzeyinin kontrol grubundan yüksek olduğunu belirlemiştir. Çipura balıklarında yapılan bir çalışmada vitamin A, kitin, levamisol gibi immunostimulanların uygulanmasıyla immunoglobulin M düzeyinin arttığı ifade edilmiştir (Cuesta vd., 2004). Bir arı ürünü olan propolis oral ve enjeksiyonla verildiği başka bir çalışmada total immunoglobulin düzeyinin arttığı gözlemlenmiştir (Yonar, 2008). Başka bir arı ürünü olan polenin % 1, 2 ve 4 düzeyinde ve 21 gün süreyle yemle verildiği alabalıklarda da total immunoglobulin düzeyinin arttığı gösterilmiştir (Yöntürk 2018). Benzer şekilde bu çalışmada da polenin oral yolla uygulandığı sazanlarda total immunoglobulin düzeyinde istatistiksel olarak önemli bir artış görülmüştür. Antikor düzeyinde belirlenen artışın nedeni uygulanan polenin yapısında belirlenen yağ asitleri olabilir (Puangkaew vd., 2004).

5. ÖNERİLER

Bu araştırmadan elde edilen sonuçlara göre, sazanlarda bazı hematolojik ve immünolojik parametreler polen enjeksiyonuyla olumlu yönde etkilenmiştir. Bu veriler polenin balıklara immunostimulan olarak uygulanabileceğini göstermiştir. Ayrıca deneme sonuna kadar enjeksiyonla polen verilen balıklarda herhangi bir ölüm olayının gerçekleşmemiş olması bu maddenin güvenle kullanılabileceğini göstermiştir. Fakat başka balık türlerinde farklı doz ve sürelerde ve farklı yöntemlerle polen uygulamasının sonuçlarına ihtiyaç olduğu görülmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Abbass, A.A., El-Asely, A.M., Kandiel, M.M.M.,** 2012. Effects of Dietary Propolis and Pollen on Growth Performance, Fecundity and Some Hematological Parameters of *Oreochromis niloticus*, *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **12**, 851-859.
- Abd-El-Rhman, A.M.M.,** 2009. Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Fish and Shellfish Immunology*, **27**, 454-459.
- AOAC. 920.153.** 2000. Ash of meat. Rockville, MD, USA: AOAC International.
- AOAC. 991.36.** 2000. Fat (crude) in meat and meat products. Rockville, MD, USA: AOAC International.
- AOAC. 960.52.** 2000. Microchemical determination of nitrogen (micro-Kjeldahl method). Rockville, MD, USA: AOAC International.
- Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., İzgür, M., Diker, K.S.,** 1994. İmmunoloji. Medisan Yayınevi, Ankara, 394s.
- Arda, M., Seçer, S., Sarıeyyüpoğlu, M.** 2005. Balık Hastalıkları. Medisan Yayınevi, Ankara, 230s.
- Babior, B.M.,** 1978, Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes, *The New England Journal of Medical*, **298**, 659-667.
- Barman, D., Nen, P., Mandal, SC., Kumar, V.,** 2013. Immunostimulants for aquaculture health management, *Journal of Marine Science: Research & Development*, **3**, 134.
- Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A.,** 2004. Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.), *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **101**, 203-210.
- Cuesta, A., Rodriguez, A., Esteban, M.A., Meseguer, J.,** 2005. *In vivo* effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immun responses, *Fish and Shellfish Immunology*, **18**, 71-80.

- Çankaya, N., Korkmaz, A.,** 2008. Polen. Samsun İl Tarım Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi Yayını, Samsun, 23s.
- Dalmo, R.A., Ingebrigtsen, K., Bogwald, J.,** 1997. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES), *Journal of Fish Diseases*, **20**, 241- 273.
- Darson, M.,** 1981. Role and characterization of fish antibody, *Developmental Biological Standardisation*, **49**, 307-319.
- Das, R., Raman, R.P., Saha, H., Singh, R.,** 2013. Effect of *Ocimum sanctum* Linn. (Tulsi) extract on the immunity and survival of *Labeo rohita* (Hamilton) infected with *Aeromonas hydrophila*, *Aquaculture Research*, 1-13.
- Demir, N.,** 1992, İhtiyoloji. İ.Ü.Yayımları, İnönü Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 390s.
- Diker, S.,** 1998, İmmunoloji. Medisan Yayınevi, Ankara, 304s.
- Dikici, İ.,** 1999. Akut viral hepatitlerle interferon tedavisi görmüş kronik viral hepatitlerde oksidatif stresin araştırılması, *Uzmanlık Tezi*, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Konya.
- Dotta, G., Andrade, J.I.A., Gonçalves, E.L.T., Brum, A., Mattos, J.J., Maraschin, M., Martins, M.L.,** 2014. Leukocyte phagocytosis and lysozyme activity in Nile tilapia fed supplemented diet with natural extracts of propolis and *Aloe barbadensis*, *Fish and Shellfish Immunology*, **39**, 280-284.
- Drabkin, D.L.,** 1946. The crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species, *Journal of Biological Chemistry*, **64**, 703-723.
- Düğenci, S.K., Arda, N., Candan, A.,** 2003. Some medicinal as immunostimulant for fish, *Journal of Ethnopharmacology*, **88**, 99-106.
- El-Asely, A.M., Abbass, A.A., Austin, B.,** 2014. Honey bee pollen improves growth, immunity and protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against infection with *Aeromonas hydrophila*, *Fish and Shellfish Immunology*, **40**, 500-506.
- Ellis, A. E.,** 1976. Leucocytes and related cells in the plaice (*Pleuronectes platessa*), *Journal of Fish Biology*, **8**, 143-156.

- Ellis, A. E.**, 1977. The leucocytes of fish: a review, *Journal of Fish Biology*, **11**, 453-491.
- Ellis, A. E.**, 1981. Non-specific defense mechanisms in fish and their role in disease processes, *Developmental Biological Standardisation*, **49**, 337-352.
- Ellis, A.E.**, 1988. Vaccination against enteric redmouth (ERM). In: Ellis, A.E. (ed) Fish vaccination, Academic Press, London, 85-92 pp.
- Ellis A.E.**, 1999. Immunity to bacteria in fish, *Fish and Shellfish Immunology*, **9**, 291–308.
- Eraslan, G., Kanbur, M., Silici, S.**, 2009. Effect of carbaryl on some biochemical changes in rats: The ameliorative effect of bee pollen. *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 86–91.
- Ergönül, M.B., Yavuzcan, H., Altındağ, A.**, 2012. Balık Sağlığı ve İmmunostimulanların Kullanımı, *Journal of FisheriesSciences.com*, **6 (3)**, 188-202.
- Finn, J. P. and Nielson, N.O.**, 1971. Effect of temperature on inflammatory response in rainbow trout, *Journal of Pathology and Bacteriology*, **105**, 257-268.
- Fişne, A.**, 2016. Trabzon yöresi ballarında polen analizi. *Doktora Tezi*, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Grinde, B., Lie, Ø., Poppe, T., Salte, R.**, 1988. Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture, *Aquaculture*, **68**, 299-304.
- Gülhan, M.F.**, 2014. Nitrik oksit sentaz blokajı ile hipertansiyon oluşturulan sıçanlarda propolis, cape ve polen'in kan basıncı, adma, NF-KB ve paraoksanaz düzeylerine etkileri. *Doktora Tezi*, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Niğde.
- Gyamfi, M.A., Yonamine, M., Aniya, Y.**, 1999. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. *General Pharmacology* 32(6), 661-667.
- Immanuel, G., Uma, R.P., Iyapparaj, P., Citarasu, T., Punitha Peter, S.M., Babu, M.M.**, 2009. Dietary medicinal plant extracts improve growth, immune activity and survival of tilapia *Oreochromis mossambicus*, *Journal of Fish Biology*, **74**, 1462-1475.
- ISO 659:** 2009. Oilseeds – determination of oil content (reference method). Geneva Switzerland: International Organization for Standardization (ISO).

- ISO 12966-2:** 2011. Animal and vegetable fats and oils – gas chromatography of fatty acid methyl esters – Part 2: preparation of methyl esters of fatty acids. Geneva Switzerland: International Organization for Standardization (ISO).
- Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Z., Anderson, D. P.,** 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan, *Aquaculture*, **154**, 1-15.
- Jiang, Q, Goetz, F.W., Place, A.R.,** 2004. Chitinase a new member of the fish innate immune repertoire. Sixth International Symposium on Fish Immunology, May 24-29, Turku, Finland. Poster 14 (handbook), 51 p.
- Jolles, P., Jolles, J.,** 1984. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **63**,165-89.
- Lange, S.R, Bambir, S., Dodds, A.W., Magnadottir, B.,** 2004a. An immunohistochemical study on complement component C3 in juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.), *Developmental and Comparative Immunology*, **28**, 593-601.
- Lange, S.R., Bambir, S., Dodds, A.W., Magnadotti, B.,** 2004b. The ontogeny of complement component C3 in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) an immunohistochemical study, *Fish and Shellfish Immunology*, **16**, 359-367.
- Leblanc, B. W. Davis, O. K., Boue, S., DeLucca, A., Deeby, T.,** 2009. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen, *Food Chemistry*, **115**, 1299-1305.
- Li, Z.H., Velisek, J., Grabic, R., Li, P., Kolarova, J., Randak, T.,** 2011. Use of hematological and plasma biochemical parameters to assess the chronic effects of a fungicide propiconazole on a freshwater teleost. *Chemosphere*, **83**: 572–578.
- Magnadottir, B., Lange, S., Gudmundsdottir, S., Bogwald, J., Dalmo, R.A.,** 2005. Ontogeny of humoral immune parameters in fish, *Fish and Shellfish Immunology*, **19**, 429-439.
- Magnadottir, B.,** 2006. Innate immunity of fish (overview), *Fish and Shellfish Immunology*, **20**, 37-151.
- McL Pres, C., Evensen, Q.,** 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes, *Fish and Shellfish Immunology*, **9**, 309-318.

- Miše Yonar, S., Ural, MŞ., Silici, S., Yonar, M.E.,** 2014. Malathion-induced changes in the haematological profile, the immune response, and the oxidative/antioxidant status of *Cyprinus carpio carpio*: Protective role of propolis, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **102**, 202–209.
- Murai, T., Kodama, H., Naiki, M., Mikami, T., Izawa, H.,** 1990. Isolation and characterization of rainbow trout C-reactive protein, *Developmental and Comparative Immunology*, **14**, 49-58.
- Nakanishi, Y., Kodama, H., Murai, T., Mikami, T., Izawa, H.,** 1991. Activation of rainbow trout complement by C-reactive protein, *American Journal of Veterinary Research*, **52**, 397-401.
- Peleteiro, M.C., Richards, R.H.,** 1990. Phagocytic cells in the epidermis of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, *Journal of Fish Diseases*, **13**, 225-232.
- Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T., Watanabe, T.,** 2004. Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids, *Fish and Shellfish Immunology*, **16**, 25-39.
- Roberts, R. J.,** 1978. *Fish Pathology*, Bailliere Tindal, London, 368 p.
- Sağlam, N., Yonar, M.E.,** 2009. Effects of sulfamerazine on selected haematological and immunological parameters in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792), *Aquaculture Research*, **40**, 395-404.
- Sakai, M.,** 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, **172**, 63 – 92.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A.,** 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**, 144-158.
- Siwicki, A., Studnicka, M.,** 1987. The phagocytic ability of neutrophils and serum lysozyme activity in experimentally infected carp *Cyprinus carpio* L, *Journal of Fish Biology*, **31** (Supplement A), 57-60.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L.,** 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against frunculosis, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **41**, 125-139.

- Stephensen, E., Sturve, J., Forlin, L.,** 2002. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver, *Comparative Biochemistry and Physiology C*, **133**, 435- 442.
- Selamoglu Talas, Z., Gulhan, M.F.,** 2009. Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**, 1994-1998.
- Talas, Z.S.,Gulhan, M.F.,** 2013. *Effects of various pollen concentrations on some biochemical and hematological parameters and paraoxanase activity in Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*, *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12 (4), 928-938.
- Tizard, I.,** 1992, *Veterinary Immunology an Introduction*. W.B.Saunders Company, Pennsylvania, 498 p.
- Tümerdem, Ç.,** 2016. Beypazarı ballarında polen analizi. *Yüksek Lisans Tezi*, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Ulusoy E., Kolaylı, S.,** 2014. Phenolic composition and antioxidant properties of Anzer Bee pollen, *Journal of Food Biochemistry*, **38(1)**, 73-82
- Van Muiswinkel, W.B.,** 1992. Fish immunology and fish health, *Netherlands Journal of Zoology*, **42**, 494-499.
- Xu, X., Sun, L., Dong, J., Zhang, H.** 2009. Breaking the cells of rape bee pollen and consecutvive extraction of functional oil with superficial carbon oxide, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **10**, 42-46.
- Yang, X., Guo, D., Zhang, J., Wu, M.,** 2007. Characterization and anti-tumor activity of pollen polysaccharide, *International Immunopharmacology*, **7(3)**, 401-408.
- Yıldız, O., Can, Z., Saral, Ö., Yuluğ, E., Öztürk, F., Aliyazicioğlu, R., Canpolat, S., Kolaylı, S.,** 2013. Hepatoprotective Potential of Chestnut Bee Pollen on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Damages in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-9.
- Yonar, M.E.,** 2008. *Yersinia ruckeri* ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’nın tedavisinde propolisin kullanılması, *Doktora Tezi*, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Yonar, M.E., Silici, S.,** 2010. Gökkuşağı alabalığı, *Oncorhynchus mykiss*, (Walbaum, 1792)’nın bazı kan parametrelerine propolisin etkisinin araştırılması, *e- Journal of New World Sciences Academy*, **5(3)**, 231-240.

Yonar, M.E., Mişer Yonar, S., İspir, Ü., Ural, M.Ş., 2019. Effects of curcumin on haematological values, immunity, antioxidant status and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes*, *Fish & Shellfish Immunology*, **89**, 83-90.

Yöntürk, Y., 2017. Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, W.)' nda arı polenin antioksidan ve immunostimulan etkisinin araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.



7. ÖZGEÇMİŞ

Ankara’da 14.12.1977 tarihinde doğdum. İlköğretim ve lise öğrenimimi Ankara’da tamamladım. 1996 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Gemi İnşaatı ve Makineleri Mühendisliği Bölümünü kazandım. Aynı fakülteden 2000 yılında mezun oldum. 2001 yılında Jandarma Astsubay Sınıf Okulunu kazandım ve 2002 yılında mezun oldum. 2002 yılından itibaren Jandarma Teşkilatı’nda Astsubay olarak görev yapmaktayım. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı’nda 2016 yılında yüksek lisans yapmaya başladım. Halen bu eğitime devam etmekteyim. Evli ve iki çocuk babasıyım.

Erkan KOLGAR