



**GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI
(*Oncorhynchus mykiss*, W.)' NDA ARI POLENİNİN
ANTIÖKSİDAN VE İMMUNOSTİMULAN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yassir YÖNTÜRK

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

Danışman: Doç. Dr. M. Enis YONAR

ARALIK-2017

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*, W.)' NDA ARI POLENİNİN
ANTIOKSİDAN VE İMMUNOSTİMULAN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

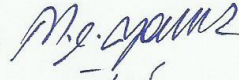
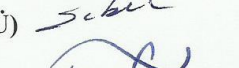

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yassir YÖNTÜRK

(121128102)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 07 Kasım 2017
Tezin Savunulduğu Tarih : 30 Kasım 2017

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

KASIM-2017

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Muhammet Enis YONAR'a, 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.

Yassir YÖNTÜRK
ELAZIĞ- 2017

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. Polen	2
1.1.2. Balıklarda İmmun Sistem	4
1.1.3. Paroksanaz ve Arilesteraz	7
1.1.4. Balıklarda Serbest Radikaller ve Antioksidanlar	9
1.1.4.1. Lipid Peroksidasyon ve Malondialdehit (MDA)	10
1.1.5. Antioksidan Savunma Sistemleri	12
1.1.5.1. Glutasyon	12
1.1.5.2. Glutasyon Peroksidaz	13
1.1.5.3. Glutasyon-S-Transferaz	14
2. MATERYAL ve METOT	16
2.1. Materyal	16
2.1.1. Araştırma Yeri	16
2.1.2. Balık Materyali	16
2.1.3. Polen Örnekleri	16
2.1.4. Araştırmada Kullanılan Araç-Gereçler ve Kimyasal Maddeler	17
2.2. Metot	20
2.2.1. Polen Örneklerinin Analizi	20
2.2.2. Deneme Yemlerinin Hazırlanması	20
2.2.3. Deneysel Plan	20
2.2.4. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması	21
2.2.5. Hematokrit (Ht) Düzeyinin Belirlenmesi	22
2.2.6. Oksidatif Radikal Üretiminin (Nitrobluetetrazolium-NBT aktivitesi) Belirlenmesi	22

2.2.7.	Toplam Protein (TP) Düzeyinin Belirlenmesi	22
2.2.8.	Toplam İmmunoglobulin (TI) Düzeyinin Belirlenmesi	22
2.2.9.	Paraoksonaz (PON) ve Arilesteraz (ARE) Aktivitesinin Ölçülmesi	23
2.2.10.	Malondialdehid (MDA) Düzeyinin Belirlenmesi	23
2.2.11.	Redükte Glutatyon (GSH) Düzeyinin Belirlenmesi	23
2.2.12.	Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesinin Ölçülmesi	24
2.2.13.	Glutatyon S-transferaz (GST) Aktivitesinin Belirlenmesi	24
2.2.14.	Protein Düzeyinin Belirlenmesi	24
2.2.15.	İstatistiksel Analizler.....	24
3.	BULGULAR	25
3.1.	Polen Örneklerinin Analizi	25
3.2.	Hematokrit (Ht) Düzeyindeki Değişimler	26
3.3.	Oksidatif Radikal Üretimindeki (Nitrobluetetrazolium-NBT aktivitesi) Değişimler	27
3.4.	Toplam Protein (TP) Düzeyindeki Değişimler	27
3.5.	Toplam İmmunoglobulin (TI) Düzeyindeki Değişimler	28
3.6.	Paraoksonaz (PON) ve Arilesteraz (ARE) Aktivitesindeki Değişimler..	28
3.7.	Malondialdehid (MDA) Düzeyindeki Değişimler	29
3.8.	Redükte Glutatyon (GSH) Düzeyindeki Değişimler	30
3.9.	Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesindeki Değişimler	31
3.10.	Glutatyon S-transferaz (GST) Aktivitesindeki Değişimler	32
4.	SONUÇLAR ve TARTIŞMA	33
5.	ÖNERİLER	39
	KAYNAKLAR	40
	ÖZGEÇMİŞ	52

ÖZET

Bu çalışmada; gökkuşuğu alabalığında bazı immunolojik ve oksidan/antioksidan parametreler üzerine arı polenin etkisi araştırıldı. Araştırmada; ortalama ağırlığı 100 ± 10 g olan toplam 120 adet gökkuşuğu alabalığı kullanıldı. % 1, % 2 ve % 4 oranında polen içeren yemler 21 gün süreyle balıklara verildi. Deneme sonunda balıklardan alınan kan ve doku (karaciğer, böbrek ve dalak) örneklerinde immunolojik parametreler (hematokrit düzeyi, oksidatif radikal üretimi (nitrobluetetrazolium-NBT aktivitesi), total protein ve total immunoglobulin düzeyleri) ile oksidan/antioksidan parametreler (paraoksonaz ve arilesteraz enzim aktiviteleri, malondialdehit ve redükte glutatyon düzeyleri, glutatyon peroksidaz ve glutatyon-S-transferaz aktiviteleri) için analiz edildi.

Kontrol grubuna göre polen uygulanan grupların hematokrit, oksidatif radikal üretimi, total protein ve immunoglobülin düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir artış tespit edildi ($p < 0,05$). Kontrol grubuna göre polen uygulanan grupların doku malondialdehit düzeylerinin düştüğü, redükte glutatyon düzeyleri ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinin ise arttığı belirlendi ($p < 0,05$). Polen uygulanan grupların paraoksonaz, arilesteraz ve glutatyon S-transferaz aktivitelerinde ise kontrol grubuna göre istatistiksel herhangi bir farklılık bulunmadı ($p > 0,05$).

Anahtar Kelimeler: Antioksidanlar, Arı poleni, Bağışıklık, Balık, Oksidatif stres.

SUMMARY

Investigation of Antioxidant and Immunostimulant Effect of Bee Pollen on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.)

In this study, effects of bee pollen on immunological and oxidant/antioxidant parameters of rainbow trout (*O. mykiss*) were investigated. In the research, total 120 rainbow trout that averagely weighted 100 ± 10 g were used. Diets containing % 1, % 2 and % 4 pollen were given to the fish for 21 days. Blood and tissue (liver, kidney, and spleen) samples were collected at the end of the experiment and analysed to determine the immunological parameters (haematocrit level, oxidative radical production (nitroblue tetrazolium-NBT activity), total plasma protein and total immunoglobulin levels) and oxidant/antioxidant status (paraoxonase and arylesterase enzyme activities, malondialdehyde and reduced glutathione levels and glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase activities).

There was a statistically significant increase in haematocrit level, oxidative radical production, total protein and immunoglobulin levels of pollen-treated groups when compared to the control group ($p < 0.05$). The tissue malondialdehyde levels of the pollen-treated groups were decreased, while the reduced glutathione levels and the glutathione peroxidase activities were increased when compared to the control group ($p < 0.05$). No statistically significant change in the paraoxonase, arylesterase and glutathione S-transferase activities was observed between the pollen-treated groups and the control group ($p > 0.05$).

Key Words: Antioxidants, Bee pollen, Fish, İmunity, Oxidative stress.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan gökkuşuğı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) 17



TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Araştırmada kullanılan kimyasal maddeler	18
Tablo 2.2. Araştırmada kullanılan araç ve gereçler	19
Tablo 3.1. Kestane polenin kimyasal analiz sonuçları	25
Tablo 3.2. Kestane polenin antioksidan özellikleri	25
Tablo 3.3. Kestane poleni yağının yağ asidi profili	26
Tablo 3.4. Kontrol ve deneme grubu balıklarında Hematokrit (Ht) düzeyi, Oksidatif radikal üretimi (NBT aktivitesi), Total protein (TP) ve Total İmmunoglobulin (TI) düzeyleri	27
Tablo 3.5. Kontrol ve deneme grubu balıklarının serum PON ve ARE aktivitesindeki değişimler	28
Tablo 3.6. Kontrol ve deneme grubu balıklarının karaciğer, böbrek ve dalak dokularındaki MDA düzeyi.....	29
Tablo 3.7. Kontrol ve deneme grubu balıklarının karaciğer, böbrek ve dalak dokularındaki GSH düzeyi.....	30
Tablo 3.8. Kontrol ve deneme grubu balıkların karaciğer, böbrek ve dalak dokusunda GSH-Px aktivitesindeki değişimler	31
Tablo 3.9. Kontrol ve deneme grubu balıklarının karaciğer, böbrek ve dalak dokularındaki GST aktivitesi	32

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun artışına paralel olarak, insan beslenmesinde önemli bir yeri olan protein kaynaklarının sınırlı olması dikkatleri su ürünlerine yöneltmiştir. Su ürünleri açısından su kaynaklarından yararlanma avcılık ve yetiştiricilik şeklinde olmaktadır. Gelişen teknolojiyle birlikte sanayileşmenin artması, denizlerin ve iç suların giderek kirlenmesine ve bu kaynaklardan yararlanma oranının en az düzeye inmesine yol açmaktadır. Bu nedenle son zamanlarda ülkemizde ve dünyada kültür balıkçılığına verilen önem bir hayli artmıştır.

Yaşadıkları ortamdan dolayı balıklar, birçok enfeksiyonla doğal olarak karşılaşmaktadır. Yetiştiriciliğin yoğun olarak yapıldığı yerlerde enfeksiyöz hastalıklar balıklar için büyük bir tehlike oluşturmaktadır. Bir balıkta başlayan hastalık çok kısa zamanda diğerlerine bulaşmakta ve yayılmaktadır (Ellis, 1988; Arda vd., 2005).

Balıklarda görülen hastalıklarının tedavisi için çeşitli kemoterapötik maddeler uzun zamanlardan beri kullanılmaktadır. Ancak kemoterapötiklerin önemli yan etkilerinin olması, balıklarda özellikle böbrek ve karaciğer başta olmak üzere bağırsak ve deri gibi organları tahrip etmesi, kaslarda birikerek insanlara geçmesi, bakterilerin bu ilaçlara karşı direnç kazanması ve dibe çökerek sedimentasyon oluşturması, immun sistemi supresif yönden etkilemesi, kısa bir süre için etkili olması, oksidatif strese neden olması ve antioksidan mekanizmayı baskılaması, bütün enfeksiyonlara karşı kullanılamaması bu ilaçların kullanımını sınırlandırmaktadır (Grondel vd., 1987; Björklund vd., 1991; Uno vd., 1993; Inglis vd., 1996; Sakai, 1999; Arda vd., 2005; Sağlam ve Yonar, 2009). Bu yüzden enfeksiyöz hastalıkların kimyasal maddeler kullanılarak kontrol altına alınmasında önemli problemlerle karşılaşmıştır. Bu nedenle son zamanlarda hastalığın çıkmasını engelleyecek korunma önlemlerinin alınması, aşılama, doğal ya da sentetik immunostimulanlar ile balıkların direncini azaltarak hastalıkların oluşumuna neden olan stres faktörlerine karşı antioksidanların kullanılabilirliği konusu bir hayli 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.

Tohumlar oluşmadan önce açan çiçeklerin, orta kısmında erkek üreme organlarının başlık bölümünde bulunan ve bitkinin tüm kalıtsal özelliklerini taşıyan, küçük hücrelerden

oluşan tozlar polen olarak isimlendirilmektedir. Çiçekli bitkilerin erkek cinsiyet hücreleri olan polen, dişi organın tozlaşması görevini yapar. Arıların büyümesi ve salgı bezlerinin gelişmesi için gerekli olan başlıca protein kaynağı polendir. Arı kolonisinin yavru üretip devamlılığını sağlaması ancak polenle mümkün olabilmektedir. Polenler bitkilerin çiçeklenme dönemleri boyunca görülürler ve çiçek tozu olarak da adlandırılırlar. Genelde sarı renkli olup kremden siyaha kadar değişen farklı renklerde de olabilirler (Çankaya ve Korkmaz, 2008). Polen antibakteriyel, antifungal, antikarsinojenik ve antioksidan özelliklere sahip immunomodulator yapıda bir madde olup, içerdiği besin maddeleri nedeniyle son zamanlarda oldukça fazla dikkat çekmektedir (Yang vd., 2007; Eraslan vd., 2009; Xu vd., 2009; Abbass vd., 2012). Polenin yapısında esas olarak yüksek oranda protein ve karbonhidrat bulunmakla birlikte yağ asitleri, vitaminler, mineral maddeler, enzimler ve aminoasitler yapılan analizler sonucunda belirlenmiştir. Ayrıca polende karotenoidler, steroidler, flavonoidler ve renk maddelerinin varlığı da kanıtlanmıştır (Abbas vd., 2012).

Balık hastalıkları nedeniyle meydana gelen 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 adamlarını balık hastalıklarına karşı immüno stimulanların kullanımını araştırmaya ve balık sağlığını arttırmaya sevk etmiştir (Ergönül vd., 2012).

Bu araştırmada immüno stimulan ve antioksidan özellikteki arı poleninin balıklarda kullanılabilirliğinin, balıklara oral yolla verilecek arı poleninin farklı dozlardaki olumlu veya olumsuz etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu tez çalışması; Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (FÜBAP) tarafından SÜF.17.03. nolu proje olarak desteklenmiştir.

1.1. Literatür Bilgisi

1.1.1. 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 kromozomlu mikrosporlardır (Fişne, 2016). Polenler mikrospor ana hücrelerinin 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) ulaşım; 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 arılarıdır 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 yanı sıra 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, izölösün, glutamin ve valin'dir. Bu aminoasitlerin polendeki oranları %7-30 arasında

değişiklik göstermekte olup, polen içerisinde en fazla bulunan aminoasitler lösin (%7.1) ve lizin (%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 aliminyum, 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 bildirmiştir. 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).

İmmün 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 immünooglobulinlerdir. Glikoprotein karakterinde olup B lenfositlerinin başkalaşımı sonucu oluşan, plazma hücreleri tarafından sentezlenip antijenlerle birleşerek spesifik bir reaksiyon veren immünooglobulinler, diğer bir ifadeyle antikorlar, balıklarda serumda, doku sıvılarında, sindirim kanalında ve mukusta bulunmaktadır. Memelilerde IgG, IgM, IgA, IgE ve IgD olmak üzere beş immünooglobulin 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 immünooglobulinin 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 fagosite 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 karşılaştığı 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⁻) radikalinin 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 ve diğ., 2004b; Magnadottir vd., 2005).

1.1.3. Paraoksonaz ve Arilesteraz

Aynı gen tarafından kodlanan ve karaciğerde sentezlenen paraoksonaz, arildialkilfostafaz sınıfı bir ester hidrolaz enzimidir. Kolinesterazların güçlü bir inhibitörü olan paraoksonaz, hem arilesteraz (ARE; E.C. 3.1.1.2) hem de paraoksonaz (PON; E.C.3.1.8.1) aktivitesi gösterir. Fizyolojik substrat(lar)’ı henüz tam olarak tanımlanmamakla birlikte PON’un organofosfat bileşiklerinin hidrolizini katalizlemektedir. Bu nedenle PON ksenobiyotikler ve toksikolojik çalışmalar için büyük önem taşımaktadır (Başkol ve Köse, 2004). Kolinesterazların güçlü bir inhibitörü olan parationu hidrolize edebilme yeteneğindeki PON, diizopropil florofosfat gibi organik fosforlu insektisitlerle aynı kimyasal grupta yer alan tabun, sarin gibi sinir gazlarının, çeşitli karbamatların ve

daha birçok aromatik karboksilik asit esterlerinin hidrolizini katalizlemektedir. Başlangıçta sadece organofosfatlı bileşiklerin hidrolizini katalizlediği düşünülen bu enzimin daha sonra ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıklarda, vasküler disfonksiyon ve endotel hasarının önlenmesinde etkili olduğu yapılan çalışmalarla açığa çıkarılmıştır (Gülhan, 2014).

İlk olarak 1953 yılında Aldridge tarafından insan kan serumunda PON' un varlığı belirlenmiştir. PON' un aktivitesinden sorumlu genin multigen ailesinin bir üyesi olduğu, insanlarda ve farelerde aynı kromozom üzerinde birbirine komşu üç ayrı PON geni (PON1, 2, 3) bulunduğu 1996 yılında tespit edildiği için sırasıyla PON1, PON2 ve PON3 olarak adlandırılmıştır. PON1 aktivitesi genel olarak PON aktivitesi olarak kabul edilmektedir. PON1 ile aynı şekilde PON3 enzimi de genel olarak karaciğerde sentezlenmekte ve serumda HDL'ye bağlı olarak bulunmaktadır. Diğer üyelerden farklı olarak PON2 plazmada bulunmamakta, ancak karaciğer, beyin, böbrek ve testis gibi farklı dokularda sentezlenmektedir. PON polimorfizm gösteren bir enzim olup bu polimorfizminin nedeni molekülün 192. pozisyonundaki amino asit farklılığıdır. PON polimorfik değişim göstermesine rağmen ARE enzimi genetik polimorfik bir değişim göstermemektedir. Diğer taraftan her iki enzimin doğal substratları farklı olmasına karşın PON enzimi ARE'nin doğal substratı olan fenil asetatı da hidroliz edebilme yeteneğindedir. PON ve ARE'nin ortak özellikleri arasında organofosfatları, aril ve alkil halojenurleri hidroliz etme yetenekleri bulunmaktadır. LDL'yi oksidasyondan koruyan özelliği ve hidrojen peroksit de dahil diğer serbest radikalleri nötralize etme kabiliyetinden dolayı PON enzimi antioksidan etki de göstermektedir. PON'daki değişimlerden etkilenmeyen ARE ise asıl proteinin göstergesi olarak kabul edilmektedir (Başkol ve Köse, 2004; Türkoğlu vd., 2008).

Bir organofosfat bileşik olan paratyonun aktif katabolik metaboliti olan paraokson (o,o-dietil-o-p-nitrofenil fosfat), PON' un aktivitesinin belirlenmesinde en çok kullanılan substratların başında gelmektedir. PON' un aktivitesi sonucu açığa çıkan p-nitrofenol veya fenolün konsantrasyonuyla PON aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir. PON' un hem aril esteraz hem de paroksonaz aktivitesini ölçmede en sık kullanılan substrat paraokson (O, O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat) iken, arilesteraz aktivitesini ölçmede ise substrat olarak yalnız fenil asetat kullanılmaktadır (Başkol ve Köse, 2004).

PON' un fonksiyonlarını şu şekilde sıralamak mümkündür;

1. Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu gerçekleştirmek için oksidasyon, redüksiyon, hidroliz ve konjugasyon gibi reaksiyonları gerçekleştirmek (Rodrigo vd., 2001).

2. PON1'in en iyi bilinen fonksiyonu, hidroliz yoluyla organofosfat türevi sinir gazlarının ve insektisitlerin zararsız hale getirilmesidir. Organofosfatlı bileşiklerden paratiyon ve klorpiroposokson ile sarin gibi sinir gazları, PON'un başlıca substratlarıdır. (Başkol ve Köse, 2004). Diğer taraftan dolaşımdaki organofosfatları hidrolize ederek, sinir sistemini koruyan bir enzim olarak da PON görev yapmaktadır (Durrington vd., 2001).

3. HDL kompleksinin, gram negatif enfeksiyonlar sonucu oluşan endotoksemiye karşı savunmada görev aldığı; bakteriyel lipoprotein polisakkarid ile makrofaj spesifik protein CD14 arasındaki etkileşimin, henüz tam olarak bilinmeyen bir mekanizmayla HDL tarafından engellendiği son yıllarda ifade edilmektedir. Ayrıca PON1'in sitokin salınımının önlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (La Du vd., 1999).

3. Lipid peroksidasyonu sadece LDL'de değil; aynı zamanda HDL'deki lipidlerde de oluşmaktadır. PON'un hem LDL'yi, hem de HDL'yi oksidasyondan koruduğu, PON'un HDL vasıtasıyla antioksidan etkiye katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir. HDL'nin LDL oksidasyonu üzerindeki koruyucu etkisinin PON'dan kaynaklandığı ileri sürülmektedir. PON'un, Cu^{+2} tarafından indüklenen lipoprotein oksidasyonunu *in vitro* olarak engellediği, PON inhibitörlerinin reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve Cu^{+2} 'nin neden olduğu HDL oksidasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte PON'un makrofajlardan kolesterol çıkışını artırdığı da ifade edilmiştir (Başkol ve Köse, 2004).

1.1.4. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Atomlarda bulunan elektronlar orbital üzerinde çift olarak bulunurlar. Birçok molekül çift elektronlu olduğu halde bazıları tek elektronlu yani eksik elektronludur. Eksik elektronlu bu moleküller ortamda bulunan diğer moleküllerle etkileşerek ya bir elektron alırlar ya da bir elektron verirler. Bu şekilde etkileşime girdiği maddenin yapısını bozan bu moleküllere serbest radikaller, reaktif oksijen türleri ya da oksidan moleküller denir (Delibaş ve Özcankaya, 1995; Benzer, 2001). Yüksek bir reaktif yapıya sahip olan serbest radikaller diğer moleküller ile reaksiyona girme ve onların yapılarını bozma eğilimindedirler. Serbest radikaller radikal olmayan yapıları radikal hale dönüştürürken bu olay zincir reaksiyon (reaksiyon zinciri) şeklinde sürmekte, zincir reaksiyon ise "bitirme (son) reaksiyonu" oluşana kadar, diğer bir ifadeyle iki radikal yapı radikal olmayan bir başka yapıyı oluşturana dek devam etmektedir (Çakır Atabek, 2012).

Serbest radikaller stabil olmayıp son derece reaktifler ve kararlı hale geçebilmek için elektron arar ve diğer moleküllerden elektron kopararak daha kararlı hale geçerler. Ancak elektron kaybeden moleküller ise kararsız hale geçerek serbest radikal özelliği kazanmaktadırlar. Serbest radikaller, tek elektron eksiklikleri nedeniyle başka moleküller ile kolayca elektron alışverişi yapabilen ve moleküler oksijenden su oluşuncaya kadar meydana gelen radikaller (süperoksid radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($\cdot OH$), alkoksil radikali ($RO\cdot$) ve peroksil radikali ($ROO\cdot$)) ve elektron eksikliği olmamasına rağmen başka moleküllerle radikallerden daha zayıf bir şekilde birleşebilen non-radikaller (hidrojen peroksit (H_2O_2), lipid hidroperoksit ($ROOH$) ve hipokloröz asit ($HOCl$)) olmak üzere ikiye ayrılırlar (Cheeseman ve Slater, 1993; Benzer, 2001).

Normal fizyolojik şartlarda antioksidanlar genellikle serbest radikallerin dolaşımını etkili bir şekilde kontrol ederek hücre hasarını sınırlandırmaktadırlar. Ancak, biyolojik sistemlerde serbest radikallerin oluşumu ve antioksidan seviye arasındaki dengenin serbest radikallerin oluşumu yönüne kayması durumunda oksidatif stres durumu ortaya çıkmaktadır (Çakır Atabek, 2012).

1.1.4.1. Lipid Peroksidasyon ve Malondialdehit (MDA)

Hücre zarında bulunan yağlar reaktif oksijen türleri tarafından saldırıya uğradığında lipidlerden bir elektron alınır ve lipid peroksit radikali oluşur (Benzer, 2001). Lipid peroksidasyonu olarak isimlendirilen bu olay sırasında oluşan aldehitlerden malondialdehit ve 4-hidroksi-nonenal oluşum yerlerinden kolayca difuz edilerek hücrenin diğer bölümlerinde hasara yol açar. Peroksidasyon sonucu oluşan malondialdehit, membran bileşenlerinin çapraz bağlanmalarına ve polimerizasyonuna yol açar. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre bileşenlerinin özelliklerinin değişmesine sebep olur (Akkuş, 1999).

Karbonhidrat, protein ve vitamin gibi biyomoleküllerin tamamı oksidanlar tarafından etkilenmelerine rağmen lipidler en hassas olanlarıdır. Doymamış yağ asitleri (PUFA)'nin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyon olarak tanımlanmaktadır ve bu olay kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerlediği için oldukça zararlıdır (Köse ve Doğan, 1992; Benzer, 2001).

Lipid peroksidasyon, organizmadaki bir serbest radikalın etkisiyle membranda bulunan PUFA zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla başlar. Bunun

sonucu olarak yağ asidi zinciri bir lipid radikali (L[•]) özelliği kazanır. Dayanaksız bir bileşiktir olan lipid radikali bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle dien konjugantları meydana gelir ve sonra lipid radikalının moleküler oksijenle etkileşimiyle lipid peroksit (LOO) radikali oluşur. Oluşan bu son radikal membran bulunan diğer PUFA' ları etkileyerek yeni zincir tepkimelerini başlatırken, kendileride açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksidlerine (LOOH) dönüştürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek sürer.

Lipid peroksidasyonu toplayıcı reaksiyonlarla ya sonlandırılır ya da otokatalitik yayılma reaksiyonları ile devam eder. Lipid peroksidasyonu neticesinde meydana gelen lipid hidroperoksitleri yıkımlandığında biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Aldehitler ya hücrelerde metabolize edilirler ya da başlangıçta etki ettikleri alanlardan diffuze olarak hücrenin diğer bölümlerine de hasarı yayarlar. Çok zararlı bir zincir reaksiyon olan lipid peroksidasyonu, direkt olarak membran yapısına veya indirekt olarak reaktif aldehitler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verirler. Bunun sonucunda da birçok hastalığa ve doku hasarına yol açarlar (Köse ve Doğan, 1992; Akkuş, 1999; Yanbeyi, 1999; Dikici, 1999; Benzer, 2001).

Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehidler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffuze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünü malondialdehit (MDA)' dir. Oluşan MDA hücre membranlarında iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiyobarbitürik asitle ölçülebilen MDA lipid peroksid seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır (Morales vd., 2004).

Normal metabolik şartlarda asetat veya malonata kadar okside olan üç karbonlu bir ketoaldehit olan MDA, daha sonra kreps döngüsü ile CO₂'e indirgenerek atılır. MDA konsantrasyonu, aşırı lipid peroksidasyonu sonucunda artarak dokulara hasar vermektedir (Murray vd., 1996; Kalender vd., 2002).

1.1.5. Antioksidan Savunma Sistemleri

Oksijen radikallerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizması mevcuttur. Bunlara ‘antioksidan savunma mekanizmaları’ ya da kısaca ‘antioksidanlar’ denir. Antioksidanlar serbest radikallere bir hidrojen iyonu vererek veya bu radikalleri kendilerine bağlayarak ya da onları daha zayıf bir moleküle çevirerek radikal hasarından vücudu korurlar. Antioksidan savunma sistemleri, birincil ve ikincil savunma sistemleri olmak üzere iki kategoride sınıflandırılırlar. Birincil savunma sistemleri antioksidan bileşikler ve antioksidan savunma enzimleri olmak üzere iki grubu içerir. Antioksidan bileşikler, glutatyon, β -karoten, ürik asit, C ve E vitaminlerini içerirken, antioksidan savunma enzimleri süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-PX), glutatyon-S-transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GR)’ dan oluşur. İkincil savunma sistemleri, lipolitik ve proteolitik enzimleri içerir. Her iki grup enzim de, hasar görmüş, değişmiş ya da bozulmuş yağ ya da proteinlerin temizlenmesiyle savunmada ikincil bir hat gibi görev alırlar. Bu proses reaktif hücrenel bileşenleri uzaklaştırır, aksi taktirde ortamda daha fazla oksidatif reaksiyonlar meydana gelebilir (Kaya, 2005).

1.1.5.1. Glutatyon

Glutatyon (GSH), genetik bilgiye ihtiyaç duyulmadan hayvan ve bitki hücrelerinde doğal olarak sentezlenen glutamat (Glu), sistein (Cys) ve glisinden (Gly) oluşmuş, intraselüler konsantrasyonu daha fazla olan bir tripeptittir. Glu ile Cys bir γ -peptid bağı ile bağlıdırlar. Reaktif oksijen türleri ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasardan koruyan glutatyon, çok önemli bir antioksidan olup hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünün önlenmesinde de görev alır. Ayrıca proteinlerin yapısında bulunan sülfhidril (-SH) gruplarını indirgenmiş halde tutarak bu grupların oksidasyonunu önler. Böylelikle fonksiyonel özellikteki proteinlerin ve enzimlerin inaktive olmasını engeller. Yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunu ve aminoasitlerin membranlardan transportunu da sağlayan glutatyon, eritrosit ve lökositler ile birlikte göz lensini oksidatif hasara karşı koruyarak hayati bir rol üstlenir (Beutler vd., 1963, Piner, 2005).

Glutasyonun hücrelerde iki formda bulunmaktadır. Bunlardan ilki ve aktif formu olan indirgenmiş glutasyon (GSH), ikincisi ise okside koşullarda iki molekül GSH arasında disülfid bağı kurulmasıyla oluşan okside glutasyon (GSSG) formudur. İndirgenmiş glutasyon hücrelerde daha baskındır (Pena Llopis vd., 2001). Glutasyon (γ -glutamil-sisteinil-glisin=GSH) beyaz renkli, kristal yapılı katı bir maddedir. Erime noktası 192-195°C arasındadır. Molekül ağırlığı 307,33 g'dır ve suda kolay çözünür. Erime noktası 178-182°C olan okside glutasyon (GSSG)' nun ise molekül ağırlığı 612,63 g'dır (Gökçe, 2013).

Düşük molekül ağırlığına sahip ve sülfür içeren GSH, kolay bir şekilde okside ve hızlı bir şekilde rejenere edilebilme özelliği sayesinde birçok biyokimyasal ve farmakolojik reaksiyonda önemli fonksiyonlar üstlenirler (Piner, 2005).

Peroksidaz enzim ailesinin bir kofaktörü olan GSH aynı zamanda askorbik asit metabolizmasında, hücreler arası iletişimin sürdürülmesinde, proteinlerin sülfidril (-SH) gruplarının okside olmasının ve çapraz bağlanmasının engellenmesinde görev alır. Bununla birlikte hücre içi bakır transportunda da görevli olan GSH, bakır iyonları ile şelatlar oluşturarak bunların serbest radikal oluşturma potansiyellerini aşağı çekerler. Koruyucu bir ajan olarak lökoeritrin sentezinde yer alan enzimler için bir kofaktör olan GSH, protein katlanmasında ve insülin gibi disülfid bağları taşıyan proteinlerin yıkımlanmasında, hücre bölünmesi ve immün yanıtın düzenlenmesinde ayrıca prostaglandin metabolizmasının regülasyonun da görevlidir (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Piner, 2005). Diğer taraftan GSH toksik bileşiklerle non-enzimatik veya GST ile enzimatik olarak GSH konjugatları oluşturmak üzere reaksiyona girer (Anderson, 1998).

1.1.5.2. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu, oksidatif strese karşı savunmada kritik rol oynayan, selenyum-bağımlı GSH-Px'ler ve selenyum-bağımsız GSH-Px'ler olarak iki gruba ayrılan GSH ile ilgili enzimlerden biridir. Selenyum-bağımlı GSH-Px'ler H_2O_2 ve organik hidroperoksitleri indirgerken, selenyum-bağımsız olanlar H_2O_2 için inaktif olup sadece organik hidroperoksitlerin indirgenmesini katalizlerler (Cnubben vd, 2001). Böylece GSH-Px bir yandan hidrojen peroksiti metabolize ederek lipit peroksidasyonunun başlamasını önlerken, diğer yandan lipit

hidroperoksitlerini de metabolize ederek olayın gelişmesini önlemektedir (Gökçe, 2013). GSH-Px hidrojen peroksidi iki molekül H₂O ve alkole indirger (Piner, 2005).

Fosfolipit hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGSH-Px) adı verilen monomerik yapıdaki bir enzim membran fosfolipit hidroperoksitlerini alkollere indirger ve membrana bağlı en önemli antioksidan olan vitamin E yetersiz olduğunda membranı peroksidasyona karşı korur. GSH-Px'ın fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önler. GSH-Px eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. Diğer taraftan GSH-Px genotoksik ve mutajen elektrofilik maddelerle konjugasyona girerek onların zehirsizleştirilmesinde rol oynar.

1.1.5.3. Glutatyon-S-Transferaz

Glutatyon S-transferaz (GST), GSH ile elektrofilik bileşikler arasındaki konjugasyonu katalizleyen, ksenobiyotik ve endojen bileşiklerin detoksifikasyonu ve biyotransformasyonunda görev alan faz II biyotransformasyon multigen enzim ailesinin bir üyesidir (Hamed vd., 2003). Girdiği reaksiyon neticesinde, bileşiğin hidrofilitesi ve molekülün lipid tabakası içerisindeki dağılımını artırarak hücre içi birikimini engeller. $GSH + R-X \rightarrow GSR + HX$ şeklindeki bir reaksiyonu katalizleyen GST iki temel fonksiyona sahiptir. Bunlardan birincisi aktif merkezine hem GSH'ı hem de elektrofilik substratı ikisi arasındaki etkileşimi sağlamak, ikincisi ise glutatyonun sülfidril grubunu aktive ederek GSH'ın elektrofilik substrat üzerindeki nükleofilik atağını sağlamaktır (Armstrong, 1997). Substratların elektrofilik fonksiyonel merkezleri genellikle karbon, nitrojen veya sülfürdür. GSH'ın sistein rezidüsü ile elektrofilik substrat arasında kurulan tiyoeter bağı genellikle daha az reaktif ve suda daha çok çözünebilir ürünlerin oluşumuna yol açtığı için; GST reaksiyonları genellikle detoksifikasyon reaksiyonlarıdır (Eaton ve Bammler, 1999).

Bitkiler, hayvanlar, omurgalılar, omurgasızlar ve bakteriler GST' lere sahiptirler. Detoksifikasyonun yoğun olduğu bölgelerde yüksek aktivite gösterirler ve endoplazmik retikulum membranı ile nükleustaki interkromatin bölgede yerleşirler. Homo veya heterodimerik yapıdaki sitoplazmik GST'ler enzimin en çok bulunan formlarıdır. Bu enzimler ayrıca merkaptürik asit biyosentezinin başlangıç reaksiyonlarına da aracılık ederler (Leblanc ve Dauterman, 2000).

GST'ler; çevre kirleticileri, ilaçlar, karsinojenler ve pestisitler gibi birçok bileşici metabolize etme yeteneğindedirler. GST ile reaksiyona girecek xenobiyotiklerin hidrofobik olma, elektrofilik bir atom çekirdeği içermesi ve GSH ile enzimatik olmayan koşullarda reaksiyona girebilme özelliklerine sahip olması gerekir. GST'lerin diğer bir fonksiyonu, lipid peroksidlerinin bozulma ürünleriyle GSH arasındaki konjugasyonda antioksidan görev almasıdır. Balıklar için organik hidroperoksidlerin detoksifikasyonunda GST'ler GSH-Px'ten çok daha gereklidir (Stephensen vd., 2002). GST'ler GSH-Px'ten farklı olarak H₂O₂ için inaktif olup, selenyumdan bağımsız olarak işlev görürler ve sadece organik hidroperoksidleri indirgerler (Cnubben vd., 2001; Sen ve Packer, 2000). Eğer selenyum eksikliği durumu var ise GST devreye girer ve kayıp selenyuma bağlı GSH-Px aktivitesinin boşluğunu doldurur. Enzimin bu görevi selenyum varlığında ise baskılanmaktadır (Leblanc ve Dauterman, 2000).

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Araştırma Yeri

Çalışma, Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi' nde yürütüldü. Çalışmada 80 x 75 x 90 cm boyutlarında 4 farklı fiberglas tank kullanıldı.

Deneme öncesinde dezenfekte edilen tankların üzeri balıkların atlamalarını önlemek için balık ağı ile örtülmüştür. Tanklar hava kompresörü kullanılarak havalandırılmış, oksijen ve su sıcaklığı ölçülmüştür.

2.1.2. Balık Materyali

Araştırmada kullanılan ve ortalama ağırlığı 100 ± 10 g olan 120 adet gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), yerel bir işletmeden temin edilerek araştırmanın yürütüldüğü Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'ne canlı olarak getirildi ve fiberglas tanklara yerleştirildi (şekil 2.1).

2.1.3. Polen Örnekleri

Araştırmada kestane (*Castanea sativa*) poleni kullanıldı. Polen örnekleri, Zonguldak yöresinde sabit arıcılık yapan arıcılardan kestane balının üretim sezonunda kovanların önüne polen tuzağı takılarak elde edildi. Polen örneklerinin palinolojik olarak identifikasyonu Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi'nden Prof. Dr. Sibel SİLİCİ tarafından yapıldı.

Polen örneği 10 g tartılarak 20 ml distile suda çözüldü. Solüsyon 10 dk 1.000 g de santrifüj edildi. Supernatantın sıvı kısmı döküldü. Sedimente 20 ml distile su eklenerek 5 dk 1.000 g de santrifüj edildi. Su kısmı tekrar dökülerek kurutma kağıdı üzerine test tüpü ters çevrildi. Daha sonra lam üzerine aktarılan sediment üzerine gliserin jelatin karışımı eklendi ve 40 °C' de ısıtıcı tablada 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.



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)

2.1.4. Araştırmada Kullanılan Araç-Gereçler ve Kimyasal Maddeler

Araştırmada kullanılan kimyasal maddeler Tablo 2.1’de, kullanılan araç ve gereçler ise Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Araştırmada kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Katalog Numarası
N,N-Dimetilformamid	Sigma D-4551
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma N-5514
Paraokson etil	Sigma D-9286
Fenilasetat	Sigma 108723
Polietilenglikol	Sigma 1546445
2-Thiobarbitürük asit (TBA)	Merck 1.08180.0025
Trikloroasetik asit (TCA)	Merck 807
Perklorik asit	Fluka 34288
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma –aldrich 13423
Metafosforik asit	ABCR AB 125903
Disodyum etilendiamintetraasetik asit dihidrat (EDTA)	Sigma E5134
Disodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄)	Merck 6580
5,5'-Dithiobis (2- nitrobenzoik asit)	AppliChem 69-78-3
Sodyum sitrat	Merck 1.06448.1000
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck 4873
NADPH	Sigma N-5130
Sodyum azid (NaN ₃)	Riedel 35088
Hidrojen peroksit (% 37)	Merck 1.00314
Sodyum hidroksit (NaOH)	Sigma S-0899
Amonyum sülfat (NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma A-4418
GSH Redüktaz	Merck 359960
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck 1.06398.1000
Potasyum sodyum tartarat	Merck 8085.1000
Bakır-2-sülfat	Merck 1.02787
Folin	Sigma F9252
GSH (Redükte glutatyon)	Sigma G4251
Dinitroklorobenzen (CDNB)	ABCR AB 114728
Kalsiyum Klorür (CaCl ₂)	Sigma -aldrich 12022
Trizma (Tris) (HoCH ₂) ₃ (CNH) ₂	Merck 1.08387.0500

Tablo 2.2. Araştırmada kullanılan araç ve gereçler

Kullanılan araç ve gereçler	
Balon joje (5, 10, 25, 50 ml)	Isolab
Beher (25, 50, 100 ml)	Isolab
Erlen (25, 50, 100, 250 ml)	Isolab
Cam tüp (16x100 mm)	Isolab
Muayene Eldiveni	Nimo
Mavi ve sarı pipet ucu	BRAND
Mikro pipet (0.1-10, 10-100, 100-1000 µl)	BRAND
Spektrofotometre küveti (normal ve kuvarz)	Q-104
Hassas terazi (0,01 ve 0,001 g hassasiyetli)	Shimadzu
Homojenizatör	WiseStir HS-30E
Bidistile su cihazı	NÜVE NS 108
Manyetik karıştırıcı	Colara Magnetomix
Soğutmalı santrifüj	NÜVE NF 800 R
-20°C soğutucu	Uğur Derin Dondurucu
Spektrofotometre	Aquamete Spectronic
Su banyosu	Nüve ST 402
Hematokrit Santrifüj	Nüve
Vorteks	Velp Scientifica 10.0176

2.2. Metot

2.2.1. Polen Örneklerinin Analizi

Arı poleninin kimyasal analizinde standart AOAC metotları 920.153, 991.36 ve 960.52, yağ asitlerinin analizi için ise ISO 12966-2:2011 metodu kullanıldı.

Polen örneklerinin ana şeker kompozisyonları 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 belirlendi.

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

2.2.2. Deneme Yemlerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan polen örnekleri % 1, % 2 ve % 4 oranında tartıldı ve 1'er litre su içerisinde çözüldü. Polen içeren yemlerin hazırlanması için, özel bir firmadan (Ecobio) alınan pelet yemler önce toz haline getirildi. Toz haline getirilen yemler polen içeren 1'er litrelik sularla hamur haline getirildi. Hamur haline getirilen karışım kıyma makinesinden geçirilerek pelet haline dönüştürüldü. Hazırlanan peletler tepsilere yerleştirilip yem fırınında kurutuldu. Yemler soğutulduktan sonra, kullanılıncaya kadar koyu renkli cam muhafaza kapları içerisinde ve 4 °C' de muhafaza edildi.

2.2.3. Deneysel Plan

Çalışmada canlı olarak temin edilen balıklar 80 x 75 x 90 cm boyutlarında 4 farklı fiberglas tanka, her birinde 10 adet olacak şekilde yerleştirildi. Deneysel çalışmaya başlamadan önce balıklar hazırlanmış olan bu ortama 15 gün süreyle adapte edildi. Adaptasyon süresince balıklara günde iki kere alabildikleri kadar ticari alabalık yemi verildi.

Adaptasyon süresi sonunda balıklar aşağıdaki gibi dört grubuna ayrıldı.

K: Kontrol grubu; polen içermeyen ticari yemin uygulandığı grup

D1: % 1 oranında polen ilave edilen yemin uygulandığı grup.

D2: % 2 oranında polen ilave edilen yemin uygulandığı grup.

D3: % 4 oranında polen ilave edilen yemin uygulandığı grup.

Deneme 21 gün sürdü. Çalışma 3 tekrarlı olarak yürütüldü ve her bir tekrar için 40 adet olmak üzere toplamda 120 balık kullanıldı. Çalışma Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Başkanlığı tarafından onaylanmıştır (Protokol No: 2014/10-102)

2.2.4. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması

Çalışmanın sonunda benzocain (25mg/L) ile anestezi edilen balıklar, kan örneklerinin alınması için kavdal pedünkül bölgesinden ensize edildi. Kanın bir kısmı EDTA'lı tüplere bir kısmı ise antikoagülant içermeyen jelli tüplere dolduruldu. Daha sonra balıkların klinik muayenesini takiben usulüne uygun bir şekilde otopsi yapıldı (Arda vd., 2005). Çıkarılan karaciğer, böbrek ve dalak örnekleri folyolara sarıldı ve - 20 °C' de derin dondurucuda muhafaza edildi. Kan örnekleri aynı gün, karaciğer, böbrek ve dalak örnekleri 30 gün içerisinde işlendi.

EDTA' lı tüplere alınan kan örneklerinde hematokrit (Ht) düzeyi ve oksidatif radikal üretimi (nitrobluetetrazolium-NBT aktivitesi) belirlendikten sonra plazmaları çıkarıldı. Bunun için kan örnekleri 3500 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Plazmada total protein (TP) ve total immunoglobulin (TI) düzeyleri belirlendi.

Jelli tüplere alınan kan örneklerinin 3500 rpm' de 10 dakika santrifüjünden sonra serumları çıkarıldı. Elde edilen bu serumlarda paraoksonaz (PON) ve arilesteraz (ARE) enzim aktiviteleri tespit edildi.

Karaciğer, böbrek ve dalak örneklerinden antioksidan parametrelerin belirlenmesi için homojenatlar hazırlandı. Homojenatların hazırlanması için doku örnekleri serum fizyolojik (% 0,09 NaCl) ile yıkandı, iki süzgeç kağıdı arasında suyu alındıktan sonra %1.15'lik KCl içinde 1:10 oranında sulandırılarak homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar 50 ml'lik propilen tüplerde soğutmalı santrifüjde 3200 rpm'de +4 °C'de 10

5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alındı ve lipit peroksidasyonun bir göstergesi olarak malondialdehit (MDA) düzeyi ile redükte glutatyon (GSH) düzeyi, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi ve glutatyon S-transferaz (GST) aktivitesi belirlendi.

2.2.5. 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 (Konuk, 1981).

2.2.6. Oksidatif Radikal Üretimini (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).

2.2.7. Toplam Protein (TP) Düzeyinin Belirlenmesi

Biüret yöntemi kullanılarak TP 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).

2.2.8. Toplam İmmunoglobulin (TI) Düzeyinin Belirlenmesi

TI düzeyinin tespit edilmesi için TP 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)

2.2.9. Paraoksonaz (PON) ve Arilesteraz (ARE) Aktivitesinin Ölçülmesi

Balıklardan alınan serum örneklerindeki PON ve ARE enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlendi. Bunun için 850 µl Tris-HCl tamponu (100 mM, pH:8), 100 µl substrat çözeltisi (2 mM paraokson + 2 mM koenzim CaCl₂) ve 100 µl enzim çözeltisi sırasıyla karıştırdı. Daha sonra 412 nm dalga boyunda ve 37 °C'de 1 dakika zaman diliminde absorbansta meydana gelen değişme spektrofotometrede okundu. ARE enzim aktivitesinde aynı prensiple ölçüldü fakat substrat olarak fenilasetat kullanıldı (Dubravka vd., 2001).

2.2.10. Malondialdehid (MDA) Düzeyinin Belirlenmesi

Lipid peroksidasyonun bir göstergesi olarak karaciğer, böbrek ve dalak örneklerinin malondialdehit (MDA) düzeylerinde meydana gelen değişimler, Placer vd. (1966)' dan modifiye edilen yöntemle göre spektrofotometrik olarak ölçüldü. Buna göre doku örneklerinden 0,25 ml alınarak üzerine 2,25 ml renk ayırıcı (TBA ve TCA) ilave edildi. Karışım 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek 20 dakika kaynar su banyosunda bekletildi ve 532 nm' de spektrofotometrede köre karşı okundu.

2.2.11. Redükte Glutatyon (GSH) Düzeyinin Belirlenmesi

GSH tayini Ellman (1959) tarafından bildirilen metotla yapıldı. Buna göre, karaciğer, böbrek ve dalak örnekleri çöktürücü solüsyonla (metafosforik asit, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), sodyum klorür (NaCl)) çöktürüldü ve 3000 rpm' de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar alınarak üzerine Ellman ayırıcı ve disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) ilave edilerek 412 nm' de köre karşı okundu.

2.2.12. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesinin Ölçülmesi

Karaciğer, böbrek ve dalak örneklerindeki GSH-Px aktivitelerinin tayini Beutler (1975) tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı. Buna göre, GSH-Px aktivitesi deney ortamındaki NADPH'ın NADP+'ya çevrilmesi ile optik dansitede meydana gelen absorbands farkının 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile hesaplandı.

2.2.13. Glutasyon S-transferaz (GST) Aktivitesinin Belirlenmesi

GST aktivitesi, 1-kloro-2,4-dinitrobenzenin (CDNB), GSH ile konjugasyonu sırasında 0. ve 2. dakikalardaki absorbands farkının 340 nm dalga boyunda okunması ile ölçüldü (Habig vd.,1974).

2.2.14. Protein Düzeyinin Belirlenmesi

Doku protein miktarları GSH-Px ve GST spesifik enzim aktivitesi ile MDA ve GSH düzeylerini hesaplamak amacıyla Lowry vd. (1951) tarafından tarif edilen yöntemle göre ölçüldü.

2.2.15. İstatistiksel Analizler

Denemede elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri SPSS 12.0 istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol ve deneme grubu balıklarının incelenen parametrelerinde meydana gelen değişimler tek yönlü varyans analizi (ONEWAY – ANOVA) ile test edildi (Sümbüloğlu, 1998; Kocaçalışkan ve Bingöl, 2008; Kalaycı, 2010). Grafiklerin çiziminde ise EXCEL programından yararlanıldı.

3. BULGULAR

3.1. Polen Örneklerinin Analizi

Polen örneklerinin kimyasal analiz sonuçları Tablo 3.1' de, antioksidan özellikleri Tablo 3.2' de ve yağ asidi profili Tablo 3.3' de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kestane polenin kimyasal analiz sonuçları

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 polenin 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

Tablo 3.3. Kestane poleni yağının 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

3.2. Hematokrit (Ht) Düzeyindeki Değişimler

Kontrol grubu balıklarıyla farklı oranlarda polen içeren yemlerin uygulandığı balıkların Ht düzeylerinde aşağıdaki değişimler tespit edildi.

Kontrol grubuna göre her üç deneme grubunda da Ht düzeyinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı belirlendi ($p < 0,05$, Tablo 3.4). Bu artışın kontrol grubuna göre D1, D2 ve D3 deneme gruplarında sırasıyla % 13,65, % 17,44 ve % 19,89 düzeyinde olduğu saptandı.

Yalnız polen uygulanan D1, D2 ve D3 grupları karşılaştırıldığında D3 grubunun Ht düzeyinin D1 grubundan farklı olduğu belirlendi ($p < 0,05$, Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Kontrol ve deneme grubu balıklarında Hematokrit (Ht) düzeyi, Oksidatif radikal üretimi (NBT aktivitesi), Total protein (TP) ve Total İmmunoglobulin (TI) düzeyleri (Ortalama \pm standart hata)

	Deneme Grupları			
	K	D1	D2	D3
Hematokrit (%)	33,45 \pm 3,84 ^a	38,74 \pm 4,19 ^b	40,52 \pm 5,20 ^{bc}	41,76 \pm 4,47 ^c
NBT (mg/ml)	1,34 \pm 0,11 ^a	1,56 \pm 0,14 ^b	1,69 \pm 0,17 ^c	1,70 \pm 0,15 ^c
TP (mg/ml)	36,86 \pm 3,41 ^a	42,59 \pm 4,53 ^b	43,72 \pm 5,10 ^b	43,15 \pm 4,91 ^b
Tİ (mg/ml)	21,24 \pm 3,75 ^a	28,59 \pm 4,81 ^b	31,40 \pm 4,22 ^c	32,76 \pm 5,68 ^c

^{a,b,c,d} Aynı satırda yer alan farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

3.3. Oksidatif Radikal Üretimindeki (Nitrobluetetrazolium-NBT aktivitesi) Değişimler

Farklı oranlarda polen içeren yemlerin uygulandığı balıkların kontrol grubuna göre NBT aktivitelerinde aşağıdaki değişimler tespit edildi.

Kontrol grubuna göre her üç deneme grubunda da NBT aktivitesinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı belirlendi ($p < 0,05$, Tablo 3.4). Bu artış kontrol grubuna göre D1, D2 ve D3 deneme gruplarında sırasıyla % 14,10, % 20,71 ve % 21,17 olarak saptandı.

Yalnız polenin uygulandığı D1, D2 ve D3 grupları karşılaştırıldığında D2 ve D3 gruplarının NBT aktivitelerinin D1 grubundan farklı olduğu görüldü ($p < 0,05$, Tablo 3.4).

3.4. Toplam Protein (TP) Düzeyindeki Değişimler

Kontrol grubu balıklarıyla farklı oranlarda polen içeren yemlerin uygulandığı balıkların TP düzeylerinde aşağıdaki değişimler belirlendi.

Kontrol grubuna göre her üç deneme grubunda da TP düzeyinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı belirlendi ($p < 0,05$, Tablo 3.4). Bu artışın kontrol grubuna göre D1,

D2 ve D3 deneme gruplarında sırasıyla % 13,45, % 15,69 ve % 14,57 düzeyinde olduğu görüldü.

Yalnız polen uygulanan D1, D2 ve D3 gruplarının TP düzeyleri arasında istatistiksel herhangi bir farklılık belirlenmedi ($p > 0,05$, Tablo 3.4).

3.5. Toplam İmmunoglobulin (TI) Düzeyindeki Değişimler

Farklı oranlarda polen içeren yemlerin uygulandığı balıkların kontrol grubuna göre Tİ düzeylerinde aşağıdaki değişimler tespit edildi.

Kontrol grubuna göre her üç deneme grubunda da Tİ düzeyinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı belirlendi ($p < 0,05$, Tablo 3.4). Bu artışın kontrol grubuna göre D1, D2 ve D3 deneme gruplarında sırasıyla % 13,45, % 15,69 ve % 14,57 düzeyinde olduğu saptandı.

Yalnız polenin uygulandığı D1, D2 ve D3 grupları karşılaştırıldığında D2 ve D3 gruplarının Tİ düzeylerinin D1 grubundan farklı olduğu görüldü ($p < 0,05$, Tablo 3.4).

3.6. Paraoksonaz (PON) ve Arilesteraz (ARE) Aktivitesindeki Değişimler

Kontrol grubuna göre her üç deneme grubunda da PON ve ARE enzim aktivitelerinin istatistiksel olarak herhangi bir farklılık göstermediği belirlendi. Yine yalnız polenin uygulandığı D1, D2 ve D3 grupları karşılaştırıldığında da benzer bir şekilde gruplar arasında istatistiksel herhangi bir farklılık bulunmadı ($p > 0,05$, Tablo 3.5).

Tablo 3.5. Kontrol ve deneme grubu balıklarının serum PON ve ARE aktivitesindeki değişimler (Ortalama \pm standart hata)

	Deneme Grupları			
	K	D1	D2	D3
PON (U/mL)	80,81 \pm 8,43 ^a	81,20 \pm 11,29 ^a	79,63 \pm 10,57 ^a	81,86 \pm 9,68 ^a
ARE (U/mL)	313,86 \pm 19,59 ^a	310,22 \pm 25,43 ^a	315,89 \pm 22,65 ^a	312,77 \pm 20,19 ^a

^{a,b,c,d} Aynı satırda yer alan farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

3.7. Malondialdehid (MDA) Düzeyindeki Değişimler

Kontrol ve deneme grubu balıklarının karaciğer, böbrek ve dalak MDA düzeylerinde aşağıdaki değişimler tespit edildi.

Kontrol grubuna göre polen uygulanan tüm deneme gruplarının karaciğer MDA düzeylerinde belirlenen azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p < 0,05$, Tablo 3.6). Bu azalma D1, D2 ve D3 gruplarında sırasıyla % 23,79, % 27,29 ve % 28,17 olarak bulundu. Yalnız polenin uygulandığı D1, D2 ve D3 grupları karşılaştırıldığında ise bu grupların karaciğer MDA düzeyleri arasında istatistiksel herhangi bir farklılık tespit edilmedi ($p > 0,05$, Tablo 3.6).

Kontrol grubuna göre polen uygulanan tüm deneme gruplarında böbrek MDA düzeylerinin azaldığı belirlendi ($p < 0,05$, Tablo 3.6). Bu azalmaların D1, D2 ve D3 gruplarında sırasıyla % 21,40, % 29,84 ve % 30,15 olduğu görüldü. Yalnız polenin uygulandığı D1, D2 ve D3 grupları karşılaştırıldığında ise D2 ve D3 gruplarının böbrek MDA düzeylerinin D1 grubundan farklı olduğu saptandı ($p < 0,05$, Tablo 3.6).

Polen uygulanan D2 ve D3 gruplarında dalak MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre azaldığı belirlenirken ($p < 0,05$, Tablo 3.6), D1 grubunda belirlenen azalma istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p > 0,05$, Tablo 3.6). Bu azalmalar D1, D2 ve D3 gruplarında sırasıyla % 4,30, % 13,18 ve % 18,84 olarak belirlendi. Yalnız polenin uygulandığı D1, D2 ve D3 grupları karşılaştırıldığında ise D2 ve D3 gruplarının dalak MDA düzeylerinin D1 grubundan farklı olduğu görüldü ($p < 0,05$, Tablo 3.6).

Tablo 3.6. Kontrol ve deneme grubu balıklarının karaciğer, böbrek ve dalak dokularındaki MDA düzeyi (Ortalama \pm standart hata, nmol/g protein)

Deneme Grupları				
Doku	K	D1	D2	D3
Karaciğer	6,85 \pm 0,80 ^b	5,22 \pm 0,69 ^a	4,98 \pm 0,63 ^a	4,92 \pm 0,71 ^a
Böbrek	9,95 \pm 1,19 ^c	7,82 \pm 0,86 ^b	6,98 \pm 0,72 ^a	6,95 \pm 0,88 ^a
Dalak	7,43 \pm 1,02 ^c	7,11 \pm 0,77 ^c	6,45 \pm 0,54 ^b	6,03 \pm 0,65 ^a

^{a,b,c,d} Aynı satırda yer alan farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

3.8. Redükte Glutasyon (GSH) Düzeyindeki Değişimler

Kontrol ve deneme grubu balıklarının karaciğer, böbrek ve dalak GSH düzeylerinde aşağıdaki değişimler tespit edildi.

Kontrol grubuna göre polen uygulanan tüm deneme gruplarının karaciğer GSH düzeylerinde belirlenen artışın istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p < 0,05$, Tablo 3.7). Bu artış D1, D2 ve D3 gruplarında sırasıyla % 15,93, % 24,94 ve % 26,35 olarak gerçekleşti. Yalnız polenin uygulandığı D1, D2 ve D3 grupları karşılaştırıldığında ise D2 ve D3 gruplarının karaciğer GSH düzeylerinin D1 grubundan farklı olduğu saptandı ($p < 0,05$, Tablo 3.7).

Kontrol grubuna göre polen uygulanan tüm deneme gruplarında böbrek GSH düzeylerinin arttığı belirlendi ($p < 0,05$, Tablo 3.7). Bu artış D1, D2 ve D3 gruplarında sırasıyla % 8,34, % 11,10 ve % 9,37 olarak tespit edildi. Yalnız polenin uygulandığı D1, D2 ve D3 grupları karşılaştırıldığında ise bu grupların böbrek GSH düzeylerinde istatistiksel olarak herhangi bir farklılık belirlenmedi ($p > 0,05$, Tablo 3.7).

Polen uygulanan grupların dalak GSH düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığı belirlendi ($p < 0,05$, Tablo 3.7). Bu artışlar D1, D2 ve D3 gruplarında sırasıyla % 12,89, % 11,18 ve % 14,48 olarak belirlendi. Yalnız polenin uygulandığı D1, D2 ve D3 grupları karşılaştırıldığında ise bu grupların dalak GSH düzeylerinin istatistiksel olarak herhangi bir farklılık göstermediği saptandı ($p < 0,05$, Tablo 3.7).

Tablo 3.7. Kontrol ve deneme grubu balıklarının karaciğer, böbrek ve dalak dokularındaki GSH düzeyi (Ortalama \pm standart hata, $\mu\text{mol/g}$ protein)

Deneme Grupları				
Doku	K	D1	D2	D3
Karaciğer	185,29 \pm 14,33 ^a	220,41 \pm 15,71 ^b	246,87 \pm 19,63 ^c	251,60 \pm 15,40 ^c
Böbrek	71,79 \pm 12,74 ^a	78,33 \pm 9,43 ^b	80,76 \pm 6,71 ^b	79,22 \pm 10,29 ^b
Dalak	80,44 \pm 11,27 ^a	92,35 \pm 10,75 ^b	90,57 \pm 7,53 ^b	94,06 \pm 9,48 ^b

^{a,b,c,d} Aynı satırda yer alan farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

3.9. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesindeki Değişimler

Kontrol ve deneme grubu balıklarının karaciğer, böbrek ve dalak GSH-Px aktivitelerinde aşağıdaki değişimler tespit edildi.

Kontrol grubuna göre polen uygulanan tüm deneme gruplarının karaciğer GSH-Px aktivitelerinde belirlenen artışın istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p < 0,05$, Tablo 3.8). Bu artış D1, D2 ve D3 gruplarında sırasıyla % 30,94, % 34,17 ve % 38,16 olarak gerçekleşti. Yalnız polenin uygulandığı D1, D2 ve D3 grupları karşılaştırıldığında ise D3 grubunun karaciğer GSH-Px aktivitesinin D1 ve D2 gruplarından farklı olduğu saptandı ($p < 0,05$, Tablo 3.8).

Kontrol grubuna göre polen uygulanan tüm deneme gruplarında böbrek GSH-Px aktivitelerinin arttığı belirlendi ($p < 0,05$, Tablo 3.8). Bu artış D1, D2 ve D3 gruplarında sırasıyla % 12,70, % 24,34 ve % 25,00 olarak tespit edildi. Yalnız polenin uygulandığı D1, D2 ve D3 grupları karşılaştırıldığında ise D2 ve D3 gruplarının böbrek GSH-Px aktivitesinin D1 grubundan istatistiksel olarak farklı olduğu görüldü ($p < 0,05$, Tablo 3.8).

Polen uygulanan grupların dalak GSH-Px aktivitelerinin kontrol grubuna göre arttığı belirlendi ($p < 0,05$, Tablo 3.8). Bu artışlar D1, D2 ve D3 gruplarında sırasıyla % 18,32, % 19,24 ve % 20,74 olarak belirlendi. Yalnız polenin uygulandığı D1, D2 ve D3 grupları karşılaştırıldığında ise bu grupların dalak GSH-Px aktivitelerinin istatistiksel olarak herhangi bir farklılık göstermediği saptandı ($p > 0,05$, Tablo 3.8).

Tablo 3.8. Kontrol ve deneme grubu balıkların karaciğer, böbrek ve dalak dokusunda GSH-Px aktivitesindeki değişimler (Ortalama \pm standart hata, U/mg protein).

Deneme Grupları				
Doku	K	D1	D2	D3
Karaciğer	3,37 \pm 0,39 ^a	4,88 \pm 0,65 ^b	5,12 \pm 0,98 ^b	5,45 \pm 0,81 ^c
Böbrek	2,61 \pm 0,26 ^a	2,99 \pm 0,41 ^b	3,45 \pm 0,55 ^c	3,48 \pm 0,72 ^c
Dalak	2,14 \pm 0,52 ^a	2,62 \pm 0,33 ^b	2,65 \pm 0,28 ^b	2,70 \pm 0,40 ^b

^{a,b,c,d} Aynı satırda yer alan farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

3.10. Glutasyon S-transferaz (GST) Aktivitesindeki Değişimler

Kontrol grubuna göre her üç deneme grubunda da karaciğer, böbrek ve dalak GST aktivitelerinin istatistiksel olarak herhangi bir farklılık göstermediği belirlendi. Yine yalnız polenin uygulandığı D1, D2 ve D3 grupları karşılaştırıldığında da benzer bir şekilde gruplar arasında istatistiksel herhangi bir farklılık bulunmadı ($p > 0,05$, Tablo 3.9).

Tablo 3.9. Kontrol ve deneme grubu balıklarının karaciğer, böbrek ve dalak dokularındaki GST aktivitesi (Ortalama \pm standart hata, $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein).

Deneme Grupları				
Doku	K	D1	D2	D3
Karaciğer	106,82 \pm 11,23 ^a	131,42 \pm 10,85 ^a	130,65 \pm 15,41 ^a	132,20 \pm 13,58 ^a
Böbrek	75,41 \pm 9,88 ^a	73,96 \pm 8,34 ^a	76,97 \pm 10,22 ^a	78,62 \pm 9,81 ^a
Dalak	88,76 \pm 12,37 ^a	87,71 \pm 10,29 ^a	90,13 \pm 9,43 ^a	89,27 \pm 8,76 ^a

^{a,b,c,d} Aynı satırda yer alan farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Doğal olarak elde edilen ve yan etkisi bulunmayan güçlü antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahip olan polenin kimyasal yapısı bölgenin coğrafik yapısına ve florasına göre değişebilmektedir (Eraslan vd., 2009; Yıldız vd., 2013). Eraslan vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada karbaril pestisidine karşı arı polenin koruyucu etkisi çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan arı polenin GC-MS ile yapılan analiz sonuçlarına göre yapısında organik asitler, flavonoidler, esterler, aldehitler, hidrokarbonlar, terpenler, alkol, keton ve diğer bazı bileşikler tespit edilmiştir. Diğer taraftan Yıldız vd. (2013) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise karbon tetraklorid ile indüklenen karaciğer hasarına karşı arı polenin koruyucu etkisi ratlarda araştırılmış, çalışmada kullanılan ve Zonguldak bölgesinden toplanan polen örneklerinde dominant türün kestane olduğu belirlenmiştir. Polen örneklerinin antioksidan potansiyeli ve kimyasal analizi yapılmış, sonuçta yapısındaki nem, kül, protein, nişasta ve yağ oranları ile birlikte toplam fenolik madde, total flavonoid ve total karotenoid miktarı gibi antioksidan özellikleri belirlenmiştir. Bu çalışmada da kullanılan kestane tipi polenin kimyasal analiz sonuçlarından elde edilen bulgular ve antioksidan özellikleri diğer çalışmalardan elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Hematokrit düzeyi balık sağlığı hakkında ipuçları vermektedir. Buna bağlı olarak Beslenme yetersizliği ve hastalıkların daima düşük hematokrit düzeyiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Rehulka, 2000; Rehulka, 2002). Bu çalışmada sırasıyla % 1, % 2 ve % 4 oranında polen uygulanan D1, D2 ve D3 gruplarında hematokrit düzeyleri sırasıyla $38,74 \pm 4,19$, $40,52 \pm 5,20$ ve $41,76 \pm 4,47$ olarak belirlenmiş ve bu değerlerin kontrol grubundan ($33,45 \pm 3,84$) farklı olduğu saptanmıştır. Benzer bir sonuç El-Asely vd. (2014) tarafından tilapia (*Oreochromis niloticus*) larda elde edilmiş, sırasıyla % 1, % 2,5 ve % 4 oranında polen içeren yemlerin uygulandığı tüm gruplarda hematokrit düzeyinin denemenin 10., 20. ve 30. günlerinde istatistiksel olarak önemli oranda arttığı görülmüştür.

Balıkta fagositoz, bakteri, virüs ve parazit gibi patojenik etkenlere karşı nonspesifik immun direncin en önemli mekanizmasını oluşturur. Kemotaksis, opsonizasyon, absorpsiyon, intraselüler yıkım ve sindirim gibi birçok safhada gerçekleşen fagositozda makrofajlar ve polimorfnükleer lökositler birinci derecede görev alırlar. Bu hücrelerin aksiyon mekanizması respiratory burst (solunum patlaması) sırasında reaktif oksijen

türlerinin üretilmesidir. NBT testi kullanılarak belirlenen nötrofillerin oksidatif radikal üretimi nötrofillerin fagositik aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan bir testtir (Siwicki ve Studnicka, 1987). Bu çalışmada polen uygulamasıyla NBT aktivitesinin bir başka ifadeyle nötrofillerin oksidatif radikal üretiminin arttığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde El-Asely vd. (2014) tarafından tilapia (*Oreochromis niloticus*)' larda yapılmış bir çalışmada, polen uygulanan balıkların fagositik hücre (nötrofil ve monositler) sayısının denemenin 10 gününde istatistiksel olarak önemli oranda arttığı belirlenmiştir. *In vivo* olarak enjeksiyonla 5 mg, yemle 0.1 ve 10 g kg⁻¹ propolis su ve etanolik ekstraktının verildiği çipura balıklarının hücresel ve humoral immun cevabındaki değişimlerin araştırıldığı bir çalışmada da (Cuesta vd., 2005) fagosit yüzdesinin arttığı görülmüştür. Benzer şekilde aynı balık türüne propolis etanolik ekstraktının enjekte edilmesiyle fagositik aktivitenin arttığı belirlenmiştir (Abd-El-Rhman, 2009). Mişe Yonar vd., (2014) tarafından yapılan çalışmada da 10 mg/kg balık dozunda ve 10 gün süreyle propolis uygulamasının sazanlarda NBT aktivitesini arttırdığı bulunmuştur. Balıklarda nonspesifik immun cevabın, immunostimulanların kullanılması sonucunda fagositik hücrelerin sayısının artmasıyla ya da reaktif oksijen türlerinin üretilmesi neticesinde aktive olmasıyla artabileceği belirtilmiştir (Barman vd., 2013). Bu bilgi bu çalışmada NBT aktivitesinde belirlenen artışla da teyit edilmiştir. Diğer taraftan farklı immunostimulan maddeler kullanılarak yapılan önceki çalışmalarda da NBT aktivitesinde artışlar belirlenmiştir. Örneğin güçlü bir antioksidan ve immunostimulan olan ayrıca yapısındaki bileşiklerle polene benzerlik gösteren spirulina (*Spirulina platensis*) ile beslenen tilapialarda NBT aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir (Ibrahim vd., 2013). Bu artış hem yem hem de enjeksiyonla 200, 400 ve 800 mg/kg balık dozunda spirulina verilen gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)' nda da kaydedilmiştir.

Toplam plazma proteini nonspesifik immun sistemin humoral unsuru olarak kabul edilmektedir (Jeney vd., 1997). Doğal olarak bulunan, bitkisel karakterdeki farklı immunostimulanların balıkların total protein düzeyine etkisinin araştırıldığı bazı çalışmalar yapılmıştır. Örneğin Immanuel vd., (2009) dört farklı bitkisel tıbbi ekstraktın tilapiaların (*Oreochromis mossambicus*), Das vd., (2013) ise fesleğenin (*Ocimum sanctum*) *Lobelia rohita* türü balıkların total protein düzeyine etkisini araştırmışlardır. Her iki araştırmada da bu parametrenin bitkisel ekstrakt uygulamasıyla arttığı belirlenmiştir. Benzer şekilde Düğenci vd., (2003) ökseotu, ısırgan otu ve zencefilden elde edilen üç farklı bitkisel ekstraktın yemle uygulandığı gökkuşacağı alabalığında plazma protein düzeyinin kontrol

balıklarından yüksek çıktığını ifade etmişlerdir. Diğer taraftan polen kullanılarak yapılan bir çalışmada % 1, % 2,5 ve % 4 oranında polen içeren yemlerin uygulandığı tilapia (*Oreochromis niloticus*)' ların total plasma protein düzeyinin, denemenin 10. gününde % 2,5 oranında polen uygulanan grupta, denemenin 20. gününde ise % 2,5 ve % 4 oranında polen uygulanan gruplarda istatistiksel olarak önemli oranda arttığı görülmüştür (El-Asely vd., 2014). Bu çalışmada sırasıyla % 1, % 2 ve % 4 oranında polen uygulanan D1, D2 ve D3 gruplarında total protein düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığı saptanmıştır. Bu sonuç yukarıda adı geçen ve farklı doğal immunostimulanlar kullanan araştırmacıların bulgularıyla paralel bulunmuştur.

Balıklarda spesifik savunma mekanizmalarının en önemli elemanlarını immunoglobülinler 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). İspir ve Dörücü (2005), intraperitoneal enjeksiyonla levamisol uyguladıkları gökkuşağı alabalıklarında, antikor düzeyini denemenin 3. 7. 10. ve 14. günlerinde kontrol balıklarından yüksek bulmuşlardır. Yine Siwicki vd. (1994) farklı immunostimulanları yemle oral olarak uyguladıkları alabalıklardaki antikor düzeyinin kontrol grubundan yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Çipura balıklarının immunoglobulin M düzeyinin vitamin A, kitin, levamisol gibi immunostimulanların uygulanmasıyla kontrol balıklarına göre önemli oranda arttığı ifade edilmiştir (Cuesta vd., 2004). Arıların kendilerini soğuktan ve hastalıklardan korumak için yaprak, tomurcuk, dal ve ağaç kabuklarından topladığı reçinemsî karakterdeki propolis oral ve enjeksiyonla uygulandığı bir çalışmada ise total immunoglobulin düzeyinin arttığı gözlemlenmiştir (Yonar, 2008). Bu çalışmada da bir arı ürünü olan polenin, oral yolla immunostimulan olarak verildiği alabalıkların total immunoglobulin düzeyinde istatistiksel olarak önemli bir artış belirlenmiştir. Diğer taraftan Puangkaew vd. (2004), doymamış yağ asitlerinin gökkuşağı alabalığında antikor düzeyini etkilediğini saptamıştır. Bu çalışmada da antikor düzeyinde belirlenen artışın nedeni uygulanan polenin yapısında belirlenen yağ asitleri olabilir.

Balıklarda PON ve ARE enzim aktivitesi ile ilgili farklı teoriler vardır. Bazı araştırmacılar balıklarda bu enzim aktivitelerinin olmadığını iddia ederken (Mackness vd., 1996; Durrington vd., 2001; Başkol ve Köse, 2004) bazı araştırmacılar ise bu enzim

aktivitelerinin balıklarda görüldüğünü ifade etmişlerdir. Balıklardaki çalışmalar ise bu enzimlerin yalnızca saflaştırması ve düzeyinin belirlenmesi yönünde olmuştur (Bastos vd., 1998a, b; Beyaztaş vd., 2007). Örneğin; Folly vd. (2001) *Piaractus mesopotamicus* türü balıklarda PON aktivitesinin varlığını göstermiş ve bu enzimin balıklarda high density lipoprotein (HDL) ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Diğer taraftan aynı koşullarda yetiştirilen normal ve albino gökkuşağı alabalıklarının PON aktivitesi araştırılmış ve sonuçta kültür gökkuşağı alabalığında serum PON aktivitesi daha yüksek bulunmuştur. Bu farklılığın nedeni tür, büyüklük ve baskınlık durumuna bağlanmıştır (Karataş ve Kocaman, 2012). Aynı araştırmacılar tarafından yapılan başka bir çalışmada ise doğadan yakalanan ve kültür altındaki kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*)' nda PON enzim aktivitesi ile PON/HDL oranı araştırılmıştır. Sonuç olarak PON aktivitesi ve PON/HDL oranı kültür altındaki kaynak alabalığında doğadan yakalananlara göre daha yüksek bulunmuştur (Karataş ve Kocaman, 2014). Bastos vd. (2004) neotropikal dört balık türü *Piaractus mesopotamicus*, *Brycon cephalus*, *Hypostomus punctatus*, *Salminus brasiliensis*' in serumunda PON enzim aktivitelerini sırasıyla 6,1, 6,6, 1,5 ve 35,2 nmol x min⁻¹ x ml⁻¹ olarak belirlemişlerdir. Bunun yanı sıra son zamanlarda balıklarda PON aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmaların hemen hemen tamamında, ağır metallerin (Beyaztaş vd., 2007; Sayın vd., 2012; Yonar vd. 2012; Deveci vd., 2015) ve bazı pestisitlerin (Altınok vd., 2012) bu enzim üzerine etkileri araştırılmıştır. Polenin balıklarda PON ve ARE enzim aktivitesine etkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Buna karşın N ω -nitro-L-arjinin-metil ester (L-NAME) ile hipertansif yapılan sıçanlarda propolis, kafeik asit fenil ester (CAPE) ve polen uygulamasının paraoksanaz (PON1) aktivitesi, toplam antioksidan seviye (TAS), toplam oksidan seviye (TOS), oksidatif stres indeksi (OSİ), asimetrik dimetilarginin (ADMA) ve nükleer faktör kappa B (NF- κ B) seviyeleri ve kan basıncında meydana gelen değişimler araştırılmıştır (Gülhan, 2014). Sonuç olarak polen uygulanan gruplarda PON1 aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Bu çalışmada ise kontrol grubuna göre her üç deneme grubunda da PON ve ARE enzim aktivitelerinin istatistiksel olarak herhangi bir farklılık göstermediği, yine yalnız polenin uygulandığı D1, D2 ve D3 grupları karşılaştırıldığında da benzer bir şekilde gruplar arasında istatistiksel herhangi bir farklılığın bulunmadığı tespit edilmiştir.

Oksijenden tek elektron indirgenmesi sonucu meydana gelen serbest radikaller, değişik birçok reaksiyonla vücudun normal prosesi içerisinde hücre ve dokularda oluşurken, pestisit, ağır metal ve çevresel şartlar gibi diğer bazı dış faktörler sonucunda da

vücutta oluşur. Bu radikaller proteinler, lipitler, karbohidratlar ve nükleik asitleri yıkıma uğratabilirler. Ayrıca DNA'ya zarar verirler, enzimlerin aktivasyonunu bozarlar ve membran geçirgenliğini olumsuz etkilerler. Poliansature yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olan lipid peroksidasyon serbest radikallerin uyardığı hücre yıkımında önemli bir mekanizmadır. Birçok hastalıkta doku yıkımı serbest radikaller ve lipid peroksidasyon sonucu oluşur. Organizmada serbest radikal reaksiyonları birçok antioksidan sistemi ile kontrol edilir. Antioksidanlar serbest radikal oluşumunu önleyen, temizleyen veya zincir kıran yapılar olarak işlev görürler (Bragadottir, 2001; Benzer, 2001; Fontagné vd., 2006).

Diğer yüksek omurgalı canlılarda olduğu gibi balıklarda da lipid peroksidasyon veya MDA düzeyi hücresel bileşenlerde meydana gelen oksidatif zararın en önemli göstergelerinden birisidir (Morales vd., 2004). Bu çalışmada da oksidatif stresin bir belirteci olarak MDA düzeyindeki değişimler incelenmiştir.

Dastan vd., (2017) tarafından yapılan ve 0,5, 2,5, 5, 10, 20 ve 30 ppm konsantrasyonlarında 96 saat süreyle uygulanan polenin alabalıklarda karaciğer, dalak ve kalp dokusundaki MDA düzeylerine etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak karaciğer MDA düzeyinin tüm deneme gruplarında, dalak ve kalp MDA düzeyinin ise 0,5 ppm konsantrasyonunda polen uygulanan grup dışındaki tüm deneme gruplarında düştüğü tespit edilmiştir. Ferreira vd. (2012) yukarıda elde edilen sonucun aksine bir fungusit olan tebuconazole maruz kalan *Rhamdia quelen* türü balıklarda, yalnız polen uygulamasının karaciğer, böbrek ve beyin dokusundaki MDA düzeylerine istatistiksel herhangi bir etkisinin olmadığını bulmuşlardır. Bu çalışmada da Dastan vd. (2017) tarafından elde edilen sonuçlara paralel olarak, sırasıyla % 1, % 2 ve % 4 oranında polen içeren yemlerin uygulandığı D1, D2 ve D3 gruplarının doku MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir. Önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi (Eraslan vd., 2009) polenin bu etkisi onun güçlü radikal temizleyici etkisini göstermektedir.

Balıkların antioksidan savunma mekanizmaları; konakçı dokusunda hasara neden olan etkenleri ortadan kaldıran veya yayılmasını sınırlayan, enfeksiyonun meydana gelmesini engelleyen ya da enfeksiyona karşı vücudun cevap vermesini sağlayan faktörlerin birçoğunu içine almaktadır. (McDowell, 1989; Blazer, 1992). Yüksek omurgalılarıdaki gibi balıklarda da antioksidan savunma non-enzimatik ve enzimatik olarak sınıflandırılırlar. Balıklarda en önemli antioksidan enzimler, aktiviteleri ve diğer antioksidanlarla ilişkileri hakkındaki bilgilerin sınırlı olduğu hidrojen peroksid (H_2O_2)'i temizleyen katalaz, süperoksid radikali ($O_2^{\cdot-}$)'ni yok eden süperoksid dismutaz, H_2O_2 ve

lipid hidroperoksitleri temizleyen glutasyon peroksidaz ile glutatyona bağlı diğer enzimlerdir (Belló vd., 2000; Mourente vd., 2002; Puangkaew vd., 2005).

GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasardan koruyan, enzimatik olmayan, tripeptit karakterinde, endojen, çok önemli bir antioksidandır. GSH protein yapısındaki sülfhidril gruplarını indirgenmiş halde tutarak çoğu protein ve enzimin inaktive olmasını engeller. GSH glutatyona bağlı enzimlerin fonksiyonları için de gereklidir (Hayes ve McLellan, 1999). Örneğin GSH-Px GSH' ı kullanarak H₂O₂'yi suya dönüştürür. Bu reaksiyonda redükte glutasyon (GSH) okside glutasyon (GSSG) formuna dönüşür. Diğer taraftan GST ise GSH ile birlikte elektrofilik gruplar taşıyan bileşikler arasındaki konjugasyonu katalizleyen, birçok farklı ksenobiyotik ve endojen bileşiklerin detoksifikasyonu ve biyotransformasyonunda rol alan, çok fonksiyonlu faz II enzim ailesinin bir üyesidir (Hamed vd., 2003). Dastan vd., (2017) polenin alabalıklarda karaciğer, dalak ve kalp dokusundaki total serbest sülfirid grup düzeylerini artırdığını, ayrıca bu maddenin total antioksidan kapasiteyi (TAS) artırarak total oksidan kapasiteyi (TOS) düşürdüğünü belirlemişlerdir. Ferreira vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmadan elde edilen sonucuna göre *Rhamdia quelen* türü balıklarda, yalnız polen uygulamasının karaciğer GST aktivitesini artırdığı, böbrek GST aktivitesini düşürdüğü, beyin dokusundaki GST aktivitesini ise etkilemediği görülmüştür. Bir arı ürünü olan propolisin oral ve enjeksiyonla uygulandığı alabalıklardaki bir çalışmada ise doku GSH düzeyleri ile katalaz aktivitelerinin arttığı tespit edilmiştir (Yonar, 2008). Polenin farklı dozlarının uygulandığı bu çalışmada da yukarıdaki araştırmacıların elde ettiği sonuçlarla uyumlu bir şekilde alabalıkların incelenen tüm dokularında GSH düzeyi ve GSH-Px aktivitesi istatistiksel olarak artarken, GST aktivitesinde önemli herhangi bir farklılık bulunmadı. Bu sonuç polenin antioksidan kapasiteyi artırdığını göstermektedir. Polenin bu etkisi yapısında bulunan fenolik maddelerden kaynaklanıyor olabilir (Leja vd., 2007).

5. ÖNERİLER

Bu çalışma sonuçlarına göre, polenin alabalıkların bazı immun ve antioksidan parametrelerini olumlu yönde etkilediği tespit edilmiştir. Bu sonuç polenin immunostimulan ve antioksidan olarak balıklara verilebileceğini, yine denemenin sonuna kadar oral yolla polen uygulanan balıklarda herhangi bir ölümün gözlenmemiş olması bu maddenin güvenle kullanılabilirliğini göstermektedir.

Arıcılığın büyük bir sektör olduğu ülkemizde yan etkisi olmayan, kolay ve ucuz bir şekilde elde edilebilen polenin pahalı ve sentetik immunostimulanların ve antioksidanların yerine kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır.

Elde edilen sonuçlara bakılarak başka balık türlerinde farklı doz ve sürelerde polen uygulamalarının sonuçlarına ihtiyaç olduğu görülmektedir.

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.
- Akkuş, İ.**, 1999. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Mimoza Yayınları, Konya.
- Altinok I., Capkın, E. and Boran, H.**, 2012. Mutagenic, genotoxic and enzyme inhibitory effects of carbosulfan in rainbow trout *Orconhynchus mykiss*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **102**, 61-67.
- Anderson, M.E.**, 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation, *Chemico-Biological Interactions*, **111-112**, 1-14.
- 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. ve Diker, K.S.**, 1994. İmmunoloji. Medisan Yayınevi, Ankara, 394s.
- Arda, M., Seçer, S., Sarıeyyüpoğlu, M.** 2005. Balık Hastalıkları. Medisan Yayınevi, Ankara, 230s.
- Armstrong, R. N.**, 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases, *Chemical Research in Toxicology*, **10**, 2-18.
- 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.
- Bastos, V.L.F.C., Folly, E., Rossini, A., Ceccarelli, P.S., Senhorini, J.C. and Bastos, J.C.,** 1998a. Paraoxonase activity in liver of Pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Characidae), *Revista Brasileira Zoologica*, **15(5)**, 677-685.
- Bastos, V.L.F.C., Rossini, A., Alves, M.V., Ceccarelli, P.S., Ferraz de Lima, J.A. and Bastos, J.C.,** 1998b. Paraoxonase activity in sera from *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Characidae) and *Hypostomus punctatus* Valenciennes (Siluridae), *Revista Brasileira Zoologica*, **15 (3)**, 665-675.
- Bastos, V.L.F.C., Alves, M.V., Bernardino, G., Ceccarelli, P.S. and Bastos, J.C.,** 2004. Paraoxonase Activity in Sera of Four Neotropical Fish, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **72**, 798–805.
- Başkol, G. ve Köse, K.,** 2004. Paraoksonaz: Biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemi, *Erciyes Tıp Dergisi*, **26 (2)**, 75-80.
- Belló, A.R.R., Fortes, E., Belló-Klein, A., Belló, A.A., Llesuy, S.F., Robaldo, R.B. and Bianchini, A.,** 2000. Lipid Peroksidasyon induced by *Clinostomum detrunctatum* in muscle of the freshwater fish *Rhamdia quelen*, *Diseases of Aquatic Organisms*, **42**, 233-236.
- Benzer, F.,** 2001. Fasciola Hepatica ile Enfekte Koyunların Kan ve Karaciğer Dokularında Arginaz, Nitrik Oksit, Bazı Antioksidant Enzimler ve Lipid Peroksidasyon Düzeyleri ile Karaciğer Arginaz Enziminin Biyokimyasal Özellikleri, *Doktora Tezi*, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ.
- Beutler, E., Deron, O. and Kelly, B.M.,** 1963. Improved method for the determination of blood glutathione, *Journal Laboratory and Clinical Medicine*, **61 (5)**, 882-888.
- Beutler, E.,** 1975. Red cell metabolism, in: *A Manual of Biochemical Methods*. Grune Strottan, New York, pp 67–69.
- Beyaztaş, S., Türker, D., Sinan, S. ve Arslan, O.,** 2007. *Cyprinus carpio* paraoksonaz enziminin bazı ağır metallerle inhibisyon etkisinin incelenmesi, 21. Ulusal Kimya Kongresi, 23-27 Ağustos, Malatya.

- Björklund, H., Rabergh, C.M.L., Bylund, G.,** 1991. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediment from fish farms, *Aquaculture*, **84**, 85-96.
- Blazer, V.S.,** 1992. Nutrition and disease resistance in fish, *Annual Reviews of Fish Diseases*, **2**, 309–323.
- Bragadottir, M.,** 2001. Endogenous antioxidants in fish, master of science in food science, Department of Food Science University of Iceland.
- Cheeseman, K.H. and Slater, T.F.,** 1993. An Introduction to Free Radical Biochemistry, *British Medical Bulletin*, **49**, 481-493.
- Cnubben, N.H.P., Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., van Zanden, J. and van Bladeren, P.J.,** 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **10**, 141-152.
- Cuesta, A., Meseguer, J. and 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. and Meseguer, J.,** 2005. *In vivo* effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses, *Fish and Shellfish Immunology*, **18**, 71-80.
- Çakır Atabek, H.,** 2012. Şiddetli Giderek Artan Direnç Egzersizin Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Direnç Egzersiz Antrenmanı Yapan ve Yapmayan Bireylerde İncelenmesi. *Doktora Tezi*, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- 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.

- Dastan, S.D., Gulhan, M.F., Selamoglu, Z., Dastan, T.,** 2017. The determination of different effective concentration of ethanolic extract of bee pollen on biochemical analysis in liver, spleen and heart tissues of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792), *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, **16(1)**, 326-340.
- Delibaş, N. ve Özcankaya, R.,** 1995. Serbest Radikaller, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **2**, 11-17.
- Demir, N.,** 1992, İhtiyoloji. İ.Ü.Yayınları, İnönü Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 390s.
- Deveci, H.A., Kaya, İ., Yılmaz, M and Karapehlivan, M.,** 2015. Effect of zinc sulphate on the levels of plasma paraoxonase activity, total oxidant and high density lipoprotein of transcaucasian barb (*Capoeta capoeta* Guldenstaedt, 1773), *Fresenius Environmental Bulletin*, **24(9)**, 2732-2735.
- 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.
- Dubravka, J., Milena, T., Branka, R., Vrea, S.R., Elsa, R. and Martin, B.,** 2001. Serum paraoxonase activities in the hemodialyzed uremic patients: Chort study, *Clinical Science*, **42**, 146-150.
- Durrington, P.N., Mackness, B. and Mackness, M.I.,** 2001. Paraoxonase and atherosclerosis, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **21**, 473-480.
- Düğenci, S.K., Arda, N., Candan, A.,** 2003. Some medicinal as immunostimulant for fish, *Journal of Ethnopharmacology*, **88**, 99-106.
- Eaton, D.L. and Bammler, T.K.,** 1999. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology, *Toxicology Sciences*, **49**, 156-164.
- 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.**, 1998. General Principles of Fish Vaccination. In: Fish Vaccination, A. E Ellis (eds), p. 1-19. Academic Press Lmt. New York.
- Ellis A.E.**, 1999. Immunity to bacteria in fish, *Fish and Shellfish Immunology*, **9**, 291–308.
- Ellman, G.L.**, 1959. Tissue sulphhydryl groups, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **82**, 70-77.
- 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.
- Ferreira, D., Unfer, T.C., Rocha, H.C., Kreutz, L.C., Gessi Koakoski, G., Barcellos, L.J.G.**, 2012. Antioxidant activity of bee products added to water in tebuconazole-exposed fish, *Neotropical Ichthyology*, **10(1)**, 215-220.
- 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.
- Folly, E., Bastos, V.L.C., Alves, M.V., Bastos, J.C. and Atella, G.C.**, 2001. A high density lipoprotein from *Piaractus mesopotamicus*, pacu, (Osteichthyes, Characidae), is associated with paraoxonase activity, *Biochimie*, **83**, 945-951.
- Fontagné, S., Bazin, D., Brèque, J., Vachot, C., Bernarde, C., Rouault, T. and Bergot, P.**, 2006. Effects of dietary oxidized lipid and vitamin A on the early development and antioxidant status of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) larvae, *Aquaculture*, **257**, 400-411.

- Gökçe, K.**, 2013. Çeşitli Kanserlerde “Glutasyon Sistemi”nin Araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Cumhuriyet Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, Sivas.
- Grinde, B., Lie, Ø., Poppe, T. and Salte, R.**, 1988. Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture, *Aquaculture*, **68**, 299-304.
- Grondel J. L., Nouws., J. F. M. and Van Muiswinkel W. B.**, 1987. The influence of antibiotics on the immun system: immunopharmakokinetic investigations on the primary anti-SRBC response in carp *Cyprinus carpio* L., after oxytetracycline injection, *Journal Fish Diseases*, **10**, 35-43.
- 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.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B.**, 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *The Journal of Biological Chemistry*, **249 (71)**, 30-7139.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.**, 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Pres, London.
- Hamed, R.R., Farid, N.M., Elowa, S.H.E. and Abdalla, A.M.**, 2003. Glutathione related enzyme levels of freshwater fish as bioindicators of pollution, *The Environmentalist*, **23**, 313–322.
- Hayes, J.D. and McLellan, L.I.** 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stres, *Free Radical Research*, **31**, 273-300.
- Ibrahem, MD., Mohamed, MF., Ibrahim, MA.**, 2013. The role of *Spirulina platensis* (Arthrospira platensis) in growth and immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its resistance to bacterial infection, *Journal of Agriculturel Science*, **5**,109-114.

- 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.
- Inglis, V., Robertson, D., Miller, K., Thompson, K. D., Richards, R. H.,** 1996. Antibiotic protection against recrudescence of latent *Aeromonas salmonicida* during furunculosis vaccination, *Journal Fish Diseases*, **19**, 341-348.
- 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).
- İspir, U., Dorucu, M.,** 2005. A study on the effects of levamisole on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **29**, 1169-1176.
- Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Z. and 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 and 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. and Jolles, J.,** 1984. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **63**, 165-89.
- Kalaycı, Ş.,** 2010. SPSS Uygulamalı Çok Değişkenli İstatistik Teknikleri, Asil Yayınları, Ankara.
- Kalender, S., Kalender, Y., Ögütçü, A., Uzunhisarcıklı, M., Durak, D. and Açıkgöz, F.,** 2002. Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E, *Toxicology*, **202**, 227-235.
- Karataş, T. ve Kocaman, E.M.,** 2012. Comparison of Paraoxonase Activity, Malondialdehyde and High-Density Lipoprotein Levels in Cultivated Normal and Albino Rainbow Trout Reared in the Same Conditions, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **18(1)**, 87-90.

- Karataş, T. ve Kocaman, E.M.**, 2014. Susceptibility to oxidative damage in wild and cultured brook trouts (*Salvelinus fontinalis* Mitchell, 1815), *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, **2(1)**, 180-183.
- Kaya, E.**, 2005. Klorprifos ve deltamethrin'in kan ve beyin lipid peroksidasyon ve antioksidan enzim aktivitelerine etkileri, *Yüksek Lisans Tezi*, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Isparta.
- Kocaçalışkan, İ. ve Bingöl, N.A.**, 2008. Biyoistatistik, Nobel Yayınları, Yayın No: 1305, Ankara.
- Konuk, T.**, 1981. Pratik fizyoloji, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, **378**, Ankara, 250 s.
- Köse, K. ve Doğan, P.**, 1992. Lipit peroksidasyonu, *Erciyes Tıp Dergisi*, **1**, 340-350.
- La Du, B.N., Aviram, M., Billecke, S., Navab, M., Primo-Parmo, S., Sorenson, R.C. and Standiford, T.J.**, 1999. On the physiological role(s) of the paraoxonases, *Chemico Biological Interactions*, **119-120**, 379-388.
- Lange, S.R., Bambir, S., Dodds, A.W. and 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. and 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, G.A. and Dauterman, W.C.**, 2000. Conjugation and Elimination of Toxicants, in *Introduction to Biochemical Toxicology*, pp. 115-135, Eds. Hodgson, E. & Smart, R.C., Wiley and Sons Inc., USA.
- LeBlanc, B. W. Davis, O. K., Boue, S., DeLuca, A., Deeby, T.**, 2009. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen, *Food Chemistry*, **115**, 1299-1305.
- Leja, M., Mareczek, A., Wyżolik, G., Klepacz-Baniak, J., Czekońska, K.**, 2007. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species, *Food Chemistry*, **100 (1)**, 237-240.
- Lowry, O.H., Rosenberough, N.J., Farr, A.L. and Randal, R.J.**, 1951. Protein measurement with folinphenol reagent, *Journal of Biochemistry*, **193**, 265-275.

- Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., Connelly, P.W. and Hegele, R.A.,** 1996. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins, *Current Opinion Lipidology*, **7**, 69-76.
- Magnadottir, B., Lange, S., Gudmundsdottir, S., Bogwald, J. and 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.
- McDowell, L.R.,** 1989. Vitamins in animal nutrition-comparative aspects to human nutrition: Vitamin E. In McDowell, L.R. Academic Press, London. pp 93–131.
- McL Pres, C. and 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.
- Morales, A.E., Pèrez-Jimènez, A., Hidalgo, M.C., Abellán, E. and Gabriel C.G.,** 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver, *Comparative Biochemistry and Physiology C*, **139** (1-3), 153-161.
- Mourente, G., Diaz-Salvago, E., Bell, J.G. and Tocher, D.R.,** 2002. Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: attenuation by dietary vitamin E, *Aquaculture*, **214**, 343-361.
- Murai, T., Kodama, H., Naiki, M., Mikami, T. and Izawa, H.,** 1990. Isolation and characterization of rainbow trout C-reactive protein, *Developmental and Comparative Immunology*, **14**, 49-58.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, R.A., Rodwell, V.W.,** 1996. Harper's biochemistry, McGraw-Hill Medical, U.S.A.
- Nakanishi, Y., Kodama, H., Murai, T., Mikami, T. and Izawa, H.,** 1991. Activation of rainbow trout complement by C-reactive protein, *American Journal of Veterinary Research*, **52**, 397-401.

- Pena-Llopis, S., Pena, J.B., Sancho, E., Fernandez-Vega, C. and Ferrando, M.D.,** 2001. Glutathione-dependent resistance of the European eel *Anguilla anguilla* to the herbicide molinate, *Chemosphere*, **45**, 671-681.
- Peleteiro, M.C. and Richards, R.H.,** 1990. Phagocytic cells in the epidermis of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, *Journal of Fish Diseases*, **13**, 225-232.
- Piner, P.,** 2005. Fenthion içeren ortamda BSO ve NAC'nin *Oreochromis niloticus*'da beyin dokusunda glutasyon metabolizması, lipid peroksidasyonu ve asetilkolinesteraz aktivitesine etkileri, *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Adana.
- Placer, Z.A., Cushman, L. and Johnson, B.C.,** 1966. Estimation of products of lipid peroxidation (Malonyl dialdehyde) in biological fluids, *Analytical Biochemistry*, **16**, 359-364.
- Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T. and 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.
- Puangkaew, J., Kiron, V., Satoh, S. and Watanabe, T.,** 2005. Antioxidant Defense of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Relation to Dietary n-3 Highly Unsaturated Fatty Acids and Vitamin E Contents, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **140**, 187-196.
- Rehulka, J.,** 2000. Influence of astaxanthin on growth rate, condition and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Aquaculture*, **90**, 27-47.
- Rehulka, J.,** 2002. Aeromonas causes severe skin lesions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): clinical pathology, haematology and biochemistry, *Acta Veterinari Brno*, **71**, 351-360.
- Roberts, R. J.,** 1978. Fish Pathology, Bailliere Tindal, London, 368 p.
- Rodrigo, L., Hernandez, F., Caballero, L., Gil, F. and Pla, A.,** 2001. Immunohistochemical evidence for the expression and induction of paraoxonase in rat liver, kidney, lung and brain tissue. Implications for its physiological role, *Chemico Biological Interactions*, **137**, 123-137.
- Sağlam, N., Yonar, M.E.,** 2009. Effects of sulfamerazine on selected haematological and immunological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792), *Aquaculture Research*, **40**, 395-404.

- Sakai, M.**, 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, **172**, 63 – 92.
- Sayın, D., Türker Çakır, D., Gençer, N. and Arslan, O.**, 2012. Effects of some metals on paraoxonase activity from shark *Scyliorhinus canicula*, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **27(4)**, 595-598.
- Sen, C.K. and Packer, L.**, 2000. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*, **72**, 653-669.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A.**, 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**, 144-158.
- Siwicki, A. and 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. and 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. and 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.
- Sümbüloğlu, K.**, 1998. Biyoistatistik, Hatipoğlu Yayınevi, Yayın No: 53, Ankara.
- 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.
- Türkoğlu, S., Gülcü Bulmuş, F., Parmaksız, A., Özkan, Y., ve Gürsu, F.**, 2008. Metabolik Sendromlu Hastalarda Paraoksonaz 1 ve Arilesteraz Aktivite Düzeyleri, *Fırat Tıp Dergisi*, **13(2)**, 110-115.
- Ulusoy E., Kolaylı, S.**, 2014. Phenolic composition and antioxidant properties of Anzer Bee pollen, *Journal of Food Biochemistry*, **38(1)**, 73-82

- Uno, K., Aoki, T. and Ueno, R.**, 1993. Pharmacokinetics of sulphamonomethoxine and sulphadimethoxine following oral administration to cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture*, **115**, 209-219.
- Van Muiswinkel, W.B.**, 1992. Fish immunology and fish health, *Netherlands Journal of Zoology*, **42**, 494-499.
- Xu, X., Sun, L., Dong, J. and Zhang, H.** 2009. Breaking the cells of rape bee pollen and consecutive extraction of functional oil with superficial carbon oxide, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **10**, 42-46.
- Yanbeyi, S.**, 1999. Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri, *Doktora Tezi*, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Samsun.
- 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 gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nın tedavisinde propolis kullanılması, *Doktora Tezi*, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ.
- Yonar, M.E., Mişe Yonar, S., Çoban, M.Z. and Eroğlu, M.**, 2012. The Effect of Propolis on Serum Paraoxonase and Arylesterase Enzyme Activities in *Cyprinus carpio* During Chromium Exposure, *Fresenius Environmental Bulletin*, **21(6)**, 1399-1402.

ÖZGEÇMİŞ

Elazığ'da 18.04.1990 tarihinde doğdum. İlk öğrenimimi Pertek, orta ve lise öğrenimimi ise Elazığ'da tamamladım. Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'ni 2008 yılında kazandım. Bu fakülteden 2012 yılında mezun oldum. Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı'nda 2012 yılında yüksek lisans yapmaya başladım. Halen bu eğitimim devam etmektedir.

Yassir YÖNTÜRK