

T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANA BİLİM DALI



ÇİPURA (*Sparus aurata*) YETİŞTİRİCİLİĞİNDE
KULLANILABİLECEK ALTERNATİF BAĞIŞIKLIK UYARICI
VE TEDAVİ EDİCİ TIBBİ BİTKİLERİN BELİRLENMESİ

OSMAN NEZİH KENANOĞLU

DOKTORA TEZİ

DOÇ. DR. SONER BİLEN

MAYIS - 2023

KASTAMONU

TAAHHÜTNAME

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını, bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini bildirir ve taahhüt ederim.

Osman Nezih KENANOĞLU

ÖZET

DOKTORA TEZİ

ÇİPURA (*Sparus aurata*) YETİŞTİRİCİLİĞİNDE KULLANILABİLECEK ALTERNATİF BAĞIŞIKLIK UYARICI VE TEDAVİ EDİCİ TIBBİ BİTKİLERİN BELİRLENMESİ

OSMAN NEZİH KENANOĞLU

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN: DOÇ. DR. SONER BİLEN
EŞ DANIŞMAN: DOÇ. DR. SEVDAN YILMAZ

Bu çalışmada, yem katkı maddesi olarak kullanılan ısırgan otu (*Urtica dioica*) ve akçakesme bitkisi (*Phillyrea latifolia*) etanolik özütlerinin, çipura (*Sparus aurata*) balıklarında büyüme performansına, hematolojik parametrelere, doğal bağışıklık yanıtlara ve ayrıca ısırgan otu deneyi sonunda *Vibrio (Listonella) anguillarum* patojenine karşı hayatta kalma oranına etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, 0 mg/kg (kontrol); 50 mg/kg; 100 mg/kg; 200 mg/kg ve 400 mg/kg oranlarında ısırgan otu ve akçakesme etanolik özütleri yemlere ilave edilmiş, 60 gün süreyle çipura balıklarında denemesi gerçekleştirilmiştir. Her bitki için ayrı kurulan deneylerin sonucunda; ısırgan otu ve akçakesme özütlerinin büyüme performansında ve kırmızı kan hücresi, hematokrit, hemoglobin gibi kan parametrelerinde olumsuz bir etki göstermeden bağışıklığı uyardığı tespit edilmiştir. Bitkilerin farklı dozlarda yeme ilavesi sonucunda, lizozim ve myeloperoksidaz aktivitelerinde önemli artışların olduğu ($p<0,05$); sadece ısırgan özütü için gerçekleştirilebilen solunum patlama aktivitesinde de artış sağlandığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Sadece ısırgan otu için gerçekleştirilebilen kontrol testi sonucunda, 100 mg/kg konsantrasyonunda yeme ilave edilen ısırgan otu etanolik özütünün çipura balıklarında *Vibrio (Listonella) anguillarum* patojenine karşı %96'lık yaşama oranı sağladığı tespit edilmiştir. Her iki bitki denemesinde bağışıklıktan sorumlu genlerin (IL-1 β ; IL-6, IL-10, IL-18 ve TNF- α) ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişimler ile birlikte humoral yanıtlar ele alınmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Sonuç olarak 100 mg/kg ısırgan otu ya da 200 mg/kg veya 400 mg/kg akçakesme etanolik özütlerinin yem katkı maddesi olarak kullanılması, çipura balıklarında bağışıklığın önemli derecede aktive olmasını sağlamıştır.

ANAHTAR KELİMELELER:Çipura, ısırgan otu, Akçakesme, Etanolik özüt, Büyüme, Hematolojik parametreler, Bağışıklık, Gen ekspresyonu

Mayıs 2023, 96 Sayfa

ABSTRACT

PH.D THESIS

DETERMINATION OF ALTERNATIVE MEDICINAL PLANTS COULD BE USED AS IMMUNOSTIMULANT AND THERAPEUTICS IN GILTHEAD SEA BREAM (*Sparus aurata*) CULTURE

OSMAN NEZİH KENANOĞLU

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
DEPARTMENT OF AQUACULTURE

SUPERVISOR: ASSOC. PROF. SONER BİLEN
CO-SUPERVISOR: ASSOC. PROF SEVDAN YILMAZ

In this study, it was aimed to determine the effects of nettle (*Urtica dioica*) and green olive tree (*Phillyrea latifolia*) ethanolic extracts, which are used as feed additives, on growth performance, hematological parameters and natural immune responses in sea bream (*Sparus aurata*). In addition, the effects on the survival rate against *Vibrio (Listonella) anguillarum* pathogen were determined at the end of the stinging nettle experiment. In the study, nettle and green olive tree ethanolic extracts at the rates of 0 mg/kg (control); 50mg/kg; 100mg/kg; 200 mg/kg and 400 mg/kg were added to the feeds, and the experiment was carried out in sea bream fish for 60 days. As a result of the experiments established separately for each plant; It has been determined that nettle and green olive tree extracts stimulate immunity without having a negative effect on growth performance and blood parameters such as red blood cell, hematocrit and hemoglobin. As a result of the addition of plants to the food at different doses, there were significant increases in lysozyme and myeloperoxidase activities ($p<0.05$); It was also determined that there was an increase in respiratory burst activity, which can only be achieved for nettle extract ($p<0.05$). As a result of the control test, which can be performed only for nettle, it was determined that the ethanolic extract of nettle added to the feed at a concentration of 100 mg/kg provided a 96% survival rate against the *Vibrio (Listonella) anguillarum* pathogen in sea bream. In both plant experiments, changes in the expression levels of genes responsible for immunity (IL-1 β ; IL-6, IL-10, IL-18 and TNF- α) and humoral responses were discussed and the results were evaluated. As a result, the use of 100 mg/kg nettle or 200 mg/kg or 400 mg/kg green olive tree ethanolic extracts as feed additives resulted in a significant activation of immunity in sea bream fish.

KEYWORDS:Sea bream, Nettle, Green olive tree, Ethanolic extract, Growth, Hematological parameters, Immunity, Gene expression

May 2023, 96 Page

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerekleştirilmesinde, alışmam boyunca benden hibir zaman yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Soner BİLEN'e ve ikinci danışman hocam Doç. Dr. Sevdan YILMAZ'a, çalışma sũresince tũm zorlukları benimle gũęũsleyen eşim Nihan AKINCI KENANOğLU ve oğlum Őnder KENANOğLU'na ve hayatımın her evresinde bana destek olan rahmetli annem Birsen KENANOğLU başta olmak ũzere babam Mehmet Akif KENANOğLU'na ve ablam Burcu Begũm KENANOğLU'na sonsuz teőekkũrlerimi sunarım. Bu doktora tez çalışmasında canlı materyal desteğini bize sağlayan Çanakkale İDA Gıda A.ř. 'ye, denemenin gerçekleşmesi için laboratuvarlar imkanlarını sağlayan Prof. Dr. Ekrem şanver ÇELİK'e, deneylerin yũrũtũlmesinde, analizlerin yapılmasında yardımcı olan Rıdvan Erdem KANAT'a ve Bircan TAŐŐI 'ya, PCR analizlerinde laboratuvarının kapılarını açan Prof. Dr. Kemal Melih TAŐŐIN'a, çalışmalarımnda fikir ve gũrũřlerini benden hiçbir zaman esirgemeyen Doç. Dr. Ertuğrul TERZİ'ye teőekkũrlerimi borç bilirim.

Osman Nezih KENANOğLU

Kastamonu, 2023

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEZ ONAYI	ii
TAAHHÜTNAME	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1 Çipura (<i>Sparus aurata</i>) Hakkında Genel Bilgiler	3
2.1.1 Çipura Biyolojisi ve Beslenme Özellikleri	4
2.1.2 Çipura Balıklarında Görülebilen Bakteriyel Hastalıklar	4
2.1.2.1 Vibriosis hakkından genel bilgiler	5
2.2 Balıklarda Büyüme ile Beslenmenin İlişkisi	5
2.3 Balıklarda Hematolojik Analizler ve Önemi	6
2.3.1 Kırmızı Kan Hücreleri	7
2.3.2 Hemoglobin Seviyesi	7
2.3.3 Hematokrit Seviyesi	8
2.3.4 Ortalama Eritrosit Hacmi	8
2.3.5 Eritrosit Başına Düşen Ortalama Hemoglobin	8
2.3.6 Eritrosit Başına Düşen Ortalama Hemoglobin Konsantrasyonu	8
2.4 Bağışıklık Sisteminde Görev Alan Organlar	9
2.4.1 Timus	9
2.4.2 Böbrekler	9
2.4.3 Dalak	10
2.4.4 Karaciğer	10
2.4.5 Bağırsak	11
2.5 Balıklarda Bağışıklık Sistemi	11
2.5.1 Balıklarda Spesifik Olmayan Bağışıklık Sistemi	11
2.5.1.1 Spesifik olmayan bağışıklığın hücresel yanıtları	12
2.5.1.2 Fagositoz	13
2.5.1.3 Oksidatif metabolizma ve süperoksit radikal üretimi	14
2.5.1.4 Lizozomal enzimler	14
2.5.2 Balıklarda Adaptif Bağışıklık	15
2.5.3 Araştırmada Çalışılan Sitokinler	15
2.5.3.1 İnterlökin-1 β (IL-1 β)	16
2.5.3.2 İnterlökin-18 (IL-18)	16
2.5.3.3 İnterlökin-6 (IL-6)	17
2.5.3.4 İnterlökin-10 (IL-10)	17
2.5.3.5 Tümör nekroz faktör- α (TNF- α)	18
2.6 Tıbbi Bitkiler Hakkında Genel Bilgiler	18
2.6.1 Tıbbi Bitkilerin Deniz Balıklarında Kullanımın Etkileri	19

2.6.2	Tıbbi Bitkilerin Etki Mekanizmaları.....	19
2.6.3	Tıbbi Bitkilerin Balıkların Büyüme Performansına Etkisi	20
2.6.4	Tıbbi Bitkilerin Balık Hematolojisine Etkisi	22
2.6.5	Tıbbi Bitkilerin Balık İmmunolojisine Etkisi	23
2.6.6	Isırgan Otu (<i>Urtica dioica</i>) Hakkında Genel Bilgiler	25
2.6.7	Akçakesme (<i>Phillyrea latifolia</i>) Hakkında Genel Bilgiler	26
3.	MATERYAL VE YÖNTEM	28
3.1	Deneme Alanı.....	28
3.2	Kullanılan Materyaller ve Denemelerin Dizaynı	29
3.2.1	Deneme 1	30
3.2.2	Deneme 2	32
3.3	Su Kalitesi Fizikokimyasal Analizleri.....	33
3.4	Büyüme Performansı ve Yemden Yararlanmanın Hesaplanması	33
3.5	Balıklardan Kanın Örneklenmesi ve Analizleri	33
3.5.1	Hematolojik Analizler.....	34
3.5.1.1	Eritrosit indeksleri.....	35
3.5.2	İmmunolojik Analizler.....	35
3.5.2.1	Solunum patlaması.....	35
3.5.2.2	Lizozim aktivitesi.....	36
3.5.2.3	Myeloperoksidaz aktivitesi	37
3.5.3	Sitokin Genlerin Ekspresyon Analizleri	37
3.5.3.1	RNA saflaştırması	37
3.5.3.2	Komplementer DNA (cDNA) sentezi.....	38
3.5.3.3	RT-qPCR analizleri ve gen ekspresyonları	39
3.5.4	Kontrol Testi	40
3.5.5	İstatistiksel Analizler	40
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	41
4.1	Deneme 1.....	41
4.1.1	Fiziksel ve Kimyasal Su Kalitesi Bulguları	41
4.1.2	Büyüme Performansı Bulguları	41
4.1.3	Hematolojik Bulgular	42
4.1.4	İmmunolojik Bulgular.....	42
4.1.4.1	Solunum patlaması.....	42
4.1.5	Lizozim Aktivitesi	43
4.1.6	Myeloperoksidaz Aktivitesi.....	44
4.1.7	Gen Ekspresyonu Seviyeleri	45
4.1.7.1	IL-1 β	45
4.1.7.2	IL-6.....	46
4.1.7.3	IL-10.....	47
4.1.7.4	IL-18.....	48
4.1.7.5	TNF- α	50
4.1.8	Yaşama oranı bulguları	51
4.2	Deneme 2.....	52
4.2.1	Fiziksel ve Kimyasal Su Kalitesi Bulguları	52
4.2.2	Büyüme Performansı Bulguları	52
4.2.3	Hematolojik Bulgular	53
4.2.4	İmmunolojik Bulgular.....	53
4.2.4.1	Lizozim aktivitesi.....	53
4.2.4.2	Myeloperoksidaz aktivitesi	54

4.2.5	Gen Ekspresyonları.....	55
4.2.5.1	IL-1 β	55
4.2.5.2	IL-6.....	56
4.2.5.3	IL-10.....	57
4.2.5.4	IL-18.....	58
4.2.5.5	TNF- α	59
5.	TARTIŞMA	61
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	70
6.1	Sonuçlar.....	70
6.2	Öneriler.....	71
KAYNAKLAR		73
ÖZGEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1 Çipura (<i>Sparus aurata</i>) balığı	3
Şekil 2.1 Isırgan otu biyoaktif bileşenler ve fonksiyonel özellikleri	26
Şekil 2.2 Akçakesme ağacı yaprak ve meyveleri	27
Şekil 3.1 Balıklarda besleme çalışmasının yapıldığı alan	28
Şekil 3.2 Yüksek hızlı değirmen yardımıyla ısırgan otu yapraklarının öğütülmesi... 30	
Şekil 3.3 Özütün spreyle yeme homojen şekilde aktarılması	30
Şekil 3.4 Çipura kaudal venasından kan alımı	31
Şekil 3.5 Akçakesme fideleri ve kurumuş yapraklarının öğütülmesi	32
Şekil 3.6 K3EDTA ve jelli serum tüpleri içerisine pay edilmiş kan örnekleri	34
Şekil 3.7 Otomatik kan sayım cihazı	34
Şekil 3.8 Multiskan spektrofotometrede örneklerin okunması	36
Şekil 3.9 Dokuların homojenizasyonu	38
Şekil 3.10 Örneklerin bir dizi protokolle RT-qPCR işlemine tabi tutulması	39
Şekil 4.1 Isırgan otunun çipura balıklarında solunum patlaması aktivitesine etkisi .. 43	
Şekil 4.2 Isırgan otunun çipura balıklarında lizozim aktivitesine etkisi	44
Şekil 4.3 Isırgan otunun çipura balıklarında myeloperoksidaz aktivitesine etkisi	44
Şekil 4.4 Isırgan otunun çipura dalak dokusunda IL-1 β gen ifadesine etkisi	45
Şekil 4.5 Isırgan otunun çipura bağırsak dokusunda IL-1 β gen ifadesine etkisi	46
Şekil 4.6 Isırgan otunun çipura dalak dokusunda IL-6 gen ifadesine etkisi	46
Şekil 4.7 Isırgan otunun çipura bağırsak dokusunda IL-6 gen ifadesine etkisi	47
Şekil 4.8 Isırgan otunun çipura dalak dokusunda IL-10 gen ifadesine etkisi	48
Şekil 4.9 Isırgan otunun çipura bağırsak dokusunda IL-10 gen ifadesine etkisi	48
Şekil 4.10 Isırgan otunun çipura dalak dokusunda IL-18 gen ifadesine etkisi	49
Şekil 4.11 Isırgan otunun çipura bağırsak dokusunda IL-18 gen ifadesine etkisi	49
Şekil 4.12 Isırgan otunun çipura dalak dokusunda TNF- α gen ifadesine etkisi	50
Şekil 4.13 Isırgan otunun çipura bağırsak dokusunda TNF- α gen ifadesine etkisi ... 51	
Şekil 4.14 <i>Vibrio (Listonella) anguillarum</i> bakterisine maruz bırakılan balıklarda yaşama oranları	51
Şekil 4.15 Akçakesme bitkisinin çipura balıklarında lizozim aktivitesine etkisi	54
Şekil 4.16 Akçakesme bitkisinin çipura balıklarında myeloperoksidaz aktivitesine etkisi	54
Şekil 4.17 Akçakesme bitkisinin çipura dalağında IL-1 β gen ifadesine etkisi	55
Şekil 4.18 Akçakesme bitkisinin çipura bağırsağında IL-1 β gen ifadesine etkisi	56
Şekil 4.19 Akçakesme bitkisinin çipura dalağında IL-6 gen ifadesine etkisi	56
Şekil 4.20 Akçakesme bitkisinin çipura bağırsağında IL-6 gen ifadesine etkisi	57
Şekil 4.21 Akçakesme bitkisinin çipura dalağında IL-10 gen ifadesine etkisi	57
Şekil 4.22 Akçakesme bitkisinin çipura bağırsağında IL-10 gen ifadesine etkisi	58
Şekil 4.23 Akçakesme bitkisinin çipura dalağında IL-18 gen ifadesine etkisi	59
Şekil 4.24 Akçakesme bitkisinin çipura bağırsağında IL-18 gen ifadesine etkisi	59
Şekil 4.25 Akçakesme bitkisinin çipura dalağında TNF- α gen ifadesine etkisi	60
Şekil 4.26 Akçakesme bitkisinin çipura bağırsağında TNF- α gen ifadesine etkisi ... 60	

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan ticari yemin bileşimi	29
Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan primerler.....	39
Tablo 4.1 30. gün sonunda ısırgan otunun, çipuraların büyüme performanslarına etkisi.....	41
Tablo 4.2 60. gün sonunda ısırgan otunun, çipuraların büyüme performanslarına etkisi.....	42
Tablo 4.3 60. günde ısırgan otu denemesinin hematolojik değişimlere etkisi	42
Tablo 4.4 30. gün sonunda akçakesmenin, çipuraların büyüme performanslarına etkisi.....	52
Tablo 4.5 60. gün sonunda akçakesmenin, çipuraların büyüme performanslarına etkisi.....	52
Tablo 4.6 60. günde akçakesme denemesinin hematolojik değişimlere etkisi	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
C	Santigrat
gr	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
kg	Kilogram
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
°	Derece
O ₂	Oksijen
OH ⁻	Hidroksit
OH	Hidroksil
α	Alfa
β	Beta

Kısaltmalar

cDNA	Komplementer DNA
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Dinükleotittrifosfatlar
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
HBSS	Hank'in dengeli tuz solüsyonu
HCT	Hematokrit
HGB	Hemoglobin
NFW	Nükleaz içermeyen saf su
IL	İnterlökin
KOH	Potasyum hidroksit
MCH	Ortalama korpüsküler hemoglobin
MCHC	Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
MCV	Ortalama korpüsküler hacim
NBT	Nitroblue Tetrazolium
NFW	Nükleaz içermeyen su
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
ORÜ	Oksidatif radikal üretimi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RBC	Kırmızı kan hücresi
RNA	Ribonükleik asit

RT-qPCR
TNF
TÜİK
YDO
APC
MHC

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
Tümör Nekroz Faktörü
Türkiye İstatistik Kurum
Yem dönüşüm oranı
Antijen sunan hücre
Majör doku uygunluk kompleksi



1. GİRİŞ

Su ürünleri yetiştiriciliği, bilim ve teknolojinin gelişmesi ile birlikte, ülkemizde ve dünyada giderek hız kazanmakta; kısıtlı kaynaklar kullanılarak maksimum verimin elde edilmesi amaçlanmaktadır. İstatistiklere göre, dünya genelinde 2020 yılında yetiştiricilik yoluyla elde edilen ve hacmi 87 milyon 503 bin ton olan su ürünleri üretiminin 33 milyon tonunun denizlerden sağlandığı bilinmektedir (FAO, 2020). Ülkemizde ise; 2021 yılında yetiştiricilik yoluyla 471 bin 686 ton hacminde üretim gerçekleşmiş olup, söz konusu miktarın 335 bin 644 tonu denizlerden, 136 bin 042 tonu iç sulardan sağlanmış ve çipura ise bu üretimden 133 bin 476 ton ile önemli bir pay almıştır (TÜİK, 2022). FAO (2020), verilerine göre çipura balığının dünya genelinde gerçekleştirilen su ürünleri yetiştiriciliğinden %0,3'lük pay aldığı belirtilmiştir. Ülkemizde özellikle Akdeniz havzasının çipura balığı yetiştiriciliği için bir numaralı konumda olduğu bildirilmiştir (Tolon, 2019). Ülkemizde yetiştiricilik yoluyla elde edilen balık üretiminin çok önemli miktarı levrek, çipura ve alabalıktan oluşmaktadır. Denizlerimizde yetiştiricilik yoluyla üretilen balıkların %35'ini levrek, %26'sını çipura, %30'unu alabalık oluşturmaktadır (Çöteli, 2020). Balık üretim hacminin ve buna bağlı olarak üretim stok yoğunluklarının giderek artması beraberinde stres ve hastalıkların görülme sıklığını da arttırmaktadır (Yılmaz vd., 2016). Günümüzde, balık hastalıklarıyla mücadelede artan antibiyotik kullanımı, çevre ve tüketici yönünden istenmeyen sonuçlara neden olmakta, bu duruma bağlı olarak alternatif tedavi ve bağışıklık güçlendirme yöntemleri giderek hız kazanmaktadır (Bilen vd., 2011; Bilen vd., 2019b; Sönmez vd., 2015; Yılmaz vd., 2020). Antibiyotiklerin hastalıkları tedavi etmede genellikle başarılı olduğu bilinse de, kalıntıları çevrede veya balık dokularında birikerek, antimikrobiyal dirençli suşların ortaya çıkmasına ve insan sağlığını olumsuz etkilenmesine neden olmakta ve bundan dolayı kullanımları kısıtlanmaktadır (Rossolini vd., 2014; Santos ve Ramos, 2016). Fakat ortaya çıkabilecek salgın hastalıkların kontrol edilebilmesi için gereken durumlarda ayırım gözetmeksizin çeşitli kemoterapötikler ve antibiyotikler günümüzde halen kullanılmaktadır (Vaseeharan ve Thaya, 2014). Meydana gelebilecek bu tür durumlara karşı tedbir amaçlı yapılan aşılama, her ne kadar hastalık salgınlarına karşı etkili bir koruyucu seçenek olsa da, maliyetlerinin genellikle çok yüksek olması, balık

çiftliklerinde yaygın kullanım açısından pratik olmaması ve tek bir aşının sadece bir patojen tipine karşı spesifik etki göstermesi durumları göz önünde bulundurulduğunda, başka alternatif çözümlere duyulan ihtiyaç kaçınılmaz olmuştur (Harikrishnan vd., 2011a; Sakai, 1999). Tüm bu durumlar ele alındığında, tıbbi bitkilerin ve türevlerinin balık hastalıklarını önlemek veya kontrol altına almak için umut verici alternatif bir yöntem olarak geliştirilmesine yönelik küresel bir eğilim mevcuttur (Reverter vd., 2014; Van Hai, 2015). Tıbbi bitkilerin yem katkı maddesi olarak kullanılması ile balıklarda doğal ve spesifik savunma mekanizmalarının gelişimine destek sağlanmaktadır (Bilen vd., 2019b; Dügenci vd., 2003). Tıbbi aromatik bitkilerin bağışıklık güçlendirici olarak kullanılması, hastalıklara karşı direnç artışı sağlamakta ve yaşama oranını arttırmaktadır (Lakwani vd., 2022; Yılmaz vd., 2011). B ve T lenfositleri, lizozim, komplement, doğal öldürücü hücreler ve fagositoz gibi bağışıklık sisteminin çeşitli parçalarının etkinleşmesinde bitkilerin aktif bileşenlerinin rol oynadığı ve bu bağlamda, bitkisel özlerin balıklarda immün sistemi güçlendirmek için kullanılabileceği bilinmektedir (Baba, 2017; Bilen vd., 2016b). Farklı ürünlerden meydana gelen glukanlar, bakteriyel ürünler ve bitkisel içerikler gibi bağışıklık güçlendiriciler özellikle doğal bağışıklıktan sorumlu genlerin uyarılmasında, direk rol oynayabilir (Bricknell ve Dalmo, 2005). Ayrıca tıbbi bitki özütlerinin, balıkların yaşama oranlarına ve büyüme performanslarına da olumlu yönde katkı sağladığı literatürde yer alan bilgiler arasındadır (Awad ve Awaad, 2017; Bilen vd., 2016a; Yılmaz vd., 2020). Bitkisel immüностimulantların; vücut tarafından kolay absorbe edilerek büyük oranda emilmesi, destekleyici maddeleri (vitamin, eser element, antimikrobiyal, antioksidan ve besleyici maddeler) içermesi, vücuttan atılımının kolay ve hızlı olması ve rezidüye sebebiyet vermemesi gibi nedenlerden dolayı, kimyasal immüностimulantlara göre kullanımı oldukça avantajlıdır (Poppenga, 2002).

Bu çalışmada doğada özellikle bol miktarda bulunabilen ısırgan otu (*Urtica dioica*) ve akçakesme (*Phillyrea latifolia*) tıbbi bitkileri, %96'lık etanolik özütlerinin; çipura balıklarında büyüme performansına, hematoloji ve bağışıklık parametrelerine ayrıca bağışıklıktan sorumlu gen ekspresyon seviyelerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla gerçekleştirilen deneyler; ısırgan otu (1. deneme) ve akçakesme bitkisi (2. deneme) için olacak şekilde iki ayrı zamanda gerçekleştirilmiştir. Ayrıca 1. deneme kapsamında balıklar *Vibrio anguillarum* bakterisi ile kontrol testine tabi tutulmuşlardır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 Çipura (*Sparus aurata*) Hakkında Genel Bilgiler

Sparidae familyasının bir üyesi olan çipura (*Sparus aurata*) (Şekil 1.1), genellikle Akdeniz’de yayılım gösteren bir tür olup, Atlas Okyanusu’nun doğusundan, İngiltere ve Kanarya Adalarının kıyılarına kadar geniş bir alanda görülmektedir (Chaoui vd., 2006). Genellikle tropikal, subtropikal ve ılıman kuşaklarda yaşayan çipura, ülkemizde ise daha çok güney sahilleri ve Ege kıyılarında dağılım göstermektedir (Aydın ve Sözer, 2016).



Şekil 1.1 Çipura (*Sparus aurata*) balığı (URL-1, 2023)

Alem:	Animalia (Hayvanlar)
Şube:	Chordata (Kordalılar)
Sınıf:	Actinopterygii (Işınsal yüzgeçliler)
Takım:	Perciformes
Aile:	Sparidae
Cins:	Sparus
Tür:	<i>S. aurata</i>

2.1.1 Çipura Biyolojisi ve Beslenme Özellikleri

Sert ağız ve diş yapıları ile karnivor bir tür olan çipura balıklarının temel besinlerini kabuklular, yumuşakçalar, kurtçuklar oluşturmaktadır. Yaşadığı su sıcaklık değerleri 6-32 °C arasında iken, en iyi gelişimi 22-25 °C 'de aralığında göstermektedirler. %10-40 tuzluluk değişimine dayanabilen bu tür, genellikle 5-25 m derinliklerde dağılım gösterirler. 30 m'den sığ derinliklerde çipura genç bireylerine rastlanırken, 150 m'ye kadar olan derinliklerde yetişkin bireylere rastlanılabilmektedir (Bauchot, 1986). 2 yaşında cinsel olgunluğa ulaşan çipuralar, hermafrodit özelliğe sahip olup, gonadlarında bulunan heteroseksüel bölgelerin aktive olması ile 3. ve 4. yaşından itibaren dişiliğe geçiş yapabilmektedirler (Memiş, 2006). Fırsatçı karnivor (etçil) tür olan çipuraların (Francescon, 1987) beslenme özelliği; büyüklüğüne, çevresel besinlere, habitata ve mevsime göre değişkenlik gösterebilmektedir (Wassef ve Eisawy, 1985). Büyütme döneminden itibaren çipuraların beslenme ihtiyaçlarını karşılayacak şekilde; %46-52 protein, %10-11 ham yağ, %2-4 selüloz, %12-13 ham kül, %1,4-2,2 kalsiyum, %1,15-1,5 fosfor ve ayrıca yeterli miktarda vitaminler ve iz elementler içeren yemler verilmektedir (URL-2, 2022). Yemin ete dönüşüm oranını ifade eden YDO (yem dönüşüm oranı), değerinin 1,5-2 arasında değiştiği çipura balıklarında, yumurtadan yeni çıkmış larvanın, 18-24 ay sonra 400g ağırlığa ulaşabildiği rapor edilmiştir (Pavlidis ve Mylonas, 2011).

2.1.2 Çipura Balıklarında Görülebilen Bakteriyel Hastalıklar

Yoğun kültür sistemlerinin genellikle optimal olmayan koşullarında, hastalık salgınları tehlikesi her zaman mevcuttur. Özellikle geçmişte karantina kısıtlamalarının nadiren uygulanmasından dolayı belirli patojenler önemli coğrafi mesafeleri kat etmiş ve yeni ortamlarda çoğalmak için ideal koşulları bulmuşlardır (Colorni ve Padrós, 2011). Sparidae familyasında, birincil sağlık sorunları hala enfeksiyöz ajanlarla ilgili olup sıklıkla hastalık yapan bakteriler *Photobacterium damsela* ssp., *Vibrio* spp., *Tenacibaculum maritimum*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Mycobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Epitheliocystis* olarak literatürde yer almıştır (Colorni ve Padrós, 2011).

2.1.2.1 Vibriosis hakkında genel bilgiler

Vibriosis, Vibrionaceae ailesine ait çok sayıda bakterinin neden olduğu bir hastalığa verilen isimdir. Bu bakteri ailesi, kıyı ve nehir ağız ortamlarında yaygındır. Vibrio bakterilerinin su ortamında bulunduğu ve balıkların normal bağırsak florasının bir parçası olduğu bilinmektedir (Inglis vd., 1993). Fakat *Vibrio (Listonella) anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi (carchariae)*, *V. ordalii*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* ve *V. salmonicida* gibi çeşitli türleri balık ölümlerine sebep olmaktadır (Ina-Salwany vd., 2019). Sistemik hemorajik septisemi ile karakterize olan Vibriosis, ciltte koyulaşma, kornea kalınlaşması, anemik solungaçlar ve yüzgeçlerin tabanında eritem oluşumuna sebebiyet vermektedir (Colorni ve Padrós, 2011). Vibrionlar, geniş doku hasarından sorumlu olan çeşitli proteazlar, hemolizinler ve diğer hücre dışı enzimler üretebilmektedir (Hjeltnes, 1993).

Bazı Vibrio türlerine karşı aşı olarak kullanılmak üzere öldürülmüş veya zayıflatılmış bakteri süspansiyonları (bakterinler) günümüzde kullanılmaktadır (Hettiarachchi vd., 2005). Özellikle farklı *V. anguillarum* serotiplerine karşı banyo aşılarının ve destekleyici olarak uygulanan oral aşılardan kabul edilebilir bir koruma seviyesi sağladığı literatürde yer almaktadır (Colorni ve Padrós, 2011). Fakat uygulanan bu yöntemlerin maliyeti göz önünde bulundurulduğunda tıbbi aromatik bitkilerin kullanılmasıyla bir çok patojenin sebep olduğu hastalıklara karşı koruyucu etkinin sağlanması bitkisel immünoestimulanları daha cazip hale getirmektedir (Bilen vd., 2019c; Terzi vd., 2021). Bu doğrultuda ısırgan otu etanolik özütünün yeme ilavesi ile çipura balıklarında *Vibrio (Listonella) anguillarum* bakterisine karşı koruyucu etkisi bu çalışma kapsamında ele alınmış ve değerlendirilmiştir.

2.2 Balıklarda Büyüme ile Beslenmenin İlişkisi

Balıklar; solunum, sindirim, boşaltım, üreme, dolaşım gibi öncelikli yaşamsal faaliyetlerini gerçekleştirebilmek için kullandıkları enerjinin kalanını doku kazanımı yani büyüme için kullanırlar. Bu prensibe dayanarak vücut ağırlığının artışıyla enerji yeterliliği bir sinonim olarak kullanılmaktadır (Korkut vd., 2007). Balıkların sağlık ve gelişimi açısından gerek duydukları bu enerjinin yetiştiricilik alanında sağlanmasında

besleme stratejileri oldukça önemlidir. Özellikle balıkların endüstriyel yemlerden ne derece yararlandığını büyüme ve beslenme arasındaki ilişkinin gözetilerek takip edilmesi ve geliştirilmesi kaçınılmazdır. Bu amaçla bazı hesaplamalar mevcut olup bunlardan canlı ağırlık artışı (CAA), spesifik büyüme oranı (SBO) ve yemin dönüşüm oranı (YDO) parametreleri, bu çalışmada çipura balıklarının büyüme performansını takip etmek için kullanılmıştır. Yemin yapısı ve rasyonları balıkların en iyi büyüme performanslarının sağlanması açısından çok önemli olmakla birlikte, yetiştiricilik faaliyetlerindeki en önemli sorunlardan birini de yem masrafları oluşturmaktadır (Karaman ve Yüngül, 2014). Bitkisel kaynakların balıklarda yem tüketimi, nütrient kullanımı ve büyüme performansına olan olumlu etkileri literatürde yer almaktadır (Bilen vd., 2019b; Francis vd., 2001; Lee vd., 2004; Yılmaz vd., 2006).

2.3 Balıklarda Hematolojik Analizler ve Önemi

Kan vücutta oksijeni, antikorları, besin maddelerini, vitaminleri, hormonları dokulara ulaştırmakta ayrıca oluşan karbondioksit ve atık maddelerin vücuttan uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Hematoloji; kanda meydana gelebilecek hastalıkları inceleyen bilim dalıdır (Moore, 2016). Bu çalışmada incelenen hematolojik indeksler: kırmızı kan hücreleri (RBC), hemoglobin değeri (Hb), hematokrit oranı (Hct), ortalama eritrosit hacmi (MCV), eritrosit başına düşen ortalama hemoglobin (MCH) ve eritrosit başına düşen ortalama hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) olup, balıklarda önemli olan bu parametrelerin (Çelik vd., 2006), sağlık durumu hakkında önemli bilgiler sağladığı bilinmektedir (Post, 1987; Roberts, 1978). Hematolojik parametreler, balıklardaki fizyolojik ve patolojik değişiklikleri takip edebilmek ve metabolik bozukluklar hakkında fikir edinebilmek için önemli indeksler olarak kullanılır (Ahmed vd., 2020). Ahmed vd. (2020)'ne göre; balıklarda hematolojik parametrelerin; yaş (Jamalzadeh ve Ghomi, 2009), cinsel olgunluk döngüsü (Vázquez ve Guerrero, 2007), beslenme durumu, tür farklılıkları (Lim ve Klesius, 2003) ve dış faktörlerle (sıcaklık, stres, mevsim, çözünmüş oksijen, su kalitesi, stoklama yoğunluğu, fotoperiyot, örnekleme koşulları, laboratuvar teknikleri) büyük değişkenlik gösterebilmektedir (Cnaani vd., 2004; Francesco Fazio vd., 2013; Ihut vd., 2018; Leonardi ve Klempau, 2003; Vázquez ve Guerrero, 2007; Witeska vd., 2015). Çeşitli dış faktörler göz önünde bulundurularak hematolojik parametrelerin

incelenmesinin, balıkların sağlık durumlarının değerlendirilmesinde önemli bir rehber olduğu ve sucul canlıların fizyolojik durumlarının güvenilir bir göstergesi olarak düşünüldüğü literatürde belirtilmiştir (Fazio, 2019).

2.3.1 Kırmızı Kan Hücreleri

Sarı-kırmızı rengi olan ve çekirdekli yapıya sahip olan kırmızı kan hücrelerinin (RBC), büyüklükleri (7-36 μ) ve miktarları (ergin bireylerin 1 mm³ kanında 20000-3000000 adet) balık türlerine göre değişkenlik gösterebilmektedir (Çelik vd., 2006). Yapılan çalışmalarda eritrosit sayılarının balığın biyolojik özelliklerine (Lusková, 1997) çevresel faktörlere (Øyvind Lie vd., 1989), hastalıklara (Blaxhall ve Daisley, 1973), örnekleme metoduna (Houston, 1997), strese, kirliliğe ve toksik maddelerin varlığına (Shakoori vd., 1991) göre değişkenlik gösterebileceği belirtilmiştir. Eritrositler çeşitli fonksiyonları ile birlikte, yapılarındaki hemoglobinle oksijenin taşınmasında görev alır (Moore, 2016). Ölçüm kolaylığı nedeniyle yaygın olarak kullanılan bir parametre olan hematokrit, eritrositlerin yüzde değerini ifade etmekte ve anemiyi kontrol için ideal bir kriter olarak bilinmektedir (Murray vd., 1993). Alibaşoğlu (1997), eritrosit sayısının düşük olmasını kansızlık (anemi) veya kan kaybını gösterdiğini; hemoglobin değerinin, anemi, polistemi (eritrosit sayısının normalden fazla olması) vb. durumların değerlendirilmesinde kullanıldığını ve kandaki total hücre hacminin tüm kana oranı olan hematokrit düzeylerinin ise kan kaybında azaldığı; su kaybında arttığını belirtmişlerdir.

2.3.2 Hemoglobin Seviyesi

Hemoglobin oksijeni dokulara taşımakla görevli bir solunum pigmentidir (Berkarda ve Eyüboğlu, 1983). Bu nedenden kanın oksijen taşıma kapasitesi, hemoglobinin miktarına, o da eritrositlerin sayısına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Anemi veya absorpsiyonun bozulması durumunda primer yanıt olarak; kirleticilere ve tahriş edici maddelere karşı ise sekonder yanıt olarak hemoglobin seviyesinde azalmalar meydana gelebilmektedir (Mayer, 1998; Vosylienė, 1999). Eritrosit sayısını etkileyen tüm faktörler kaçınılmaz olarak hemoglobin seviyesini de aynı şekilde etkilemektedir.

2.3.3 Hematokrit Seviyesi

Hematokrit, büyük bir kısmını eritrositlerin oluşturduğu şekilli kan elemanlarının plazmaya olan oranı olarak belirtilmektedir (Başusta, 2005). Ölçümünün kolay olması nedeniyle yaygın olarak kullanılan hematokrit düzeyinin (Hct), anemi ve zayıf beslenme durumlarında seviyesinde azalma; stres ve dehidrasyon durumunda ise artma meydana gelmektedir (Mayer, 1998; Vosylienė, 1999).

2.3.4 Ortalama Eritrosit Hacmi

Ortalama eritrosit hacmi (MCV), kalp hareketleri ve kan akışının önemli bir belirteci olup, osmoregülasyon durumunun tespitinde de kullanılır (Heath, 2018). MCV miktarı farklı tipteki anemi durumlarına bağlı olarak artma veya azalma gösterebilmektedir (Mayer, 1998).

2.3.5 Eritrosit Başına Düşen Ortalama Hemoglobin

Eritrosit başına düşen ortalama hemoglobin (MCH), bir kan örneğindeki kırmızı kan hücresi başına ortalama hemoglobin kütesidir. Solunum fonksiyonunun önemli bir göstergesi olarak kabul edilir (Kocabatmaz ve Ekingen, 1977). Toplam hemoglobin kütesinin, kırmızı kan hücrelerinin sayısına bölünmesiyle hesaplanır. Demir, hemoglobinin bir komponenti olarak kırmızı kan hücresinin kütesini doğrudan etkilemektedir. Hemoglobin sentezinin azalması veya demir eksikliği anemisi durumlarında kırmızı kan hücreleri normalden daha küçük hale gelerek MCH değerini düşürür.

2.3.6 Eritrosit Başına Düşen Ortalama Hemoglobin Konsantrasyonu

Eritrosit Başına Düşen Ortalama Hemoglobin Konsantrasyonu (MCHC) değerlerinde, farklı tip anemia durumlarında artma ve azalma görülebilir (Mayer, 1998). Tek bir kırmızı kan hücresi içindeki ortalama hemoglobin konsantrasyonunun bir ölçüsüdür. Balıklarda ortalama MCHC değeri $23,540 \pm 4,093$ g/dL olarak hesaplanmıştır (Çelik vd., 2006).

2.4 Başışıklık Sisteminde Görev Alan Organlar

Balıklarda kemik iliği ve lenf yumruları olmadığı için kan hücrelerinin yapımında bu görevi farklı organlar üstlenmişlerdir. Balıklarda dalağın stromasında ve ön böbrek ile arka böbrek oluklarında, ayrıca lenfoid organ olan timüs bezinde ve az miktarda karaciğerin periportal bölgesinde hematopoetik dokular bulunmaktadır (Karaman ve Dörücü, 2017). Balıklarda lenfomyeloid doku adı verilen dokularda eritrosit ve lenfoid hücrelerin üretimi gerçekleşmektedir (Hansen ve Zapata, 1998). Balıkların temel lenfoid sistemlerine bakıldığında primer lenfoid organlar; timüs, böbrek, dalak iken, sekonder lenfoid organlar; karaciğer, deri ve bağırsaklardır (Ocak, 2006).

2.4.1 Timus

Başışıklık sisteminin önemli bir organı olan timus kendi kendini sınırlayabilen T-hücrelerinin gelişiminin ana bölgesi olan birincil bir lenfoid organ olup (Manley, 2000), balıklarda timus ile diğer organlar arasında bağlantı kuran tek sistemi ise kan damarları oluşturmaktadır (Karaman ve Dörücü, 2017). Timusun kıkırdağa yakın yerde gelişmesi ve hipofiz hormonlarına yanıt vermesinden dolayı, bu özelliklerin her ikisi de timus gelişiminde önemli sayılabilmektedir (Hirokawa vd., 1998). Timus, genellikle, solungaç kemerlerinin tabanında yer alan keselerde, gastro-intestinal sistemin lamina propriasında gelişir ve sonra ontogeni sırasında alttaki mezenşime göç eder (Bowden vd., 2005). Temel hücre popülasyonunu lenfositlerin oluşturduğu timusun balığın savunma mekanizmasında direkt olarak görev aldığı, aktif bağışıklanma sonrasında plazma ve plak hücrelerinin oluşmasından anlaşılabilir (Enane vd., 1993; Pastoret vd., 1998).

2.4.2 Böbrekler

Balıklarda böbrekler; anatomik olarak vücut boşluğunun dorsalinde yer alan, ince uzun, kahverengi veya koyu kırmızı renkte olan baştan kuyruğa kadar uzanan bir organdır (Timur, 2008). Baş böbrekte hematopoetik doku vardır ve bu doku yüksek omurgalıların kemik iliği ile yapısal benzerliğinden dolayı teleost kemik iliği eşdeğeri olarak kabul edilir (Zapata ve Amemiya, 2000). Hem anterior hem de posterior kısmının hematopoetik özelliğe sahip olması sayesinde temel kan yapıcı organ olarak

işlev göstermektedir. Böbreğin anterior (ön) kısmı lenfoid dokudan oluşmakta olup posterior (arka) kısmı ise nefron denilen üniteler ile nefronların arasındaki lenfoid dokulardan oluşmaktadır (Karaman ve Dörücü, 2017). Ayrıca birkaç çalışmada, baş böbreğinin antijen tutulumu gösterdiği de rapor edilmiştir (Press ve Evensen, 1999). Bu sebepten sistemik enfeksiyonlara neden patojenleri baş böbrekten izole etmek balık patolojik prosedürlerinde olağan görülmektedir (Björge ve Koppang, 2022). Hatta bunun yanında histolojik olarak bakıldığında böbrek dokusundaki çoğu MHC-II hücreleri, makrofajlar gibi görünmektedir. Organın yapısında baskın olarak özellikle melanomakrofajlar ile birlikte lenfositler ve plazma hücreleri de mevcuttur (Karaman ve Dörücü, 2017). İkincil lenfoid organların normal özelliğinde olduğu gibi, baş böbrekteki bağışıklık genlerinin, çeşitli antijen uyarılarının ardından eksprese olduğu belirtilmiş ve bu özelliklerin tümü göz önünde bulundurulduğunda baş böbreğin hem birincil hem de ikincil lenfoid organ olarak işlevselliğini ortaya koymuştur (Björge ve Koppang, 2022).

2.4.3 Dalak

Koyu kırmızı-siyah renge sahip bir organ olan dalak, ilkel primer lenfoid organ olarak kabul edilir. Hemen hemen tüm gnathostomata sınıfına ait bireyler, adaptif immün yanıtın üretildiği bu organa sahiptir (Flajnik, 1998). Ayrıca yardımcı hematopoetik bir organ olarak işlev gösteren dalak, kan filtrasyonu ve hücre yıkımında yapıldığı bunun yanında eritrositlerin stoklandığı bir organdır (Karaman ve Dörücü, 2017). Dalakta bulunan retiküler fibril ağları, makrofajların bir araya toplandığı hemosiderin adı verilen melanomakrofaj odakları ile donanmıştır (Fänge ve Nilsson, 1985). Dalağın, özellikle antijenleri immün kompleksler halinde uzun süre saklayabilmeleri yüksek omurgalılarıdaki germinal merkezlere benzerlik göstermelerini sağlamaktadır (Pastoret vd., 1998).

2.4.4 Karaciğer

Balıklarda, sekonder lenfoid organ olan karaciğerin immün sistemde fazla rolü bulunmasa da retiküloendotelyal sistem (RES) içinde yabancı partikülleri yakalayıcı bir görevi vardır. Karaciğer makrofajları (Kuppfer hücreleri) bazı balık türlerinde

tespit edilmiş olup kemikli balıklarda fagositoz özellik gösterdiği bilinmektedir (Boshra vd., 2006).

2.4.5 Bağırsak

Gastrointestinal kanal, düşük pH, tripsin ve pepsin gibi sindirici enzimleri sayesinde ve safranın etkisi ile mikroplara karşı bariyer görevi sağlamaktadır. Balıklarda, makromoleküllerin emildiği ana bölge olan bağırsağın posterior kısmı antijenlerin sindirilmeden dolaşım sistemine ve hemopoiyetik organlara transferinin sağlaması özelliği ile immunolojik yönden ayrıca önem taşımaktadır (Fänge, 1986; Flajnik, 1998). Sekonder lenfoid organ olarak kabul edilen bağırsağın, arka bölümünde balıkların mukozal immun sistemlerinde rol oynadığı bilinmektedir (Chantanachookhin vd., 1991).

2.5 Balıklarda Bağışıklık Sistemi

Bağışıklık sistemi, çok çeşitli bireysel sistemlerin karmaşık bir savunma mekanizması oluşturması nedeniyle alt bölümlere ayrılmakta olup; spesifik olmayan/spesifik bağışıklık veya doğuştan gelen/adaptif bağışıklık ve hatta mukozal/sistemik bağışıklık olacak şekilde anılsa da, en çok kabul göreni doğal/kazanılmış bağışıklık sınıflandırması olmuştur (Bowden, 2008). Omurgalı canlıların bağışıklık sistemleri anatomik ve fonksiyonel olarak benzerlikler taşımakta, fakat kemik iliği ve lenf düğümlerinin bulunmaması, bunların yerine böbreklerin büyük bir lenfoid organ olarak görev yapması ile balıkların bağışıklık sistemleri kendi bünyesinde önemli farklılıklar barındırmaktadır (Press ve Evensen, 1999). Balıklarda patojenlere karşı öncelikle doğal bağışıklık sistemi harekete geçmektedir, eğer daha önce savunma sisteminin karşılaştığı bir patojen olduğu B ve T hücre reseptörleri tarafından algılanırsa kazanılmış bağışıklık sistemi devreye girmektedir (Toledo-Ibarra vd., 2013).

2.5.1 Balıklarda Spesifik Olmayan Bağışıklık Sistemi

Bazı önemli farklılıklar olsa da, balıkların bağışıklık sistemi yüksek omurgalılarınkine çok benzemektedir. Balıklar embriyogenezin erken aşamalarından başlayarak, uzun

bir süre boyunca hayatta kalmak için doğuştan gelen bağışıklık sistemlerini ön planda tutmaktadırlar (Rombout vd., 2005). Enfeksiyon başlangıcından sonra hızlı bir şekilde uyarılan doğal bağışıklığın, immunolojik belleğinin olmamasından dolayı antijene spesifik bir uyarı sistemi bulunmamakta, genler ile kodlanmış moleküller tarafından modüle edilmektedir (Durmaz, 2016). Balıklarda doğal bariyerler olan deri, mukus, solungaçlar ve bağırsak florası mikroorganizmaların vücuda girmesini önleyen ilk savunma hattını oluşturmaktadır (Yılmaz, 2017). Bu hattı geçen mikroorganizmalara hücrel mekanizmalar ve sıvısal faktörler müdahale etmektedir (Candan ve Karataş, 2010). Öyle ki doğal bağışıklık sistemini fiziksel, hücrel ve humoral (sıvısal) olacak şekilde 3 gruba ayırmak mümkündür. Mikroorganizma vücuda girdiğinde başlayan inflamasyon (yangı) ile birlikte; fagositoz, pinositoz, makrofaj ve nötrofil aktiviteleri, kemotaksi, ekstraselüler öldürücü etkiye sahip hücrel mekanizmalar müdahale etmekte olup, sıvısal faktör olarak; lizozim, kompleman, C-reatif protein, transferrin, lektinler, interferrin, seruloplazmin ve doğal aglutinler devreye girmektedir.

2.5.1.1 Spesifik olmayan bağışıklığın hücrel yanıtları

Patojenik organizmalara veya istilacılara karşı konak savunmasının ilk katmanı olan doğuştan gelen bağışıklık; kazanılmış bağışıklık sistemi savunma işini devralmaya hazır olana kadar spesifik olmayan bir şekilde yanıt oluşturmakla sorumludur (Holland ve Lambris, 2002). Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, istilacıları genel bir şekilde tanımlayarak tepki vermesinden dolayı, konağı adaptif bağışıklığın sağladığı korumadan daha zayıf ve kısa süre savunur (Alberts vd., 2002). Fakat doğuştan gelen bağışıklık tepkisi, adaptif bağışıklık tepkisinde gecikmeye yol açan sınırlı bir antikor repertuarı ve yavaş lenfosit proliferasyonu nedeniyle enfeksiyonla mücadelede ilk devreye giren önemli bir başlangıç bileşenidir (Magnadóttir, 1998). Bu nedenle, doğuştan gelen bağışıklık tepkisi, adaptif bağışıklık sistemine yanıt oluşturması için zaman kazandıran bir alarm görevi görmektedir (Fearon ve Locksley, 1996). Lökosit hücre tipleri (monosit, granülosit ve doğal sitotoksik hücreler) hücrel bağışıklık sistemini oluşturmaktadır (Secombes, 1996). Makrofaj, eozinofil ve nötrofilik granülositler gibi doğal bağışıklık sistemine ait hücrel bileşenlerden oluşan myeloid hücreler, mikroorganizmaların sindirimini fagositoz yoluyla gerçekleştirir (Gorczyński ve Stanley, 1999), diğer omurgalılarda olduğu gibi patojen tanıma

reseptörleri ile uyarılmaktadır (Secombes ve Wang, 2012). Doğal öldürücü hücreler (NK), dendritik hücreler, monositler, granülositler (mast hücreleri, eozinofiller ve nötrofiller) gibi lökositler; kemikli balıklarda ön böbrek ve timusta üretilir; proliferasyon, hayatta kalma, farklılaşma, olgunlaşma ve biyolojik fonksiyonlar ise hücre reseptörleri üzerindeki sitokinlerin etkisi ile düzenlenir (Chettri vd., 2011). Monositler, doku ve organlara yerleştiklerinde makrofajlara dönüşen büyük mononükleer dolaşımdaki lökositlerdir. Makrofajlar, fagositozu gerçekleştiren ana bağışıklık hücrelerinden biridir, diğerinin nötrofilik granülositler olduğu düşünülmektedir (Dalmo ve Børgwald, 2022). İyi bir fagosit hücre olan makrofajlar, MHC-II 'deki T hücrelerine antijen sunarak profesyonel APC'ler olarak da işlev gösterebildiği tespit edilmiştir (Sugamata vd., 2009; Wittamer vd., 2011).

2.5.1.2 Fagositoz

Parçacıklı yapıdaki maddenin hücre tarafından yutulması ve sindirimi olarak tanımlanan fagositoz, hemen hemen tüm hayvan filumlarında meydana gelen en yaygın savunma reaksiyonudur (MacArthur ve Fletcher, 1985). Fagositik hücre grupları mononükleer ve polimorf nükleer olmak üzere iki gruba ayrılmakta olup (Studnicka ve Kazun, 1993), fagositozu özellikle aktif olarak gerçekleştiren hücreler eozinofiller, nötrofiller ve makrofajlar olarak belirtilmiştir (Gorczyński ve Stanley, 1999). Doğal immünitinin bütün mekanizmaları, patojen mikroorganizmaları tanıyarak tepki verseler de, enfeksiyona yol açmayan yabancı maddelere karşı tepki vermemektedir (Arda vd., 2005). Makrofajlar sadece vücuda giren mikroorganizmaları değil, hasarlı veya ölü hücreleri fagosite edebilme özelliğine sahip olmasıyla nötrofillerden ayrılrsa da (Arda, 1985), mikroorganizmaları öldürme güçleri nötrofillere nazaran daha azdır (Diker, 2005). Fagositoz dört temel aşamaya ayrılarak incelenebilmekte olup, bunlar; kemotaksis (yönelme), bağlanma, yutma, öldürüp sindirmedi. Mikroorganizmalar nötrofiller tarafından hücre içine alındıktan sonra, respiratorik yıkım ve lizozomal enzim sindirimi mekanizmalarıyla elimine olmaktadır (Diker, 2005).

2.5.1.3 Oksidatif metabolizma ve süperoksit radikal üretimi

Opsonizasyon sonucu yabancı partikül Fc reseptörü ile membrana bağlanarak NADPH-oksidadz membran enzimini aktive etmektedir. Bu enzim NADPH 'ye etki ederek tek bir elektron ayırmakta ve ortamda bulunan oksijen molekülüne bağlanarak süperoksit anyonu oluşmaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD) enziminin de etkisiyle ortamdaki suyla reaksiyona giren süperoksit anyonları ise hidrojen peroksit oluşturmakta, myeloperoksidadz (MPO) enzimi de oluşan bu molekülü Cl⁻ iyonları ile reaksiyona sokarak hipoklorit iyonlarını meydana getirmektedir (Diker, 2005). Bu reaksiyonlar zinciri oksidatif metabolizmayı oluşturmakta olup, ortaya çıkan hidrojen peroksit ve hipoklorit bakterileri parçalamaktadır. Hipoklorit özellikle oksidatif metabolizmanın önemli bir ürünü olup lizozomal (LYZ) enzimlerin etkisini de arttırmaktadır (Diker, 2005).

2.5.1.4 Lizozomal enzimler

Lökosit kökenli mukolitik bir enzim olan lizozimler, antiviral, antibakteriyel ve antiinflamatuvar özelliklere sahiptir (Saurabh ve Sahoo, 2008). Balıklardaki enfeksiyonlarla mücadelede memeli lizoziminden daha geniş bir aktiviteye sahiptir (Demers ve Bayne, 1997). Lizozomal enzimler, sıklıkla spesifik olmayan immün fonksiyonların bir göstergesi olarak kullanılmakta ve ağırlıklı olarak makrofajlar tarafından üretilmektedir (Cross vd., 1988). Lizozimler, patojenik mikrobiyal enfeksiyonlara karşı spesifik olmayan bir biyolojik savunma faktörü olarak balıklarda önemli rol oynar (Hikima vd., 2003; Hoffmann vd., 1999; Song vd., 2021). Lizozim esas olarak lökositlerce zengin olan baş böbreğinde, bunu azalan sırayla sindirim sistemi, dalak, deri mukusu, serum, solungaçlar, karaciğer ve kasın takip ettiği bildirilmektedir (Ø Lie vd., 1989).

Lizozimlerin, nispeten dar antibakteriyel spektruma sahip olmalarından dolayı, etkinliği bir dereceye kadar sınırlanmakta, gram-negatif bakterilerin lizozime dirençli lipopolisakarit yapıdaki dış zarından dolayı bu bakteri grubuna karşı zayıf bakteriyostatik etkiler göstermektedir (Wu vd., 2019). Lizozomal enzimler, gram-pozitif bakterilerin hücre duvarlarında peptidoglikan tabakalar arasında bulunan, N-

asetilmuramik asit ve N-asetilglukozamin β (1 \rightarrow 4) bağlantılarını ayırarak etkinlik gösterir. Lizozimler gram-negatif bakterilere karşı etkinliğini, ancak bakterilerin dış hücre duvarının kompleman ve diğer enzimler aracılığıyla elimine olmasından sonra, iç peptidoglikan tabakasının açığa çıkmasıyla gösterebilmektedir (Saurabh ve Sahoo, 2008). Ayrıca, antibakteriyel bir işlevin yanı sıra, doğrudan polimorfonükleer lökositleri ve makrofajları aktive ederek veya dolaylı olarak bir opsonik etkiyle fagositozu teşvik etmektedir (Saurabh ve Sahoo, 2008).

2.5.2 Balıklarda Adaptif Bağışıklık

Antijene özgü spesifik lenfositlerin uyarılmasıyla aktive olan adaptif bağışıklık sisteminin iki karakterize özelliği vardır: spesifik antijen tanıma ve immünolojik hafıza gelişimi (Gourley vd., 2004). Humoral (hücresele olmayan) ve hücresele olmak üzere değerlendirilen bu sistemde, antikor moleküllü immunoglobulinler (Ig) ile ilişkili olan savunma sistemi humoral; T lenfositlerin uyarılması ile gelişen efektör hücrelerin oluşturduğu sistem ise hücresele savunma hattını oluşturmaktadır (Candan ve Karataş, 2010; Diker, 2005). Toplu olarak B ve T hücreleri, enfeksiyon ve hastalıkları özgüllükle saptayan ve bunlarla savaşan adaptif bağışıklık sistemini oluşturmaktadır (Abós vd., 2022). T hücreleri, B hücrelerinin (yardımcı T hücreleri, Th hücreleri) aktivasyonunu ve farklılaşmasını teşvik etmek için yardımcı uyarıcı sinyaller sağlar veya hücrelerin (sitotoksik T hücreleri, Tc hücreleri) içinde lokalize olan patojenlerin yok edilmesini amaçlayan hücresele bağışıklık tepkilerine aracılık eder (Abós vd., 2022).

2.5.3 Araştırmada Çalışılan Sitokinler

Sitokinler hem bağışıklık sistemi, hem de bağışıklık sistemi dışındaki hücreler tarafından bir uyarıcıya cevap olarak sentezlenen moleküllerdir (Lydyard vd., 2013). Bağışıklık yanıtların düzenlenmesi ve hücreler arası iletişimin sağlanmasında ana rol üstlenen sitokinler; glikoproteinlerden oluşmakta olup, canlılarda büyüme, farklılaşma (Th hücrelerinin dönüşümü) ve diğer hücreleri aktive etme açısından da birçok görev üstlenmektedir (Kilercioglu, 2021; Reyes-Cerpa vd., 2012). Sitokinler, özelleşmiş hücre yüzey reseptörleri ile etkileşime girerek patojenlere karşı fagositlerin harekete

geçmesini sağlayan uyarıları başlatırlar (Scapigliati vd., 2006; Wang ve Secombes, 2013). Proenflamatuvar sitokinler, savunma sistemindeki enflamasyonu desteklemekle görevli iken, antienflamatuvar sitokinler hücrelerin enflamasyondan zarar görmesini engellemekle görevlidirler (Verburg-Van Kemenade vd., 2009; Zhang ve An, 2007).

Makrofajlar ve lenfositler tarafından üretilip, lenfositler arasında iletişim molekülleri olarak görev yapan sitokinler ise interlökin (IL) olarak adlandırılmaktadır. IL-1, IL-6, IL-8 ve IL-12, TNF- α ile birlikte enflamasyona aracılık eden önemli medyatörler olarak görev yapmakta olup, pro-yangısal olan sitokin bir grubuna dahildir.

Bu çalışmada IL-1 ailesinden; IL-1 β , IL-18; Tip 1 Sitokin ailesinden IL-6; Tip 2 sarmal sitokinlerden IL-10; TNF ailesinden TNF- α sitokinlerinin ekspresyon düzeyleri çipura balıklarında tespit edilmiştir.

2.5.3.1 İnterlökin-1 β (IL-1 β)

Salınım mekanizması tam olarak anlaşılmamış olsa da, enfeksiyon ya da yaralanma durumlarında konağın doğal bağışıklık hücreleri tarafından üretilen, güçlü proenflamatuvar bir sitokin olan IL-1 β ; interlökin 1 ailesinin en iyi tanımlanan ve üzerinde en çok çalışılan üyesidir. IL-1 β , monositler ve aktif hale gelmiş makrofajlar gibi hücreler tarafından üretilmekte olup, neredeyse tüm hücreleri etkilemektedirler (Lopez-Castejon ve Brough, 2011). IL-1 β 'nın salgın yolu ile ilgili farklı mekanizmalar öne sürülmüş olup bunlar; (I) lizozomların ekzositozu, (II) plazma zarı mikrotanecikleri aracılığı, (III) eksozom ekzositozu ve (IV) plazma zarının özel taşıyıcılar aracılığıyla dışa aktarımı şeklindedir (Eder, 2009).

2.5.3.2 İnterlökin-18 (IL-18)

İnterlökin ailesinin diğer bir üyesi olan IL-18, tıpkı IL-1 β gibi öncül olarak üretilir ve hücre içerisinde depolanır (Kilercioğlu, 2021). IL-18 gen ifade (gen ekspresyonu) artışı; dendritik hücreler, keratinositler, makrofajlar ve osteoblast hücrelerini de içeren oldukça farklı hücre tiplerinde gerçekleşebilmektedir (Kono vd., 2013). IL-18'in balıklardaki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, proenflamatuvar görev

üstlendiği bildirilmiştir (Pérez-Cordón vd., 2014). Alabalıkta yapılan bir çalışmada, IL-18 gen ekspresyonunun beyin, solungaç, bağırsak, kalp, böbrek, karaciğer, dalak, kas ve deri gibi organ ve dokularda temel düzeyde gözlemlendiği ancak dalak ve böbrekte yüksek seviyelere gen ifadesi olduğu rapor edilmiştir (Plouffe vd., 2005).

2.5.3.3 İnterlökin-6 (IL-6)

İnterlökin-6 (IL-6), doğal ve kazanılmış bağışıklık tepkilerine aracılık etmedeki önemli rolü nedeniyle en pleiotropik (bir genin birden fazla fenotipik özelliği etkilemesi) ve önemli sitokinlerden biridir (Akira vd., 1990; Naka vd., 2002). IL-6'nın hematopoietik sistemin yanı sıra bağışıklık sisteminin ana düzenleyicisi olarak işlev gördüğü ve ayrıca akut faz yanıtının düzenleyicisi olduğu da belirtilmiştir (Ganter vd., 1989; Perlmutter vd., 1986). IL-6, akut faz proteinlerini indükleyerek inflamatuvar hücreleri aktive eder ve bu sayede inflamatuvar yanıtta önemli bir rol oynamaktadır (Dong, 2008; Park vd., 2004)

Balıkta IL-6'nın biyoaktivitesi ilk olarak *E. coli*'de üretilen bir rekombinant protein kullanılarak gökkuşağı alabalığında rapor edilmiştir (Costa vd., 2011). Enflamasyon bölgelerindeki monositler ve makrofajlar, IL-6'nın birincil kaynağı olmakla birlikte, IL-6 üretimi birçok hücre tipinde tespit edilebilmektedir (Costa vd., 2011).

2.5.3.4 İnterlökin-10 (IL-10)

Memelilerde IL-10, bağışıklık yanıtları düzenleyen ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini sınırlayan, önemli bir antiinflamatuvar sitokin olarak kabul edilmektedir (Moore vd., 2001; Ouyang vd., 2011). Balıklarda ise IL-10, antiinflamatuvar özelliklere sahip en önemli sitokinlerden biri olup, patojenlere karşı bağışıklık tepkilerinin negatif düzenleyicisi olarak kilit roller oynamaktadır (Wen vd., 2020). IL-10 eksikliği, bağırsak mikroorganizmalarına karşı aşırı bağışıklık tepkinin oluşmasına neden olmakta, inflamatuvar barsak hastalığına yol açabildiği gibi mikrobiyal tehdide karşı aşırı inflamatuvar tepkilere sebebiyet verebilmektedir (Saraiva ve O'garra, 2010; Sellon vd., 1998). Enflamatuvar tepkileri sınırlandırma ve nihayetinde sonlandırmadaki temel işlevleri göz önüne alındığında, IL-10 ekspresyonunun oldukça dinamik olduğu ve sıkı bir şekilde düzenlendiği konusunda genel bir fikir birliği olduğunu bildirmiştir (Wen

vd., 2020). IL-10; makrofajlar, monositler, dendritik hücreler, mast hücreleri, eozinofiller, nötrofiller, doğal öldürücü hücreler ve lenfositler dahil olmak üzere çeşitli hücrelerde yaygın olarak eksprese edilmekte ve ekspresyonu, çeşitli hücre tiplerinde farklı mekanizmalar tarafından düzenlenmektedir (Moore vd., 2001; Ouyang vd., 2011).

2.5.3.5 Tümör nekroz faktör- α (TNF- α)

Tümör nekroz faktör ailesinin üyeleri hücre çoğalması, apoptoz, enfeksiyon ve bağışıklık sisteminin uyarılması gibi farklı görevleri üstlenmekte olup; TNF- α , iltihaplı dokularda apoptoz sinyalleme antagonizması yoluyla makrofaj yoğunluğunun devamını sağlayabilen bir sitokindir (Hong vd., 2013). TNF- α , özellikle bakteriyel patojenlere karşı erken enflamasyon sürecinde kritik rol oynamakta, fagositlerin uyarılması yoluyla fagositoza aracılık edebilmektedir (Castro ve Tafalla, 2015; Kinoshita vd., 2014). Ayrıca TNF- α 'nın lökositlerin enfekte bölgelere toplanmasında rol oynadığı ve antiviral genlerin ekspresyonlarını stimüle ettiği belirtilmiştir (Roca vd., 2008). TNF- α 'nın makrofaj aktivasyon faktörü ile etkileşime girerek, makrofajlardaki solunum patlaması olayını olumlu yönde etkilediği (Buchmann, 1999), yoğun oksijen tüketimine bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin salınmasıyla sonuçlanan oksijen patlaması olayının gerçekleşmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (Jang vd., 1995; Kilercioğlu, 2021; Tung vd., 2009).

2.6 Tıbbi Bitkiler Hakkında Genel Bilgiler

Tıbbi bitkiler; tedavi edici özelliklere sahip olan, insan veya hayvan vücudu üzerinde faydalı farmakolojik etki gösteren bitkiler olarak tanımlanmaktadır (Namdeo, 2018). Günümüzde; ilaç, tarım, gıda, kozmetik, boya, tekstil, gibi bir çok alanda kullanılan tıbbi ve aromatik bitkilerin; yaprak, çiçek, tohum, gövde yumrusu ve kabuk gibi kısımları farklı amaçlarla ve farklı yöntemlerle kullanılmaktadır (Hakverdi ve Yiğit, 2017). Bitkilerin sentezlemiş olduğu kinin, tanin, berberin, alkaloid, flavonoid, terpenoid ve emetin gibi kimyasallar enfeksiyona bağlı hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Hussain, 2011). Bitkilerin tedavi edici etkilerinin içerdiği çok sayıda bileşiminin sinerjik etkisinden de kaynaklanabileceğini, bu

sebepten tek bir antibiyotikle öldürülmesi zor olan mikroorganizmaların dirençliliğine karşı bitkisel bileşimlerin daha etkin bir tedavi seçeneği sunabildiği yapılan bazı çalışmalar sonucunda rapor edilmiştir (Nazri vd., 2011; Shanthi Sree vd., 2010). Özellikle hastalıklara karşı bitkisel içerikli tedavinin sentetik ilaçlara oranla daha uygun maliyetli olması ve düşük yan etki insidansı göz önünde bulundurulduğunda fitoterapi' nin gelişmesindeki önem vurgulanmıştır (Göktaş ve Gıdık, 2019). Toprak ve su kaynaklarının ciddi bir bozulma tehlikesi ile karşı karşıya kalınabileceği öngörülen önümüzdeki yıllarda; tıbbi aromatik bitkilerin, sürdürülebilirlik için tercih edilen ürünler olacağı, biyomolekül içeriklerinin iyileştirilmesi ve izolasyonuna duyulan ihtiyacın daha da artacağına kesin gözüyle bakılmaktadır (Namdeo, 2018).

2.6.1 Tıbbi Bitkilerin Deniz Balıklarında Kullanımın Etkileri

Tıbbi bitkilerin tüm dünyada ziraat, gıda, sağlık veya kozmetik sektörlerinde yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. Su ürünleri sektöründe ise, balıkların büyüme ve üreme performansını arttırmada (Balcı ve Aktop, 2019), bağışıklık sistemini güçlendirmede, hastalıkların tedavisinde (Bilen ve Elbeshti, 2019a; Yılmaz vd., 2011) ayrıca anestezi madde olarak (Metin vd., 2018) kullanımlarının mevcut olduğu ve araştırmaların giderek yaygınlaştığı bildirilmiştir (Çelik, 2020). Tıbbi bitkisel takviyelerin; yeme ilave edilmesiyle (spreyleme yöntemiyle veya toz halinde) sağlanabildiği gibi (Bilen vd., 2011), enjeksiyon yoluyla (Uluköy vd., 2018) veya banyolama yöntemiyle de (Fu vd., 2007) kullanımları mümkündür. Tıbbi bitkilerin flavonoidleri, alkaloidleri, terpenoidleri, pigmentleri, steroidleri, fenolik içerikleri ve uçucu yağları balıklarda özellikle bağışıklık takviyesi amacıyla tercih edilmektedir (Yiğitarıslan vd., 2011).

2.6.2 Tıbbi Bitkilerin Etki Mekanizmaları

Mwitari vd. (2013), Morsalkım (*Withania somnifera*), yeşil kalpli ağaç (*Warbugia ugandensis*), Afrika eriği (*Prunus africana*) ve boldo (*Plectranthus barbatus*) özütlerinin etki mekanizmalarını araştırdıkları çalışmalarında; bitki özütlerinin büyük ölçüde sitotoksiste, gen susturma ve immüno-potansiyel etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Çoğunlukla yaprak ve köklerden elde edilen bu bileşiklerin aktiviteleri

hakkında çok sayıda çalışma yayınlanmış olup, bu çalışmalar söz konusu komponentlerin; antibiyotik, anti-inflamatuar, sitotoksik, anti-tümör ve kolesterol düşürücü etkileri olduğunu göstermişlerdir (Mishra vd., 2000; Welman, 2011). (Mwitari vd., 2013) çalışmalarında öğüttükleri bitkileri, heksan, diklorometan, etil asetat ve metanol kısmı verecek şekilde sıralı ekstraksiyonlara tabi tutmuşlar, elde ettikleri farklı özütler göre *Staphylococcus aureus* (SA), metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve *Cryptococcus neoformans* 'a (CN) türü bakterilere karşı aktivitelerinde farklılıklar olduğunu ortaya koymuşlardır. Mwitari vd. (2013), özütlerin etki mekanizmalarını anlamak için, IEC-6 hücreleri ve RT-PCR tekniği ile in-vitro olarak IL-7 (interlökin 7) sitokininin seviyesini değerlendirdikleri çalışmalarında; Afrika eriği (*Prunus africana*) özütünün, IL-7 ekspresyonunu tamamen durdurabildiğini bu sebepten çalışma mekanizmasının belirli genleri susturarak olabileceğini de öne sürmüşlerdir. Davis ve Kuttan (2002) ise, morsalkım bitki özütünün sitotoksik T lenfositlerinin oluşumu üzerinde hem in vitro hem de in vivo uyarıcı etkilere sahip olduğunu ve tümör büyümesini azaltma potansiyeli olduğunu belirtmişlerdir. Şifalı bitkilerin bakterisidal etkisiyle; bağırsak bakteri florası üzerinde doğrudan etki gösterebildiği gibi; dolaylı olarak, bağışıklık organlarını daha fazla CD4⁺ ve CD8⁺ lenfosit üretmesi ve salması için uyaran IL-7'nin regülasyonunu sağlayarak ta bağışıklık seviyesini yükseltebildiği belirtilmiştir (Mwitari vd., 2013).

2.6.3 Tıbbi Bitkilerin Balıkların Büyüme Performansına Etkisi

Şifalı bitkilerin beslenmeyi uyarıcı ve büyüme destekleyici olarak kullanılabileceğini kanıtlayan birçok çalışma mevcut olup, bu desteğin, sindirim enzimlerinin güçlendirilmesiyle başladığını ve ardından balıkların büyüme hızını arttırdığı şeklinde ifade edilmiştir (Awad vd., 2012; Reverter vd., 2014; Van Hai, 2015). Dikel (2015), balık beslemede kullanılan tıbbi aromatik bitkilerin, sindirim enzimlerinin salınımını olumlu etkilemesinin yanında, balıklarda yem alımını arttırdığını ve dolayısıyla büyüme performansının artmasına destek sağladığını belirtmiştir. Öyle ki; Van Hai (2015), *Cissus quadrangularis*, *Eclipta alba* ve *Alteranthera sessilis* gibi tıbbi aromatik bitkilerin balıklarda sindirim enzimi salgısını arttırdığını, böylece büyümenin desteklenmesinde ve hayatta kalma oranının artmasında fayda sağladığını belirtmiştir. Benzer şekilde, Awad ve Awaad (2017)'a göre tanen gibi polifenoller açısından zengin

olan Katuk (*Sauropus androgynus*) özütünün orfoz (*Epinephelus coioides*) diyetine %5'e kadar ilavesinin, iştahı uyardığı ve büyüme oranını önemli ölçüde arttırdığı belirtilmiştir (Santoso vd., 2013). Khalafalla (2009), mercanköşk (*Origanum majorana*) yaprağı, papatya çiçeği (*Matricaria sp.*), rezene (*Foeniculum vulgare*) tohumu ve kimyon (*Cuminum cyminum*) tohumu küspesinin %1 oranında yem katkı maddesi olarak 12 hafta boyunca verilmesinin, Nil tilapiyasında (*Oreochromis niloticus*) büyüme oranını önemli ölçüde desteklediğini belirtmiştir. Ayrıca kurutulmuş soğan (*Allium cepa*) ve sarımsak (*Allium sativum*) tozunun, 30 g/kg oranında yeme ilave edilerek 8 hafta boyunca levrek balıklarına (*Dicentrarchus labrax*) verilmesi sonucunda, büyüme hızında ve yemden yararlanma değerlerinde önemli gelişmelerin sağladığı belirtilmiştir (Saleh vd., 2015). Yazdi vd. (2019) balık besleme deneylerinde kullandıkları zerdeçalın (*Curcuma longa*) içeriğinde doğal olarak bulunan ve bir polifenolik bileşik olan kurkuminin, balıklarda bağırsak florasını güçlendirerek sindirimi arttırabildiği dolayısıyla buna bağlı olarak büyümeyi teşvik ettiğini belirtmişlerdir. Ayrıca fitokimyasalların ve metabolik bileşenlerinin balıkların büyüme performanslarına etkisini gen ekspresyonlarına odaklanarak açıklayan çalışmalarda mevcuttur (Aanyu vd., 2018; Ahmadifar vd., 2019; Midhun vd., 2016; Safari vd., 2020). Ahmadifar vd. (2021)'ne göre; Midhun vd. (2016) tilapia (*Oreochromis mossambicus*) balıklarında gıda takviyesi olarak yeme ilave ettikleri %0,5 ve %1 kurkumin in beyinde GH; kaslarda ise IGF-1 ve IGF-2 gen ekspresyon düzeylerini önemli ölçüde arttırdığını belirtmişlerdir ($p<0,05$). Ahmadifar vd. (2021), söz konusu genlerin, miyostatin ile birlikte balık miyogenezinde yer aldığını ve balık kas büyümesini kontrol ettiğini vurgulamışlardır. Bu durumu destekleyici olarak (Shalaby vd., 2006), sarımsak (*Allium sativum*) ham özütlerinin Nil tilapiyasında (*Oreochromis niloticus*) CAA, SBO ve yem tüketimini arttırdığını belirtmişlerdir ($p<0,05$). Abidin vd. (2022) çalışmalarında yem katkı maddesi olarak denedikleri neem ağacının (*Azadirachta indica*) %7 oranında yaprak özütünün gökkuşağı alabalıklarında en yüksek CAA ve en düşük YDO değeri ile kontrol grubuna ve diğer deneme gruplarından önemli ölçüde avantajlı sonuçlar verdiğini belirtmişlerdir ($p<0,05$). Dezfoulnejad ve Taravat (2022), biberiye yaprağı özütü içeren diyetle beslenen adi sazanlarda (*Cyprinus carpio*) kontrol grubuna göre doza bağlı olarak nihai ağırlığın, CAA, SBO ve YDO değerlerinin önemli derecede iyileştiğini belirtmişlerdir ($p<0,05$). Fakat bu durumun tersine Yılmaz vd. (2019), çalışmalarında

farklı miktarlarda biberiye özü içeren diyetlerle besledikleri nil tilapyasının (*Oreochromis niloticus*) büyüme performansında dikkate değer bir değişiklik tespit etmemiştir ($p>0,05$).

Awad vd. (2015b), çipura balıklarında besin takviyesi olarak denedikleri, çemen otu (*Trigonella foenum graecum*) tohumunu un haline getirerek %0 (kontrol), %1, %5 ve %10 oranlarında yeme ilave etmişler, sonuç olarak deney gruplarının tümünün, kontrol grubuna göre son ağırlık, ağırlık artışı, spesifik büyüme oranı ve uzunluk değerlerinde önemli artışların olduğunu belirtmişlerdir ($p<0,05$). Awad vd. (2015b), söz konusu artışın denedikleri doza bağlı olarak doğru orantılı olduğunu da vurgulamışlardır. (Bilen vd., 2020b), 500 ve 1000 mg kg⁻¹ oranlarında ebegümeçi (*Malva sylvestris*) sulu metanolik özütünün yeme ilavesi sonucunda çipura ve levrek balıklarının final ağırlığında, yem tüketiminde ve ağırlık artışında kontrol grubuna göre önemli gelişmelerin sağladığını belirtmişlerdir.

2.6.4 Tıbbi Bitkilerin Balık Hematolojisine Etkisi

Hematolojik parametreler, fizyolojik ve patolojik değişiklikleri analiz etmek için kullanılan önemli bir araç olup (Gabriel vd., 2011), balıklar ile ilgili araştırmalarda kullanımı 1943'den itibaren görülebilmektedir (Field vd., 1943). Kırmızı kan hücreleri (RBC), beyaz kan hücreleri (WBC), hematokrit (Hct), ortalama alyuvar hacmi (MCV), ortalama alyuvar hemoglobini (MCH), ortalama alyuvar hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) gibi değerler baz alınarak yapılan hematolojik analizler; beslenme, su kalitesi ve hastalıkla ilgili değişikliklere bağlı olarak balıkların sağlık durumu hakkında önemli bilgiler sağlayabilmektedir (Bilen vd., 2020b; Fazio, 2019; Yılmaz vd., 2011). Ayrıca söz konusu hematolojik parametreler balıklarda eritrosit durumu ve oksijen taşıma kapasitesi hakkında bilgi vermekte olup (Houston, 1997); davranış, habitat ve iklim gibi diğer faktörler tarafından da etkilenebildiği literatürde yer almaktadır (Tavares-Dias ve de Moraes, 2004). Örneğin, (F Fazio vd., 2013) Tiren Denizi'nde yaygın olarak bulunan dört teleost balık türünün (*Gobius niger*, *Mugil cephalus*, *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*) hematolojik profilini karşılaştırarak, bu türler arasındaki benzerlikleri ve farklılıkları araştırdıkları çalışmalarında; hematolojik değerlerin, balık türlerinin beslenme davranışlarına, yaşam tarzlarına ve yaşadıkları

habitata bağılı değişebileceğini belirtmişlerdir. Karimi vd. (2013) ise sarı yüzgeçli çipura (*Acanthopagrus latus*)'da yaptıkları hematolojik araştırmada erkeklerdeki RBC sayımlarının dişi balıklara göre daha yüksek olduğunu belirtmiş böylece cinsiyetin hematolojik değerler üzerinde etkisini ortaya koymuşlardır.

Eritrosit ve lökosit sayısını içeren söz konusu hematolojik analizler, balık sağlığının değerlendirilmesinde ve stres tepkilerinin anlaşılmasında değerli bilgiler sağlamaktadır (Fazio, 2019). Örneğin çemen otu takviyesi ile beslenen çipura balıklarının hematolojik parametrelerinden; WBC ve RBC sayılarında artış olduğu, bu artışın çemen otunun doğal antioksidan etkisinden kaynaklandığı karaciğerdeki antioksidan gen ekspresyonu seviyelerine bakılarak tespit edilmiştir (Kaviarasan vd., 2007). Daha önceki bazı çalışmalarda, bitkiler veya özlerinin (acı bakla (*Lupinus perennis*), mango (*Mangifera indica*) ve ısırgan otu (*Urtica dioica*)) gökkuşağı alabalıklarında gıda takviyesi olarak kullanımının hematolojik değerler üzerinde olumlu etkisi olduğu belirtilmiştir (Awad ve Austin, 2010).

Fazio (2019), Lizis gerçekteşmiş RBC'lerden ve çekirdekli trombositlerden elde edilen yalın çekirdeklerin, boyut olarak lenfositlere benzediği, bu durumun otomatik hücre sayacılarında lökosit sayısında yanlış bir artışa sebebiyet verdiğini belirtmişler; bu nedenle, manuel yöntemlere alternatif olarak hematolojik parametrelerin değerlendirilmesi için otomatik analiz yöntemlerinin yanında kullanılmasının önemini vurgulamışlardır.

2.6.5 Tıbbi Bitkilerin Balık İmmunolojisine Etkisi

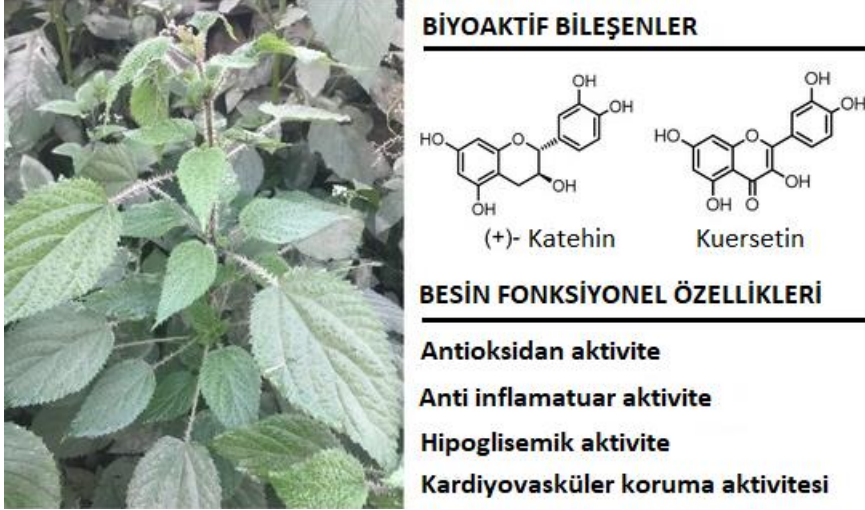
Bakteriler, virüsler ve parazitler dahil olmak üzere birçok patojen, balık türlerini enfekte edebildiğinden, su ürünleri endüstrisi için etkili ve güvenli tedavilerin kullanılması büyük önem taşımaktadır (Hoseinifar vd., 2020). Düşük yan etki insidansı ve avantajlı yönlerinin çok olmasıyla genellikle güvenli maddeler (GRAS) olarak kabul edilen bitkisel biyoaktif bileşenler, anti-bakteriyel, anti-viral ve anti-fungal fonksiyonlara sahip olabilir ve enfeksiyöz mikroorganizmalara karşı direnci artırabilir (Burdock ve Carabin, 2004; Citarasu, 2010). Bir immünostimulant, özellikle doğal immünite olmak üzere immün yanıtları yükselten bir bileşen veya etken olarak

düşünülebilmektedir (Anderson, 1992). Tıbbi bitkilerin, doğal bağışıklık sistemi ile edinilmiş bağışıklık sistemi üzerine çeşitli etki mekanizmalarının mevcut olduğu çalışmalar literatürde yer almaktadır (Burnet, 1941; Magnadóttir, 2006).

Antimikrobiyal polipeptitler, polisakkaritler, fenolik bileşikler, esansiyel yağlar ve saponinlerin düşük toksisite özelliğine sahip olup enfeksiyonları tedavi etmedeki başarısı bilinmektedir (Paray vd., 2020). Bu bileşiklerin, hastalıkları tedavi etmek için enzimlerin aktif bölgelerine, katalitik alanlarına ve aktif proteinlerine etki ederek modülatör gibi işlev gösterdiği belirtilmiştir (Wink, 2004). Örneğin, Nil tilapyalarda gıda takviyesi olarak denenmiş; adaçayı (*Salvia officinalis*) ve spirulina (*Arthrospira platensis*) karışımlarının lizozim, nitrik oksit ve immüoglobulin-M (IgM) seviyelerinde (Abdellatif vd., 2018); biberiye (*Salvia rosmarinus*) yaprağının ise katalaz, lizozim ve kompleman aktiviteleri üzerinde (Naiel vd., 2020) olumlu etkileri olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Dawood vd. (2020), mentol yağı takviyesi sonrasında teleost türlerinin solungaçlarında, karaciğerinde ve bağırsaklarında proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β ve IL-8) gen ekspresyonunda önemli bir azalmanın olduğunu, antioksidan enzimlerin (katalaz, süperoksit dismutaz) aktivitesinde ise artış meydana geldiğini belirtmişlerdir. Uçucu yağların proflaktik etkiye sahip olduğunu vurgulayan Salomón vd. (2020) ise, adaçayı ve limon otu (*Lippia citriodora*) yaprak özütlerinin; çipurada humoral bağışıklık ve inflamasyon ile ilgili genlerin ekspresyonunu, lökosit hücre reseptörlerini ve antioksidan enzimleri aktive ettiğini belirtmişlerdir. Narenciye ve limon otu yağlarında bulunan sitral bileşenin, monoterpenoid yapısından dolayı anti-enflamatuar ve antibakteriyel etkiye sahip olduğu (Ponce-Monter vd., 2010; Silva-Angulo vd., 2015) ayrıca lipoperoksidasyon ve antioksidan enzim seviyeleri dahil olmak üzere bağışıklıkla ilgili bazı göstergelerin uyarılmasında yararlı bir rol oynadığı literatürde yer almıştır (Mori vd., 2019). Polifenoller ise anti inflamatuvar (Fernandez vd., 1998), antimikrobiyal (Sova, 2012) ve antioksidan (Pontiki vd., 2014) etkiye sahip biyoaktif bileşikler olarak tanımlanmıştır. Örneğin trans-sinamik asitin IL-1 β , IL-8, dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β), tümör nekroz faktörü (TNF- α), IgM ve IgT gibi proinflamatuvar sitokin gen ekspresyonlarını aktive ederek bir immüno-uyarıcı etkisi olduğu yine literatürde yer almaktadır (Yılmaz ve Ergün, 2018).

2.6.6 Isırgan Otu (*Urtica dioica*) Hakkında Genel Bilgiler

Isırgan otu (*Urtica dioica*), Urticaceae familyasının *Urtica* cinsine ait çok yıllık bir bitki türüdür (Ahmed ve Parsuraman, 2014). Avrupa, Asya, Kuzey Afrika ve Kuzey Amerika'nın ılıman bölgelerinde 1.800 m yüksekliğe kadar bulunmaktadır (Grauso vd., 2020). Tarla, yol ve orman kıyılarında doğal olarak bulunan ısırgan otu kimyasal içerik yönünden oldukça zengin olup, yüzyıllardan bu yana; ilaç, gıda, lif, boya ve kozmetik alanında kullanılmaktadır. Isırgan otu ülkemizde özellikle Karadeniz Bölgesinde yoğun olarak yayılış göstermekte ve Haziran-Eylül ayları arasında yetişmektedir (Ayan vd., 2006). Sap ve yaprak altlarında yakıcı tüyler bulunan ısırgan otunun, toprak altı ve toprak üstü kısımlarındaki kimyasal özellikler birbirinden farklı olup, yapısında 20'ye yakın kimyasal madde bulundurmaktadır (Lektinler, aminler, yağ asitleri, steroller, poliholozitlerdir vb.) (Ayan vd., 2006). Zare vd. (2023), ısırgan otunun yaprak ve toprak üstü kısımlarında; oleik, linolenik, sitrik, palmitik, fumarik, formik, silisik, malik ve fosforik asit gibi kimyasalların bulunduğunu; ayrıca kemferol, β -sitosterol ve tanenler içermektedir. Bitkinin toprak altı kısmında ise, UDA (*Urtica Dioica* Aglutinin), glukozlar, β -sitosterol, palmitik, linoleik asitler, histamin, fenil propan ve triterpen türevleri bulunmaktadır (Said vd., 2015). Isırgan otu söz konusu kimyasal içeriğinden dolayı, tıpta, fitoterapik uygulamalarda ve kozmetik sektöründe olmak üzere geniş kullanım alanına sahiptir. Kolay bulunabilirliği ve düşük maliyeti sayesinde kullanım alanları giderek yaygınlaşmakta olan bu bitkinin, özüt olarak fitoterapik uygulamalarda ve yardımcı madde olarak ilaçlarda kullanımı söz konusudur. Isırgan otu; flavonoidler, triterpenoidler, steroller, uçucu yağlar, lignanlar, tanenler, alkaloidler ve fenolikler gibi fitokimyasallarıda içermektedir. Bu fitokimyasallar hiperlipideminin immün düzensizlik sonuçlarını iyileştirebildiği, lenfosit düzeylerini, fagositozu arttırarak, *A. hydrophila* enfeksiyonuna karşı savunmayı güçlendirdiği ve bunların yanında antioksidan, antiinflamatuvar ve antiviral bileşenler olarak da etki gösterebildiği bilinmektedir (Ahmadifar vd., 2021). Özellikle, ısırgan otu yaprağı etanolik ekstraktlarının anti-inflamatuvar etkisi olduğu, inflamatuvar sitokin salınımını düzenlediği de belirtilmiştir (Chrubasik vd., 2007). Ayrıca, beslenme açısından, ısırgan otu yapraklarının önemli miktarda esansiyel amino asitleri, esansiyel yağ asitlerini, vitamin ve mineralleri içerdiği bilinmektedir (Rutto vd., 2013).



Şekil 2.1 Isırgan otu biyoaktif bileşenler ve fonksiyonel özellikleri (Devkota vd., 2022)

2.6.7 Akçakesme (*Phillyrea latifolia*) Hakkında Genel Bilgiler

Zeytingiller familyasından olan ve *Phillyrea* cinsi üç türden (*P. media*, *P. angustifolia* ve *P. latifolia*) birisi olan akçakesme (*Phillyrea latifolia*) Akdeniz iklim kuşağında yaygın olup, kışın yaprak dökmeyen bir ağaççık türüdür.

Türkiye’de İstanbul, Balıkesir Aydın, Sakarya, Çanakkale, Isparta, Muğla, Sinop, Mersin, Tekirdağ, Zonguldak, Tokat, Trabzon yörelerinde yoğun olarak görülür (URL-3, 2023). Metanolik ekstraktlardan izole edilen flavonoidler, bir çeşit anti-inflamatuar aktiviteye sahip olup, önemli in vitro kompleman inhibe edici etki gösterir (Pieroni vd., 2000). Yapraklarının anti-inflamatuar etkisinin yanında (Pieroni vd., 2000), idrar söktürücü (Ballero ve Fresu, 1993), ateş düşürücü (Bellakhdar, 1997) ve mide ağrılarına karşı antispazmodik olarak (Merzouki vd., 1997) kullanım alanları mevcuttur. Zeytin yapraklarının biyoaktivitesi göz önüne alındığında, akçakesmenin yüksek miktarda Oleuropeosid içeriği bu türün farmakolojik değerini arttırmaktadır (Carretero vd., 2001).

Oleuropeosid, zeytin yapraklarındaki başlıca iridoit olup, hipertansif hastalığın tedavisindeki yararlı etkilerine ilişkin klinik verileri 1950'lerden beri mevcuttur (Hansen vd., 1996). Antimikrobiyal ve antienflamatuar özelliği olan oleuropeosidin güçlü bir antioksidan etkiyede sahip olduğu, süperoksit radikallerinin ve nötrofil

solunum patlaması inhibitörlerinin güçlü bir temizleyicisi olarak etki gösterdiği belirtilmiştir (Visioli vd., 1998).



Şekil 2.2 Akçakesme ağacı yaprak ve meyveleri (URL-4, 2023)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Deneme Alanı

Çipuraların beslemesi, örneklemeler ve analizler; Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi, Canlı Kaynaklar Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Her deneme için 100 L kapasiteli toplam 15 akvaryum kullanılmıştır. Sistem için gerekli deniz suyu, balıkların temin edildiği tesisin filtrasyon suyundan, laboratuvara düzenli olarak taşınarak sağlanmıştır. Her gün %20 kadar su değişiminin yapıldığı akvaryumların filtrasyonu iç filtrelerce sağlanmış, ayrıca gerekli bakteriyel kolonizasyonun oluşumu için her bir akvaryuma mercan kırıkları ve bioball kullanılarak substrat oluşturulmuştur. Fotoperiyot uygulaması için otomatik zamanlayıcılar kullanılmış, balıklara 12 saat aydınlık; 12 saat karanlık ortam oluşturulmuştur.



Şekil 3.1 Balıklarda besleme çalışmasının yapıldığı alan

3.2 Kullanılan Materyaller ve Denemelerin Dizayını

Deneyler, ÇOMÜ HADYEK'in 2021/02-04 karar numaralı etik izni ile başlatılmış ve gerçekleştirilmiştir. Çalışma için gereken çipura (*Sparus aurata*) balıkları, Çanakkale İda Gıda Su Ürünleri Üretim Ltd. Şti. tarafından sağlanmış ve canlı kaynaklar ünitesine üçer ay arayla (deneme 1 için 345 adet; deneme 2 için 345 adet), toplamda 690 adet olacak şekilde temini sağlanmıştır. Her deneme öncesinde laboratuvara yeni gelen balıkların 15'er gün süreyle ortama adaptasyonu sağlanmıştır. Birbirinden bağımsız olarak yürütülen her iki deneme için balıklar aynı tesisten temin edilmiş olup, birinci denemenin bitmesine takiben ikinci deneme başlatılmıştır. Bu şekilde toplam 15 akvaryum kullanılarak tez araştırması gerçekleştirilmiştir. Grup başına 3'er tekerrür olacak şekilde tasarlanan denemelerde, akvaryum başına 23 adet balık stoklanmış, her deneme için toplamda 345 adet balık kullanılmıştır. Deneylerde özütlerin ilave edilmesi için 0,8-1,2 mm boyutlarında ticari ekstruder yem olan Alltech Coppens® (%56 ham protein, %15 ham yağ, %0,2 ham selüloz, %13 ham kül, %1,89 fosfor, %3,1 kalsiyum, %0,9 sodyum) yemi kullanılmıştır (Tablo 3.1). Etanolik özütlerinin çıkarılması için kullanılan ısırgan otu ve akçakesme bitkileri ticari bir firmadan (Botanikmarket; Köprübaşı-Ordu) temin edilmiştir. Elde edilen özütlerin, 0 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg ve 400 mg/kg konsantrasyonlarında olacak şekilde saf su ile seyreltilerek yemlere ilavesi sağlanmıştır.

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan ticari yemin bileşimi

Temel besin değerleri	Değer
Ham protein	% 56,0
Ham yağ	% 15,0
Ham selüloz	% 0,20
Kül	% 13,0
Kalsiyum	% 3,1
Fosfor	% 1,89
Sodyum	% 0,90
Vitaminler ve mikroelementler	
Vitamin A	14000 IU/kg
Vitamin D ₃	1542 IU/kg
Manganez	26 mg/kg
Çinko	78 mg/kg
Demir	78 mg/kg
İodin	65 mg/kg
Bakır	65 mg/kg

3.2.1 Deneme 1

Bu denemede yem katkı maddesi olarak ısırgan otu (*Urtica dioica*) bitkisinin etanolik özütü kullanılmıştır. Özüt çıkarmak için kurutulup saplarından ayrılmış ısırgan otu yaprakları yüksek hızlı öğütücüde (Yazıcılar G1/5L®) un haline getirilmiştir (Şekil 3.2) ve %96 etanol (Isolab® extra pure) ile ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur.



Şekil 3.2 Yüksek hızlı değirmen yardımıyla ısırgan otu yapraklarının öğütülmesi.

Toz haline getirilmiş 40 g ısırgan otu, 10 katı miktarda %96'lık etanol (Teksol® Extra püre) içerisine alınmış ve sokslet ekstraktörü yardımıyla 7-8 defa üst taraftaki sıvının rengi açılncaya kadar döndürülmüştür. Elde edilen çözeltideki alkol, rotary evaporatör (Heidolph/4000®) yardımıyla uçurulmuş ve ardından kalan madde 40 ml etil alkol içerisinde çözündürülmüştür. Hazırlanan stok solüsyon 0,05 g/ml madde içermekte olup, yine etil alkol ile seyreltilerek spreyleme yöntemiyle (Bilen vd., 2011), 50; 100; 200 ve 400 mg/kg olacak şekilde yemlere aktarımı sağlanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Özütün spreyle yeme homojen şekilde aktarılması

Özütün; 0 mg/kg (kontrol), 50 mg/kg (I50), 100 mg/kg (I100), 200 mg/kg (I200) ve 400 mg/kg (I400) konsantrasyonlarında yeme ilavesinden sonra, yeme geçen alkolün uçurulması için yem kurutma dolaplarında 3 gün bekletilmiştir. Balıklar 60 gün boyunca hazırlanan yemlerle, sabah 9:00 akşam 17:00 da olacak şekilde günde 2 defa doyana kadar beslenmiştir. Denemenin 30. ve 60. günlerinde balıkların büyüme performansını değerlendirmek amacıyla canlı ağırlıkları kayıt altına alınmıştır. 60 günlük süre sonunda her akvaryumdan alınan üçer adet balık, 0,5 ml/L fenoksietanol içeren kaplara daldırarak bayıltılmış ardından kaudal venasından alınan kandan (Şekil 3.4), hematolojik parametreler (RBC, HGB, HCT, MCV, MCH ve MCHC), oksidatif radikal üretimi (ORÜ); plazmasından ise, lizozim ve myeloperoksidaz aktiviteleri tespit edilmiştir.



Şekil 3.4 Çipura kaudal venasından kan alımı

Kan alınan balıkların hızlı bir şekilde ötenazisi gerçekleştirilmiş olup, sonrasında dalak ve bağırsaklarından doku örneklemeleri yapılarak, bağışıklıktan sorumlu bazı genlerin (IL-1 β , IL-18, IL-6, IL-10 ve TNF- α), β -aktine göre ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Deneme sonunda kalan balıklara *Vibrio (Listonella) anguillarum*

(SY-L24, Fish pathogen/*Dicentrarchus labrax* KX388236) bakterisi intraperitoneal olarak enjekte edilmiş ve 10 gün süreyle yaşama oranları takibe alınmıştır.

3.2.2 Deneme 2

Bu denemede yem katkı maddesi olarak akçakesme (*Urtica dioica*) bitkisinin %96'lık etanolik özütü kullanılmıştır. Bir önceki deneme ile aynı şekilde; akçakesme bitkisinin kurutulmuş yaprakları (Şekil 3.5) öğütüldükten sonra sokslet cihazı yardımıyla özütü çıkarılmış ve 0 mg/kg (kontrol), 50 mg/kg (A50), 100 mg/kg (A100), 200 mg/kg (A200), 400 mg/kg (A400) konsantrasyonlarında yeme aktarımı sağlanmıştır. Grup başına 3'er tekrür olacak şekilde tasarlanan deneyde, akvaryum başına 23'er adet balık yerleştirilmiş ve toplamda 345 adet balık kullanılmıştır. 30. ve 60. günlerde hassas terazide canlı ağırlıkları kaydedilen balıkların, kan ve doku alma işlemleri "Deneme 1" ile aynı prosedürde olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.5 Akçakesme fideleri ve kurumuş yapraklarının öğütülmesi

Kandan RBC, HGB, HCT, MCV, MCH ve MCHC hematolojik parametreleri; plazmadan ise lizozim ve myeloperoksidaz gibi enzim aktiviteleri tespit edilmiştir. Deneme 1'de olduğu gibi dalak ve bağırsaktan alınan doku örneklerinde, bağışıklıktan sorumlu bazı genlerin (IL-1 β , IL-18, IL-6, IL-10 ve TNF- α), β -aktine göre ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.

3.3 Su Kalitesi Fizikokimyasal Analizleri

Denemede sıcaklık ve pH ölçümleri için HANNA® (HI 98107) cep tipi pH ölçer; tuzluluk için ATC® refraktometre; toplam çözünmüş madde ve iletkenlik için ise multifonksiyonel Tds/Ec ölçer kullanılmıştır. Parametrelerin günlük olarak takip edildiği deneme boyunca; nitrat, nitrit ve toplam amonyak Optizen® (POP UV/VIS) spektrofotometresi ile haftalık olarak ölçülmüştür.

3.4 Büyüme Performansı ve Yemden Yararlanmanın Hesaplanması

Çalışmada balıkların büyüme performansları hakkında bilgi edinerek, kullanılan bitkisel katkıların büyümeye ve yem tüketimine etkisinin anlaşılabilmesi için aşağıdaki formüllerden (Hoşsu vd., 2003) yararlanılmıştır.

Canlı Ağırlık Artışı (CAA)= [(Son Ağırlık_(g) - Başlangıç ağırlığı_(g)) / Başlangıç Ağırlığı_(g)] x 100

Spesifik Büyüme Oranı (SBO)= [(Ln Son ortalama ağırlık_(g) - Ln Başlangıçtaki ortalama ağırlık_(g)) / Deneme gün sayısı_(gün)] x 100

Yem Dönüşüm Oranı (YDO)= [Yem Tüketimi_(g) / Ağırlık Kazanımı_(g)] x 100

3.5 Balıklardan Kanın Örneklenmesi ve Analizleri

60. gün sonunda her akvaryumdan 3'er adet olacak şekilde (n=9 balık) tüm gruplardan kan örnekleme yapılmıştır. Tanklardan rastgele seçilen balıkların fenoksietanol (0,5 ml/L) ile bir kap içerisinde bayılması işlemi gerçekleştirilmiş (Tort vd., 2002), ardından hızlıca kan alımına geçilmiştir. Kan alınacak bölgeden mukozayı temizlemek için anüs yüzgecinin arkasından, kaudal yüzgece kadar olan kısım alkollü pamuk ile temizlenmiş ve 1 ml lik insülin şırıngası yardımıyla kaudal venadan kan alımı gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4). Alınan kan örnekleri K3EDTA ve jelli serum tüpleri içerisine pay edilmiş ve hematolojik, immünolojik analizleri yapılmıştır (Şekil 3.6). Serum analizlerine geçmeden önce kanın aktarıldığı jelli tüpler 5000g devirde 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir.



Şekil 3.6 K3EDTA ve jelli serum tüpleri içerisine pay edilmiş kan örnekleri

3.5.1 Hematolojik Analizler

Hematolojik analizler için Mindray/BC 3000® Plus marka otomatik kan sayım cihazı kullanılmıştır. Bu cihazın ölçüm değerleri; kırmızı kan hücreleri (RBC) için Thoma lamında, hemoglobin (Hb) analizi için cyanomethemoglobin metodu ile ve hematokrit (Hct) analizi için ise mikrohematokrit yöntemi ile (Blaxhall ve Daisley, 1973) önceden doğrulanmıştır (Yılmaz, 2017) (Şekil 3.7). Çıkan değerlerden aşağıdaki formüller kullanılarak eritrosit ideksleri (MCV, MCH ve MCHC) hesaplanmıştır (Lewis vd., 2006).



Şekil 3.7 Otomatik kan sayım cihazı

3.5.1.1 Eritrosit indeksleri

3.5.1.1.1 Ortalama eritrosit hacmi (MCV)

Kalp hareketleri ve kan akışının önemli belirteçlerinden biri olan MCV, osmoregülasyon durumunu belirlemede kullanılır (Heath, 1987). MCV'nin hesaplanmasında aşağıdaki formülden yararlanılmaktadır.

$$\text{MCV } (\mu\text{m}^3) = \text{Hct } (\%) \times 10 / \text{RBC } (10^6/\text{mm}^3)$$

Hct: Hematokrit, RBC: Kırmızı Kan Hücre Sayısı

3.5.1.1.2 Eritrosit başına düşen ortalama hemoglobin (MCH)

Solunum fonksiyonunun önemli bir belirteci olan MCH'in hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmaktadır.

$$\text{MCH } (\mu\text{g}/\text{hücre}) = [\text{Hb } (\text{g}/100\text{ml}) \times 10] / \text{RBC } (10^6/\text{mm}^3)$$

Hb: Hemoglobin

3.5.1.1.3 Eritrosit başına düşen ortalama hemoglobin konsantrasyonu (MCHC)

Mayer (1998)'e göre farklı tip anemiasinde artma veya azalma görülebilen eritrosit başına düşen ortalama hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) % değeri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{MCHC } (\text{g}^{-1}) = [\text{Hb } (\text{g dL}^{-1}) \times 100] / \text{Hct}$$

3.5.2 İmmunolojik Analizler

3.5.2.1 Solunum patlaması

Fagositlerin solunum patlaması aktivitesi Stasiak ve Baumann (1996), metodunda yapılan bazı değişiklikler ile tespit edilmiştir (Yılmaz, 2020). Analizde herbir balık

için 50'şer µL kan örnekleri poli-l-lizin içeren 96 plaka içerisine yerleştirilmiştir. Örneklerin bir saat süreyle inkübe edilmesinin ardından; üst faz atılıp HBSS ilave edilerek üç kez yıkama yapılmıştır. Sonrasında % 0,2 NBT kuyucuklara 100'er µL olacak şekilde ilave edilmiş ve bir saat daha beklemeye alınmıştır. Hücrelere metanol (%100) aracılığıyla 5 dakika boyunca fiksasyon işlemi uygulanmış ve 3'er kez %70'lik metanol ile yıkanmıştır. Kuruyan plakaların herbir kuyucuğuna; 60 µL potasyum hidroksit (2 Molar) ve 70 µL DMSO aktarılmıştır. Bu işlem basamaklarının ardından okumalar multiskan spektrofotometrede (Thermo Multiskan Go) 620 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

3.5.2.2 Lizozim aktivitesi

Lizozim aktivitesi değerlerinin tespit edilebilmesi için Nudo ve Catap (2011)'ın bildirdikleri metot kullanılmıştır. Liyofilize *Micrococcus luteus* 0,075 g tartılıp, 100 mL Na₂HPO₄ – 2H₂O ve sitrik asit kullanılarak hazırlanan tampon karışımı (pH 5,8) içerisinde çözülmüştür. Üç tekrarlı olacak şekilde 25 µL serum örneği 96 kuyucuklu plakalara yerleştirilmiş ve üzerine 175 µL *Micrococcus luteus* süspansiyonu ilave edilmiştir. Bu işlemlerin hemen ardından multiskan (Thermo® Multiskan Go) ile 450 nm de kinetik ölçüm süreci başlatılmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 Multiskan spektrofotometrede örneklerin okunması

3.5.2.3 Myeloperoksidaz aktivitesi

Myeloperoksidaz aktivitesi analizi Yılmaz (2020)'ın, literatürde bildirilen yöntemlerde bazı değişiklikler yaparak uyarladığı metoda göre gerçekleştirilmiştir (Kumari ve Sahoo, 2006; Quade ve Roth, 1997). Kısaca; 10'ar µl serum örneği 96'lık plaka kuyucuklarına dağıtılmış ve üzerlerine 90 µl HBSS ilave edilerek seyreltilmiştir. 1 adet 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride tablet, 2 µl %30'luk hidrojen peroksit ve saf su içeren seyreltilmiş çözeltiden her kuyucuk için 35'er µl alınmış ve örneklerle ilave edilmiştir. Multiskan ile ölçüme başlamadan önce 12 °C'de 2 dk inkübasyon sağlanmış ve süre bitiminde 35 µl sülfürik asit kuyucuklara ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Bu işlem basamaklarının bitiminde spektrofotometrik okuma gerçekleştirilmiştir (OD: 450 nm).

3.5.3 Sitokin Genlerin Ekspresyon Analizleri

3.5.3.1 RNA saflaştırması

Çipuralardan alınan dalak ve bağırsak örnekleri ependorf tüplere aktarılmış ve üzerine RNA later solüyonu (Thermo Fisher Scientific®; Invitrogen) ilave edilerek örneklemeler gerçekleştirilmiştir. RNA saflaştırması için dokulara, 500µL Trizol (RiboEx, GeneAll®) ilave edilerek homojenizatör yardımıyla (Isolab®; hafif yük homojenizatörü) parçalanmış ve süspansiyon haline getirilmiştir (Şekil 3.9). Elde edilen homojenata, 13000 rpm de santrifüj (cihaz model: Nüve 1200 R) işlemi uygulanmış, sonrasında oluşan süpernatantın üzerine 200 µL kloroform (Molecular Biology Reagent, Alfa Aesar®) eklenmiştir. Bu işlemin tekrarlanmasının ardından ayrı tüplere aktarılan süpernatant üzerine 500 µL isopropanol (2-Propanol, BioReagent for molecular biology Sigma®) ilave edilmiştir. Yavaşça karıştırılan süspansiyon; -30 °C'de 7 dk bekletildikten sonra, 13000 rpm de tekrar santrifüj edilmiş ve dibe çöken peletin %70 etil alkol ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Son santrifüjden sonra biyogüvenlik kabiniinde bekletilerek alkolün peletten uçması sağlanmış ve söz konusu pelete 20 µL NFW (nükleaz içermeyen saf su) eklenerek RNA'nın çözünmesi için buzun içerisinde bekletilmiştir. RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyon değerlerinin ölçülmesi için spektrofotometrede (Thermo Fisher Scientific®, Multiskan GO)

260/280 nm dalga boylarında absorbans değerleri tespit edilmiştir. Saflığı ve yoğunluğundan emin olunan RNA örneklerinin NFW ile 20 ng/μl olacak şekilde seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. Nihai olarak elde edilen RNA örneklerinin, cDNA sentezinin gerçekleştirileceği güne kadar -80 °C'de muhafazası sağlanmıştır.



Şekil 3.9 Dokuların homojenizasyonu

3.5.3.2 Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Elde edilen RNA 20 ng olacak şekilde seyreltikten sonra DNA sentez kiti kullanılarak (A.B.T.[™] cDNA Synthesis Kit with RNase Inh. High Capacity), cDNA (komplementer DNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Kit prosedürüne göre oluşturulan 20 μl ana karışım içerisinde; 10 μl RNA örneği, 2 μl heksamer (50 μM), 1 μl dNTP karışımı (her biri 2,5 mM), 2 μl 10X reaksiyon tamponu, 1 μl ters transkriptaz (200 U/μl), 0,5 μl RNase inhibitörü, 3,5 μl RNase içermeyen su bulunmaktadır. cDNA sentezi için hazırlanan karışım PCR cihazında her bir basamak 1 döngü olacak şekilde, 25°C'de 10 dakika; 37°C'de 120 dakika ve 85°C'de 5 dakika süreyle sırasıyla denatürasyon, bağlanma ve uzama adımları gerçekleştirilmiştir. Saflık ve konsantrasyon değerleri multiskan spektrofotometrisi ile 260/280 nm dalga boylarında tespit edilen cDNA örneklerinin konsantrasyonları, 20 ng/μl olacak şekilde NFW ile seyreltilmiştir.

3.5.3.3 RT-qPCR analizleri ve gen ekspresyonları

Araştırılan sitokin genlerin ekspresyon düzeylerinin tespit edilebilmesi için, RT-qPCR sistemi (Applied Biosystems® StepOnePlus) kullanılmıştır. Genlerin sentezi için hazırlanan her bir örnek tüpünde; 10 µl ROX içeren SYBR-Green (A.B.T.™ 2X qPCR Mastermix), 2 µl ileri ve geri primerler (10 µM), 2 µl template DNA ve 4 µl nükleaz içermeyen su bulunmaktadır. 96'lık plate içerisinde hazır bulunan örnekler, RT-qPCR cihazında denatürasyon, bağlanma ve uzatma olacak şekilde bir dizi reaksiyona tabi tutulmuştur (Şekil 3.10). Elde edilen sonuçlar $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerine göre bağıl gen seviyesi hesaplanarak karşılaştırılmıştır (Altunoglu vd., 2017).



Şekil 3.10 Örneklerin bir dizi protokolle RT-qPCR işlemine tabi tutulması

Çipura balıkları için çalışılmış olan sitokin genlerin forward (F) ve reverse (R) primerleri Tablo 3.2 'de listelenmiştir.

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan primerler

Gen	Primer (5'-3')	Referans
<i>β-Actin</i>	F5' TCTGTCTGGATCGGAGGCTC 3' R5' AAGCATTGCGGTGGACG 3'	Dominguez vd. (2021)
<i>IL-1β</i>	F5' AGCGACATGGCACGATTC 3' R5' GCACTCTCCTGGCACATATCC 3'	Montero vd. (2010)
<i>IL-6</i>	F5' TGCTTTCACCCCTACAGACG 3' R5' GCTTCAAACCTCCTGCCTGTGG 3'	^a Gen no: M_030412636.1
<i>IL-10</i>	F5' CAGTCTTTCCTCTGCACCGT 3' R5' CAGGCGAACGCTGTTTTGAA 3'	^a Gen no: M_030418889.1
<i>IL-18</i>	F5' GGAACACAGCCTGAATGCAA 3' R5' AGTCCGGTAGAACACAGCAC 3'	^a Gen no: JX976626.1
<i>TNF-α</i>	F: 5' CTCACACCTCTCAGCCACAG 3' R: 5' TTCCGTCTCCAGTTTGTCG 3'	Mathlouthi (2008)

^a Gen numaraları NCBI kodlarından oluşur.

3.5.4 Kontrol Testi

Deneme-1 sonunda balıklar, önceden hastalıklı deneklerden izole edilen; 1×10^7 (100µL) yoğunluğunda *Vibrio (Listonella) anguillarum*, bakterisi ile intraperitoneal enjeksiyon yoluyla enfekte edilmiştir. Enjeksiyon sonrasında, 10 gün süreyle her gün ölen balıklar not edilerek hayatta kalma oranları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Rairakhwada vd., 2007).

Yaşama oranı (%) = (Hayatta kalan balık sayısı/enfekte balık sayısı)*100

3.5.5 İstatistiksel Analizler

Tüm istatistiksel analizler SPSS 23.0 (IBMM® SPSS Statistics 19) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. %0,05 anlamlılık düzeyinde gerçekleştirilen tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile çalışmada veriler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesi amaçlanmış ve Duncan çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Deneme 1

4.1.1 Fiziksel ve Kimyasal Su Kalitesi Bulguları

Deneme boyunca, su sıcaklığı 16-20 °C, tuzluluk ‰35-36, oksijen 5,5-6,5 mg/l, pH 7,5-8,5, toplam amonyak 0,01- 0,05 mg/l, Nitrit 0,01-0,03 mg/l ve Nitrat 0,8-1,1 mg/l aralıklarında tespit edilmiştir.

4.1.2 Büyüme Performansı Bulguları

Isırgan otu katkılı yemlerle besleme denemesinde, balıkların başlangıç ve son ağırlık ortalamaları tespit edilmiş, ayrıca canlı ağırlık artışı (CAA), yem dönüşüm oranı (YDO) ve spesifik büyüme oranı (SBO) değerleri ile birlikte sonuçlar Tablo 4.1. ve Tablo 4.2’de verilmiştir. İstatistiksel olarak normal dağılım gösteren veriler, homojenliği sağlamadığı için Tamhane’s T2 testine tabi tutulmuştur. Sonuç olarak kontrol ve deney gruplarının 30 ve 60 günlük büyüme performanslarında gruplar arasında değişimin önemli olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$).

Tablo 4.1 30. gün sonunda ısırgan otunun, çipuraların büyüme performanslarına etkisi

	Deneme Grupları				
	Kontrol	I50	I100	I200	I400
Başlangıç Ağırlığı (g)	1,06±0,10	1,09±0,09	1,07±0,08	1,09±0,07	1,08±0,07
Son Ağırlık (g)	3,88±0,11	3,69±0,27	3,64±0,27	3,93±0,43	3,92±0,47
CAA(%)	265,33±2,42	239,87±4,18	241,26±6,54	260,06±12,44	262,93±4,24
YDO	1,37±0,01	1,37±0,01	1,35±0,02	1,33±0,01	1,35±0,02
SBO (% gün⁻¹)	4,32±0,02	4,08±0,04	4,09±0,06	4,26±0,12	4,30±0,04

n=9, ortalama±s. hata. Aynı periyotta farklı üstel harfler içeren gruplar arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0,05$). CAA: Canlı ağırlık artışı, YDO: Yem dönüşüm oranı, SBO: Spesifik büyüme oranı

Tablo 4.2 60. gün sonunda ısırğan otunun, çipuraların büyüme performanslarına etkisi

	Deneme Grupları				
	Kontrol	I50	I100	I200	I400
İlk Ağırlık (g)	1,06±0,10	1,09±0,09	1,07±0,08	1,09±0,07	1,08±0,07
Son Ağırlık (g)	8,97±0,87	8,63±0,90	9,31±0,83	9,06±0,87	8,14±0,91
CAA(%)	744,09±19,02	693,19±16,43	770,93±14,78	731,72±67,30	653,14±42,91
YDO	1,37±0,01	1,38±0,01	1,22±0,02	1,26±0,06	1,30±0,03
SBO (% gün ⁻¹)	3,33±0,03	3,15±0,03	3,30±0,03	3,21±0,13	3,05±0,09

n=9, ortalama±s. hata. Aynı periyotta farklı üstel harfler içeren gruplar arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir (p<0,05). CAA: Canlı ağırlık artışı, YDO: Yem dönüşüm oranı, SBO: Spesifik büyüme oranı

4.1.3 Hematolojik Bulgular

60. günde alabalıkların bazı kan parametrelerinde (RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC) meydana gelen değişimler Tablo 4.3 'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre gruplar arasında, incelenen hematolojik parametreler açısından önemli bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir (p>0,05).

Tablo 4.3 60. günde ısırğan otu denemesinin hematolojik değişimlere etkisi

	RBC (10 ⁶ /mm ³)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (µm ³)	MCH (pg)	MCHC (%)
Kontrol	2,90±0,11	6,94±0,33	28,29±1,34	97,62±1,82	23,93±0,28	24,54±0,46
I50	2,90±0,11	6,86±0,33	30,41±1,76	104,60±2,40	23,62±0,20	22,61±0,45
I100	2,64±0,13	6,05±0,16	25,12±0,51	95,95±5,51	23,00±0,54	24,12±0,90
I200	2,79±0,27	5,90±0,40	27,15±2,51	97,58±2,66	21,34±0,76	21,88±0,55
I400	2,86±0,08	6,68±0,17	27,07±1,95	94,37±4,50	23,37±0,34	24,91±1,12

n=9, ortalama±s. hata. Aynı periyotta farklı üstel harfler içeren gruplar arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir (p<0,05).

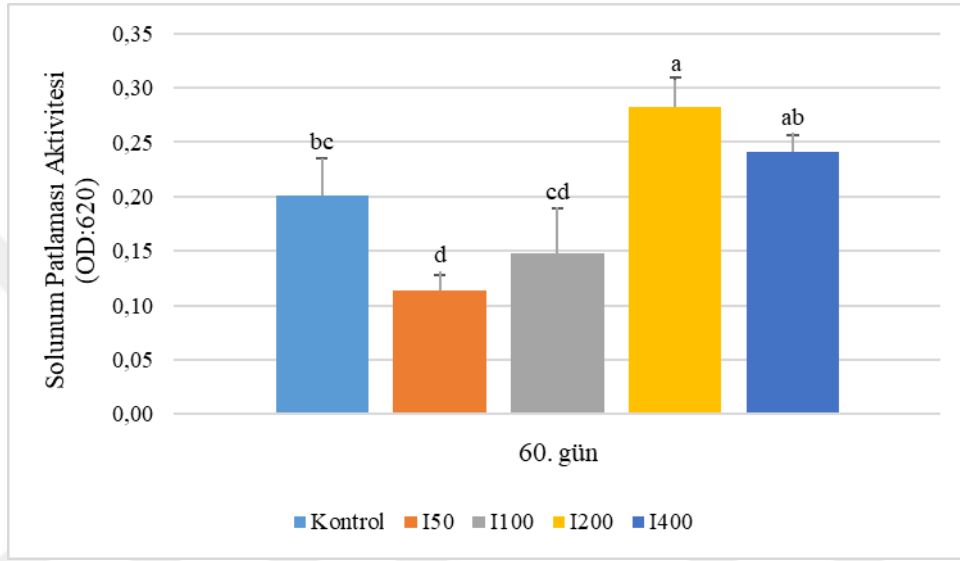
4.1.4 İmmunolojik Bulgular

60. günde alabalıkların humoral yanıtlarında meydana gelen değişimler (solunum patlaması, lizozim aktivitesi ve myeloperoksidaz aktivitesi) uygun istatistiksel analizlerle değerlendirilerek aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

4.1.4.1 Solunum patlaması

Nitroblue tetrazolyum (NBT) indirgenmesi yöntemi kullanılarak yapılan analizler neticesinde, ısırğan otunun çipura balıklarında solunum patlaması aktivitesine etkisi

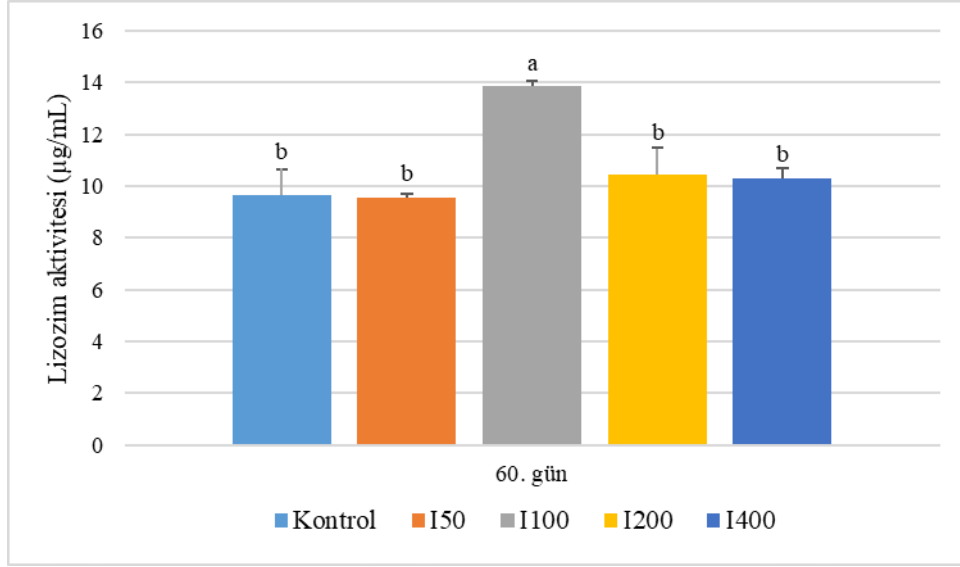
Şekil 4.1’de belirtildiği şekildedir (grafiklerde; n=9, ortalama ± standart hata, Farklı üstel harfler içeren gruplar arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir). Kontrol grubuna göre en yüksek aktivite değeri I200 grubunda iken, I50 grubunun NBT değerinde kontrol grubuna göre önemli bir düşüş olmuştur ($p<0,05$). Bu durum, 200 mg/kg dozunda ısırgan otunun fagositik aktiviteyi kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttırdığını göstermektedir ($p<0,05$).



Şekil 4.1 Isırgan otunun çipura balıklarında solumun patlaması aktivitesine etkisi

4.1.5 Lizozim Aktivitesi

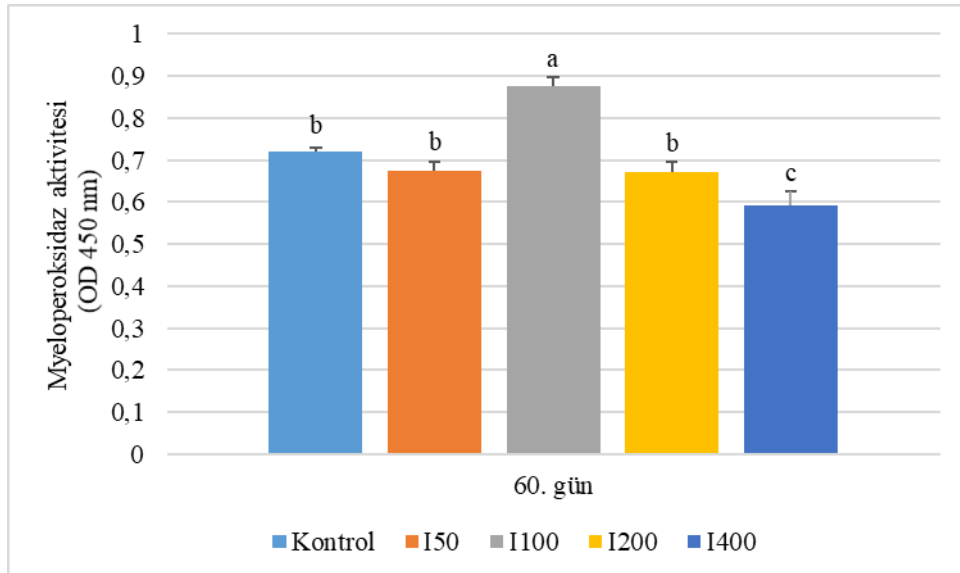
Gruplara göre lizozim aktivitelerinde meydana gelen değişimler Şekil 4.2’de belirtilmiştir. Bulgular, istatistiksel olarak normal dağılım göstermiş, fakat homojenliği sağlamadığı için Tamhane’s T2 testine tabi tutulmuştur. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda, I100 grubunun lizozim değerinin; diğer tüm gruplara göre artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,05$). I50 grubunun lizozim değeri ise kontrol grubuna göre azalma göstermiş, fakat bu fark istatistiksel önem teşkil etmemiştir ($p>0,05$).



Şekil 4.2 Isırgan otunun çipura balıklarında lizozim aktivitesine etkisi

4.1.6 Myeloperoksidaz Aktivitesi

Myeloperoksidaz aktivitesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.3'de belirtilmiştir. Buna göre I100 grubunun myeloperoksidaz aktivitesindeki artışın diğer gruplara göre önemli olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$); bununla birlikte I400 grubunda ise MPO değerinin kontrole göre düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$).



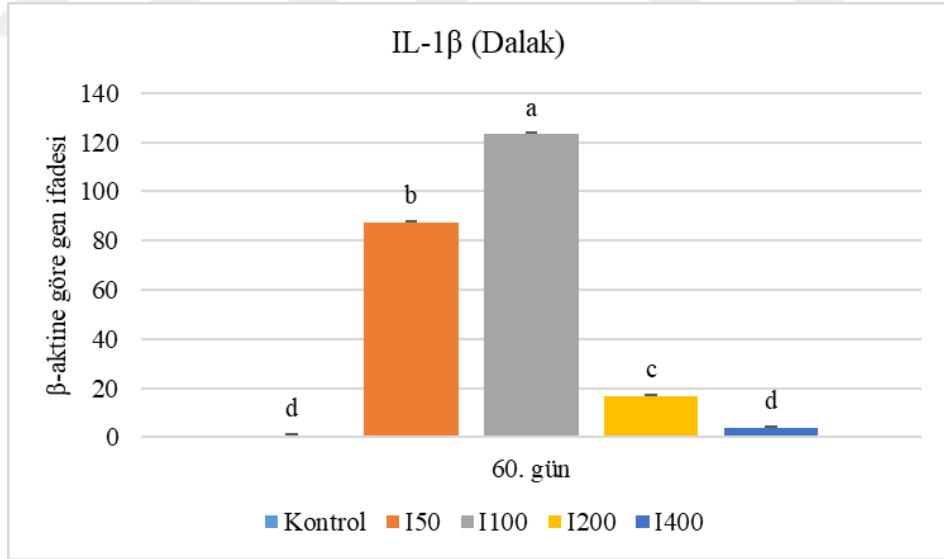
Şekil 4.3 Isırgan otunun çipura balıklarında myeloperoksidaz aktivitesine etkisi

4.1.7 Gen Ekspresyonu Seviyeleri

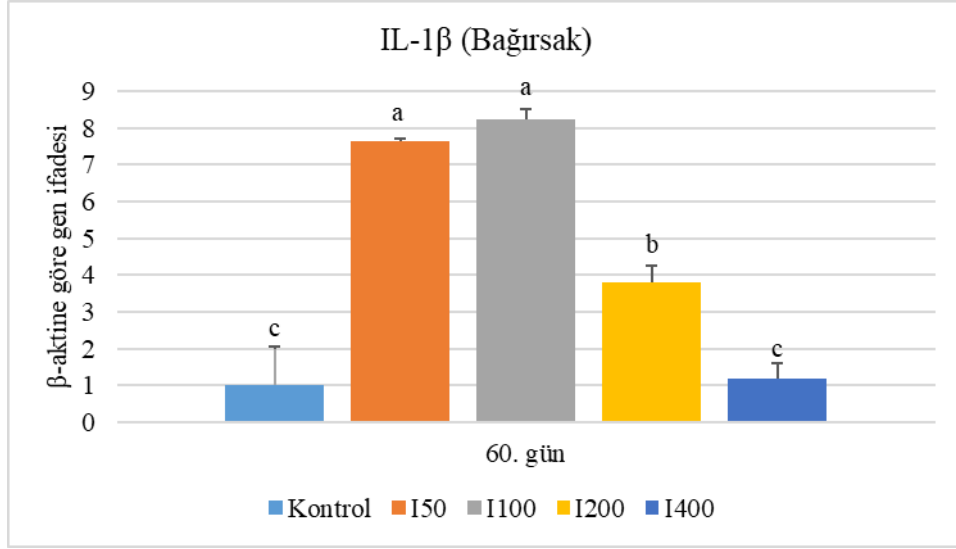
Çipura balıklarında farklı dozlarda yem katkı maddesi olarak denenilen ısırgan otunun, immunostimulant etkilerini değerlendirmek için bazı sitokin genlerin (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18 ve TNF- α) ifadeleri analiz edilmiş, ekspresyon seviyeleri gruplar arasında karşılaştırılmıştır.

4.1.7.1 IL-1 β

IL-1 β gen ifadesi, dalakta I100 grubunda (Şekil 4.4), bağırsakta ise I50 ve I100 gruplarında (Şekil 4.5) diğer gruplara göre en yüksek düzeye ulaşarak, farklılık göstermiştir ($p<0,05$). I200 grubunun dalakta ve bağırsaktaki IL-1 β ekspresyon seviyeleri, I50 ve I100 gruplarına göre düşük olsa da kontrole göre artış göstermiştir ($p<0,05$). Doz ile doğru orantılı olarak devam eden ekspresyon seviyelerindeki artış, 200 mg/kg doz birlikte düşüşe geçmiştir. I400 grubunda ise, gen ekspresyonu seviyesi kontrol grubuna benzer değer göstermiştir ($p>0,05$).



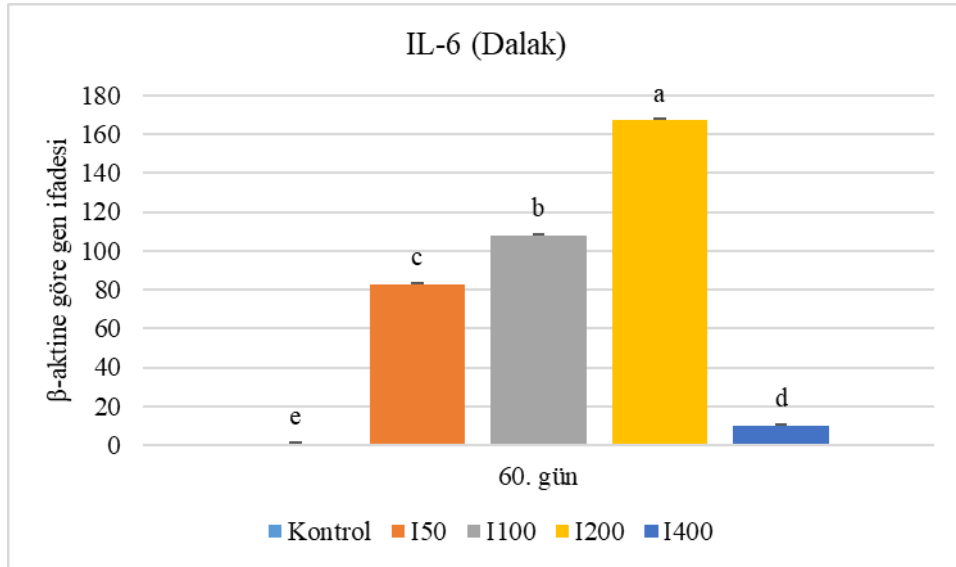
Şekil 4.4 ısırgan otunun çipura dalak dokusunda IL-1 β gen ifadesine etkisi



Şekil 4.5 Isırgan otunun çipura bağırsak dokusunda IL-1 β gen ifadesine etkisi

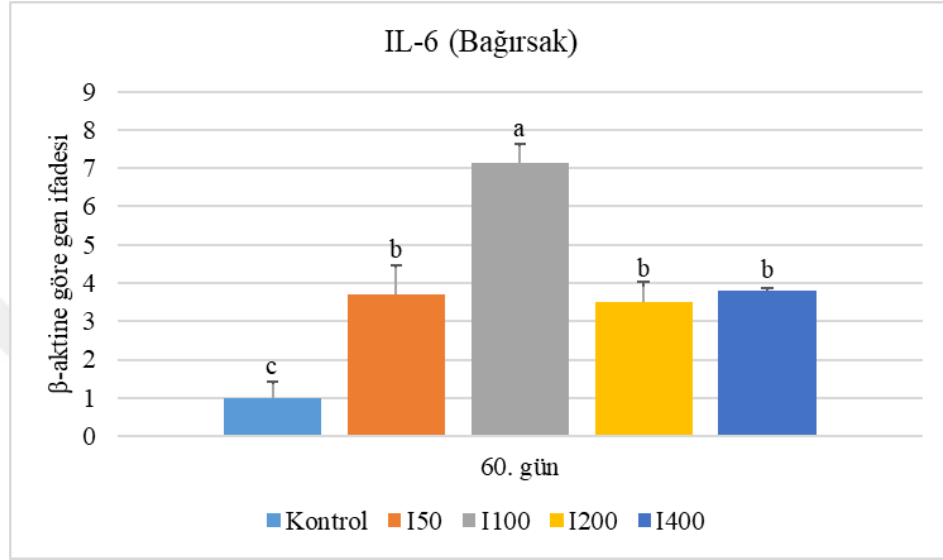
4.1.7.2 IL-6

IL-6 gen ekspresyon düzeylerinin dalakta I400 grubuna kadar, artan doza bağlı olarak artış gösterdiği ve I200 grubunda diğer gruplara göre en yüksek seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$). I400 grubu diğer deney gruplarına göre en düşük gen ifadesine sahip olsa da kontrol grubuna göre ekspresyon düzeylerinde önemli bir artış söz konusu olmuştur ($p < 0,05$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Isırgan otunun çipura dalak dokusunda IL-6 gen ifadesine etkisi

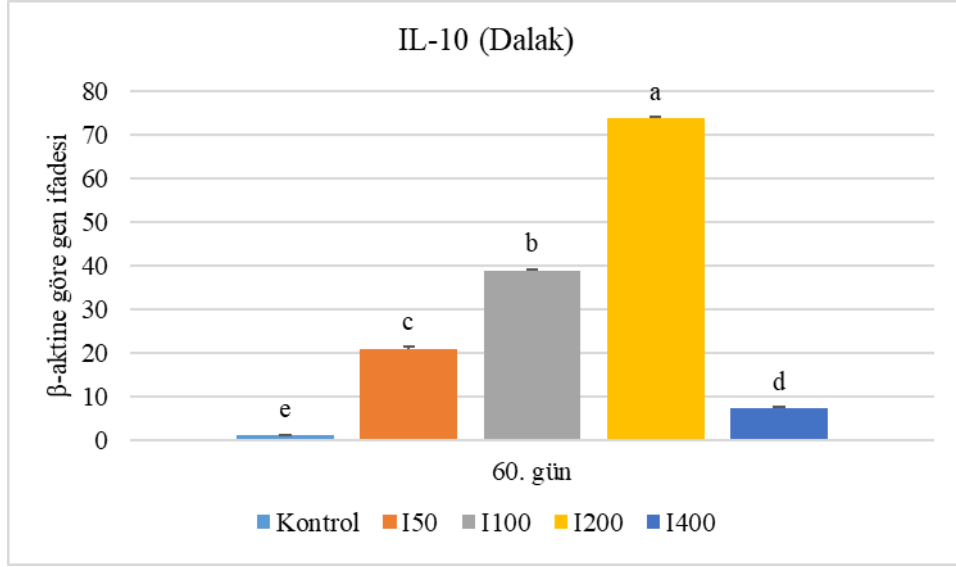
Bağırsakta IL-6 gen ifadesinin I100 grubundaki ekspresyon düzeyi diğer tüm gruplara göre en yüksek olarak bulunmuştur ($p<0,05$). I50, I200 ve I400 grupları arasında ise, IL-6 gen ifadesi açısından önemli bir farklılığın olmadığı ($P>0,05$), fakat söz konusu grupların IL-6 geni ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre 3,5 katlık bir artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Isırgan otunun çipura bağırsak dokusunda IL-6 gen ifadesine etkisi

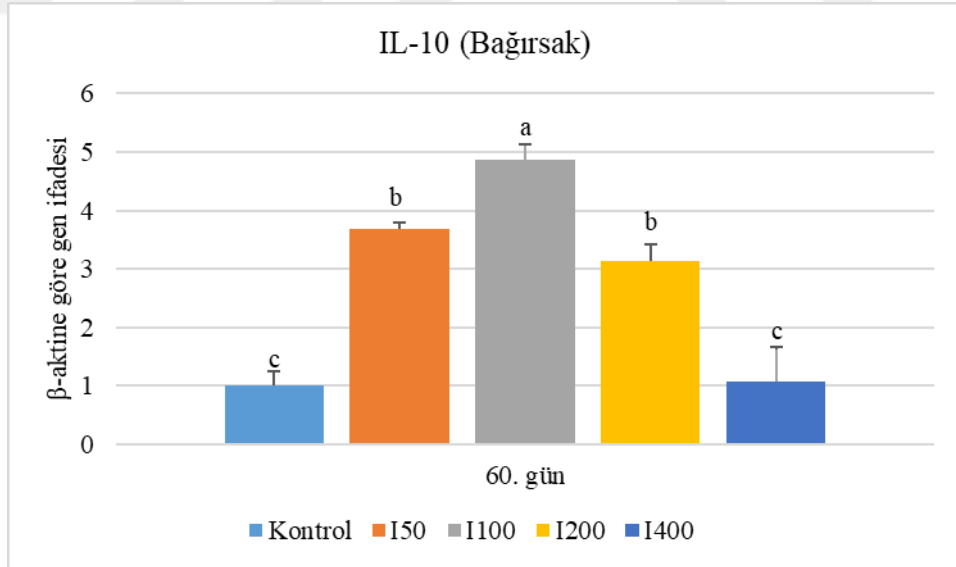
4.1.7.3 IL-10

IL-10 gen ekspresyonu, dalakta IL-6 ya benzer şekilde doza bağlı olarak artış göstermiş ve I200 grubunda kontrole göre en yüksek (yaklaşık 74 kat) seviyeye ulaşmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.8). I400 grubu diğer deney gruplarına göre daha düşük gen ekspresyon düzeyine sahip olsa da, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4,5 katlık bir artışı söz konusudur ($p<0,05$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Isırgan otunun çipura dalak dokusunda IL-10 gen ifadesine etkisi

Bağırsak dokusunda IL-10 gen ifadesinin I100 grubunda en yüksek düzeyde olduğu ($p < 0,05$), I50 ve I200 gruplarının ise benzer düzeyde olduğu tespit edilmiştir ($p > 0,05$). En düşük gen ekspresyon değerlerine sahip olan kontrol ve I400 grupları arasında istatistiksel bir fark görülmemiştir (Şekil 4.9) ($P > 0,05$).

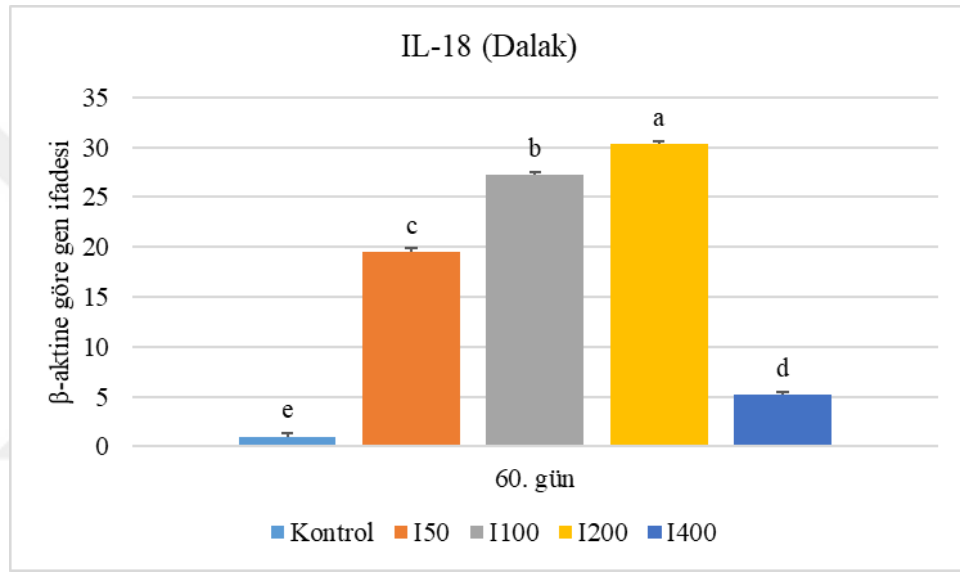


Şekil 4.9 Isırgan otunun çipura bağırsak dokusunda IL-10 gen ifadesine etkisi

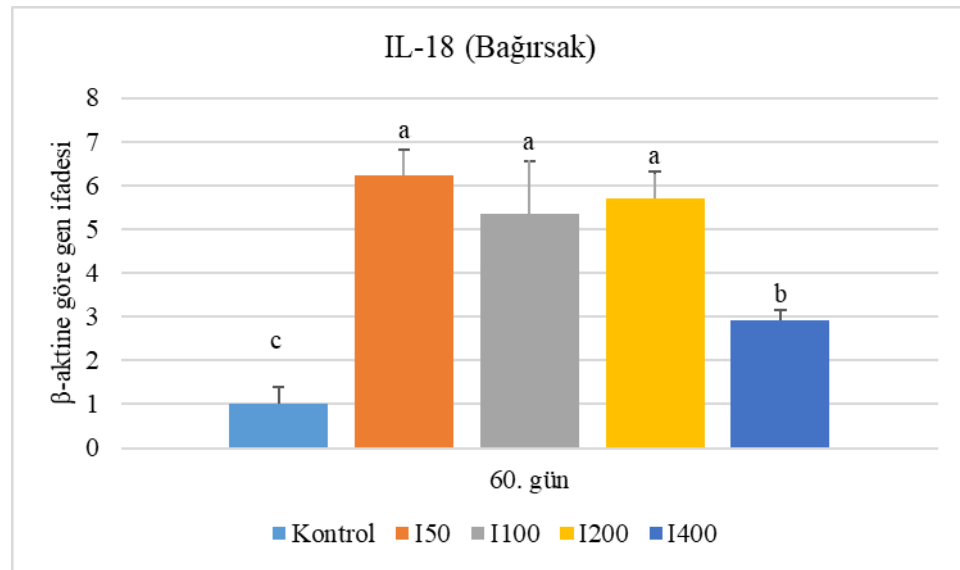
4.1.7.4 IL-18

IL-18 geninin gruplara göre dalaktaki ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, IL-6 ve IL-10 sitokinlerinin ekspresyon düzeylerine benzer sonuçlar görülmüştür. Dalakta

IL-18 geninin I200 grubunda, kontrole göre yaklaşık 30 katlık artışı olmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.10). Bağırsakta ise, I50; I100 ve I200 gruplarının ekspresyon düzeylerinde kontrole göre yaklaşık 5,5-6 katlık artışı olmuştur ($p<0,05$). Bağırsak dokuda IL-18 geninin, I50; I100 ve I200 grupları arasındaki ekspresyon düzeylerinde önemli bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Dalakta ve bağırsakta, IL-18 gen ekspresyonu düzeylerinin; I400 grubunda diğer deney gruplarına göre düşüş gösterdiği fakat kontrol grubuna göre artışının önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.11).



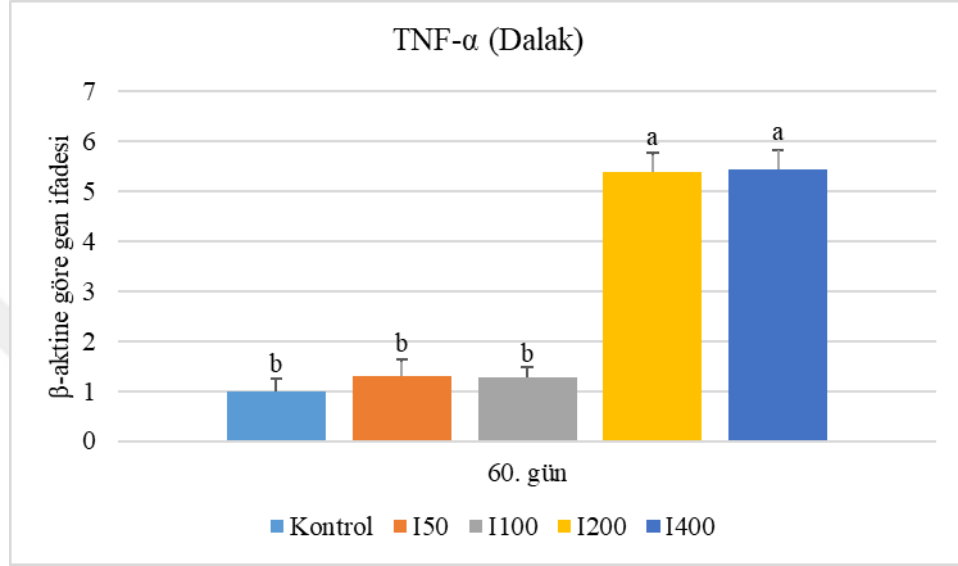
Şekil 4.10 Isırgan otunun çipura dalak dokusunda IL-18 gen ifadesine etkisi



Şekil 4.11 Isırgan otunun çipura bağırsak dokusunda IL-18 gen ifadesine etkisi

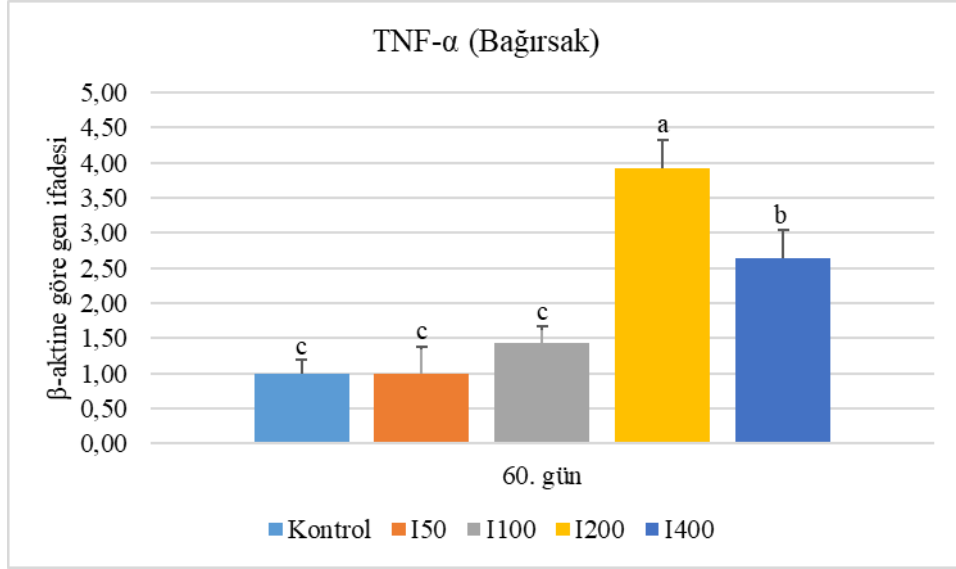
4.1.7.5 TNF- α

TNF- α 'nın dalaktaki ekspresyon seviyeleri I200 ve I400 gruplarında kontrol grubuna göre yaklaşık 5,5 kat artış göstermiştir ($p<0,05$). I50 ve I100 gruplarında ise kontrole göre önemli bir farklılık tespit edilmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Isırgan otunun çipura dalak dokusunda TNF- α gen ifadesine etkisi

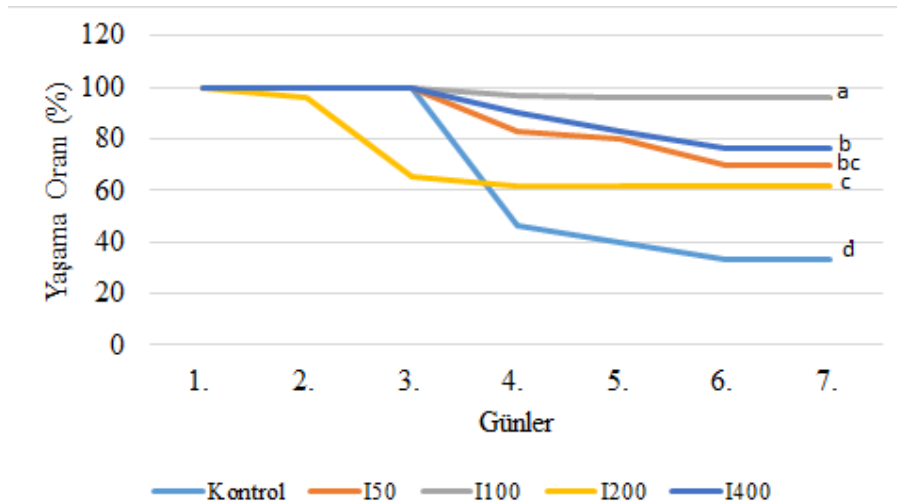
TNF- α 'nın bağırsaktaki ekspresyon seviyelerinin ise I200 ve I400 gruplarında diğer gruplara göre yüksek olduğu ancak I200 grubundaki artışın tüm gruplara göre en yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.13). TNF- α 'nın dalakta ve bağırsaktaki gen ifadesine genel olarak bakıldığında benzerlik göze çarpmakta olup, I50 ve I100 gruplarının kontrol grubuna benzer gen ifadelerine sahip olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.13 Isırgan otunun çipura bağırsak dokusunda TNF- α gen ifadesine etkisi

4.1.8 Yaşama oranı bulguları

Deneme sonunda ısırgan otu etanolik özütünün hastalık direnci üzerine etkisini tespit etmek amacıyla balıklar *Vibrio (Listonella) anguillarum* bakterisi ile enfekte edilmişlerdir. Yapılan kontrol testi sonucunda en yüksek yaşama oranının %96 ile I100 grubunda olduğu ve diğer deneme gruplarında yine kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaşama oranlarının önemli derecede artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.14). Gruplara göre hayatta kalma oranları sırasıyla, Kontrol (%33); I50 (%70); I200 (%62); I400 (%76) ve I100 (%96) şeklindedir.



Şekil 4.14 *Vibrio (Listonella) anguillarum* bakterisine maruz bırakılan balıklarda yaşama oranları

4.2 Deneme 2

4.2.1 Fiziksel ve Kimyasal Su Kalitesi Bulguları

Deneme boyunca, su sıcaklığı 20-23 °C, tuzluluk ‰33-34, oksijen 5-6 mg/l, pH 7,5-8,5, toplam amonyak 0,02- 0,07 mg/l, Nitrit 0,03-0,05 mg/l ve Nitrat 0,8-1,1 mg/l aralıklarında tespit edilmiştir.

4.2.2 Büyüme Performansı Bulguları

Denemenin 30. ve 60. günlerinde balıkların başlangıç ve son ağırlık ortalamaları tespit edilmiş ayrıca canlı ağırlık artışı (CAA), yem dönüşüm oranı (YDO) ve spesifik büyüme oranları (SBO) ile birlikte Tablo 4.4 ve 4.5 'de verilmiştir. İstatistiksel olarak normal ve homojen dağılım gösteren veriler Duncan^a testine tabi tutulmuştur. Çalışmanın 30. gününde A100 ve A200 gruplarının YDO değerlerinde, kontrol ve A400 gruplarına göre olumlu değişimin olduğu tespit edilmiştir (p<0,05). Denemenin 60. gününde ise; kontrol ve deney grupları arasında büyüme performansları açısından önemli bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir (P>0,05).

Tablo 4.4 30. gün sonunda akçakesmenin, çipuraların büyüme performanslarına etkisi

	Deneme Grupları				
	Kontrol	A50	A100	A200	A400
Başlangıç Ağırlığı (g)	3,24±0,45	3,30±0,49	3,42±0,45	3,13±0,42	3,31±0,55
Son Ağırlık (g)	8,87±1,21	9,14±1,19	9,36±1,08	9,30±0,98	8,92±1,34
CAA(%)	173,49±1,96	177,21±8,10	173,70±12,71	198,26±7,79	170,57±7,16
YDO	1,40±0,03 ^a	1,35±0,03 ^{ab}	1,25±0,03 ^b	1,24±0,02 ^b	1,37±0,02 ^a
SBO (% gün-1)	3,26±0,10	3,30±0,06	3,30±0,13	3,50±0,12	3,27±0,12

n=9, ortalama±s. hata. Aynı periyotta farklı üstel harfler içeren gruplar arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir (p<0,05). CAA: Canlı ağırlık artışı, YDO: Yem dönüşüm oranı, SBO: Spesifik büyüme oranı

Tablo 4.5 60. gün sonunda akçakesmenin, çipuraların büyüme performanslarına etkisi

	Deneme Grupları				
	Kontrol	A50	A100	A200	A400
Başlangıç Ağırlığı (g)	3,24±0,45	3,30±0,49	3,42±0,45	3,13±0,42	3,31±0,55
Son Ağırlık (g)	14,95±1,46	14,82±1,68	15,23±1,93	15,07±1,36	14,71±1,79
CAA(%)	360,51±2,08	349,60±16,88	339,50±16,96	384,52±26,68	346,14±15,90
YDO	1,35±0,05	1,39±0,04	1,30±0,03	1,31±0,06	1,40±0,05
SBO (% gün-1)	2,24±0,01	2,20±0,06	2,16±0,06	2,32±0,09	2,19±0,06

n=9, ortalama±s. hata. Aynı periyotta farklı üstel harfler içeren gruplar arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir (p<0,05). CAA: Canlı ağırlık artışı, YDO: Yem dönüşüm oranı, SBO: Spesifik büyüme oranı

4.2.3 Hematolojik Bulgular

Akçakesme denemesinde gruplara göre RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC hematolojik parametreleri açısından meydana gelen değişimler Tablo 4.6'da verilmiştir. Sonuçlara göre RBC, Hb ve MCH parametrelerinde değişim meydana gelmemiştir ($p>0,05$). A200 grubunda, Hct ve MCV değerleri kontrol grubuna göre önemli artış göstermiştir ($p<0,05$). MCHC değeri açısından; A50 grubu ile kontrol grubu arasında önemli farklılık görülmezken ($p>0,05$), diğer deney gruplarında düşüş tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Tablo 4.6 60. günde akçakesme denemesinin hematolojik değişimlere etkisi

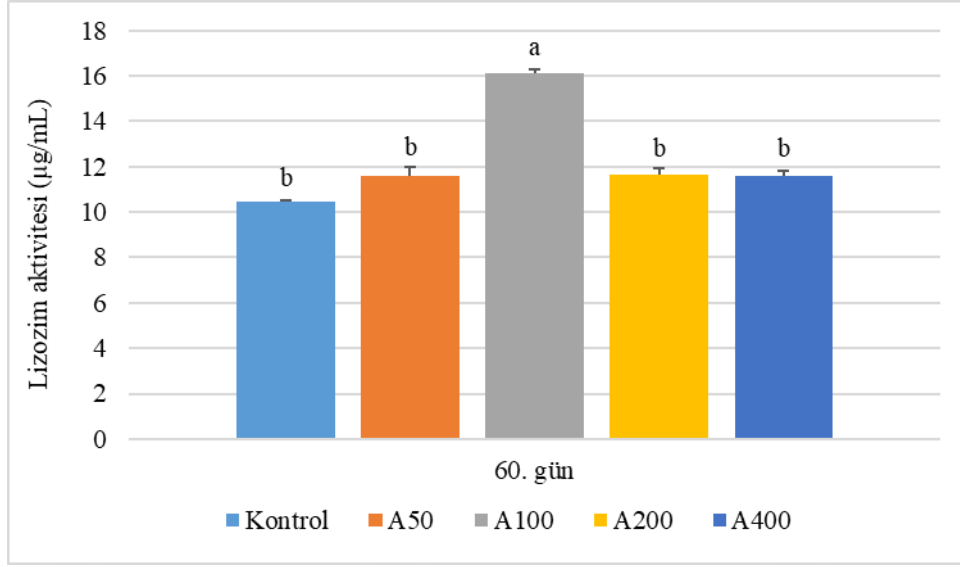
	RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (μm^3)	MCH (pg)	MCHC (%)
Kontrol	3,80±0,22	8,12±0,24	24,63±0,89 ^b	65,10±1,74 ^c	21,59±1,45	33,06±1,30 ^a
A50	3,64±0,20	7,87±0,36	26,04±2,04 ^{ab}	71,36±1,72 ^{bc}	21,67±0,20	30,43±0,97 ^{ab}
A100	3,71±0,07	7,64±0,13	27,17±0,65 ^{ab}	73,21±0,34 ^{ab}	20,61±0,06	28,15±0,21 ^b
A200	3,74±0,19	7,97±0,31	29,42±0,51 ^a	79,10±2,70 ^a	21,35±0,34	27,06±0,70 ^b
A400	3,59±0,11	7,74±0,18	28,19±0,19 ^{ab}	78,65±1,76 ^{ab}	21,58±0,14	27,46±0,46 ^b

4.2.4 İmmunolojik Bulgular

Denemenin 60. gününde alınan kan örnekleri ile humoral yanıtlarda meydana gelen değişimler (solunum patlaması, lizozim ve myeloperoksidaz aktiviteleri) analiz edilmiş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

4.2.4.1 Lizozim aktivitesi

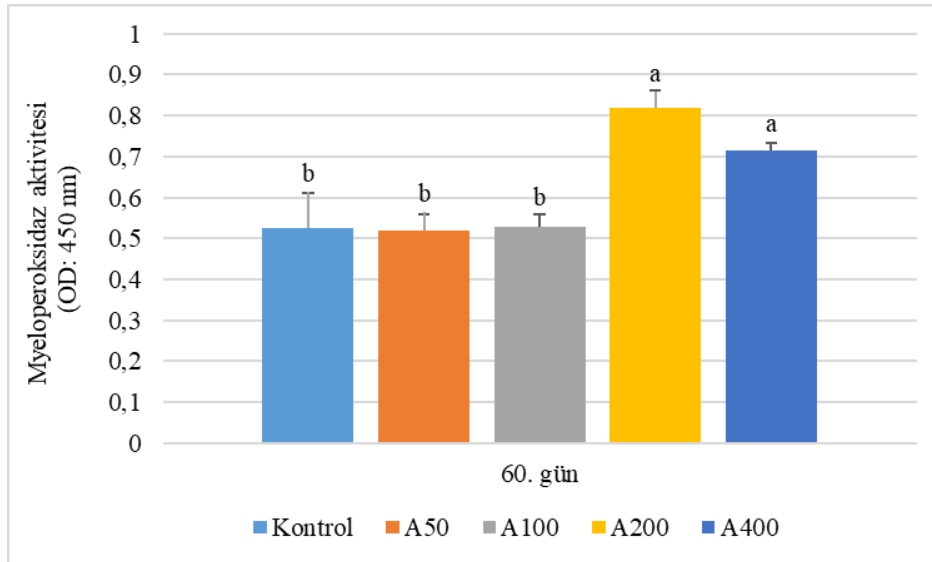
Lizozim aktivitesinde meydana gelen değişimler Şekil 4.15'de belirtildiği şekilde olup, sadece A100 grubunda, diğer gruplara göre önemli bir artış meydana gelmiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.15 Akçakesme bitkisinin çipura balıklarında lizozim aktivitesine etkisi

4.2.4.2 Myeloperoksidaz aktivitesi

Myeloperoksidaz aktivitesinin, A50 ve A100 gruplarında kontrol grubuna göre değişmediği ($p>0,05$); A200 ve A400 gruplarında ise diğer gruplara göre artış olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.16).



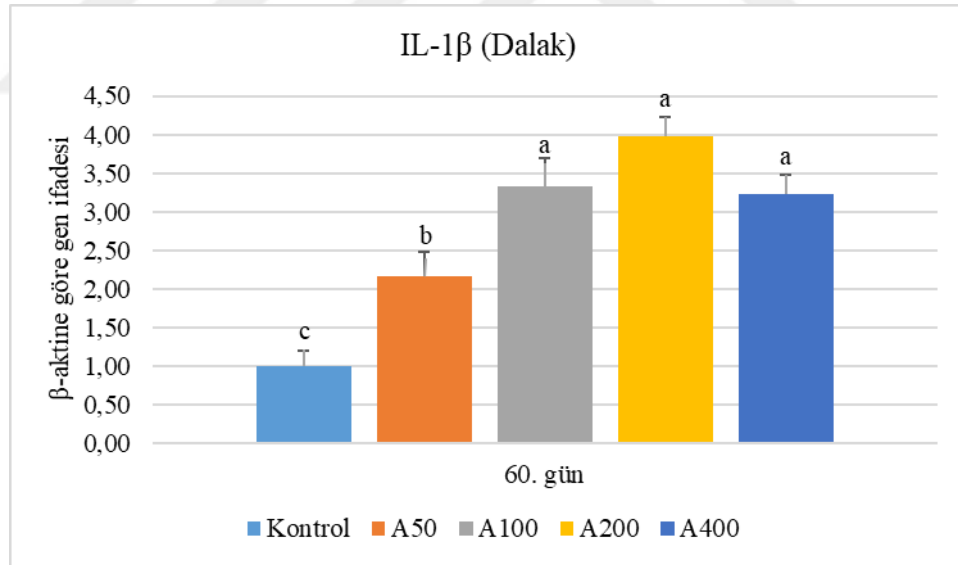
Şekil 4.16 Akçakesme bitkisinin çipura balıklarında myeloperoksidaz aktivitesine etkisi

4.2.5 Gen Ekspresyonları

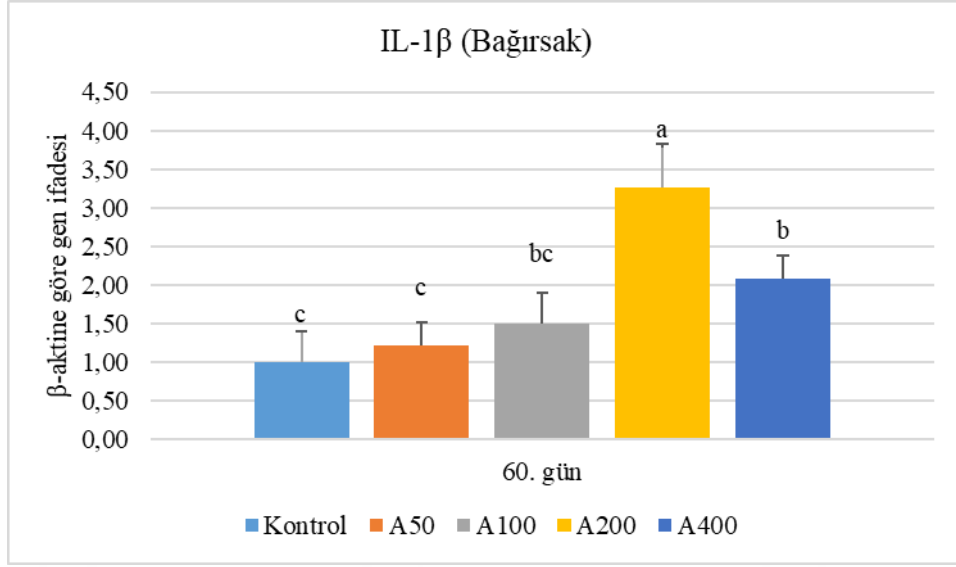
60 gün süreyle yem katkı maddesi olarak kullanılan akçakesme bitkisinin, çipura dalak ve bağırsak dokularında IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18 ve TNF- α sitokin gen ifadelerine etkisi 60. günün sonunda alınan örneklerin analizi ile tespit edilmiştir.

4.2.5.1 IL-1 β

IL-1 β sitokininin çipura dalak dokusundaki gen ifadesi incelendiğinde, tüm deney gruplarının ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu ($p<0,05$) tespit edilmiştir. A100, A200 ve A400 gruplarında ise IL-1 β ekspresyon düzeyinin en yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.17). Bağırsak dokuda ise bu durumdan farklı olarak diğer tüm gruplara göre gen ekspresyon seviyelerinin A200 grubunda en yüksek düzeyde olduğu ($p<0,05$); kontrol, A50 ve A100 gruplarında benzer gen ifadelerinin olduğu tespit edilmiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.18).



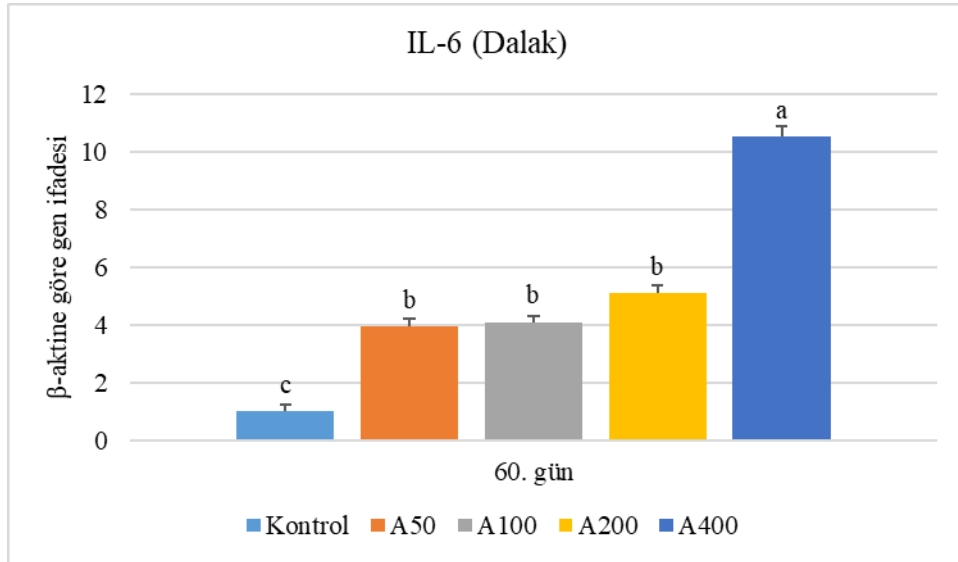
Şekil 4.17 Akçakesme bitkisinin çipura dalağında IL-1 β gen ifadesine etkisi



Şekil 4.18 Akçakesme bitkisinin çipura bağırsağında IL-1 β gen ifadesine etkisi

4.2.5.2 IL-6

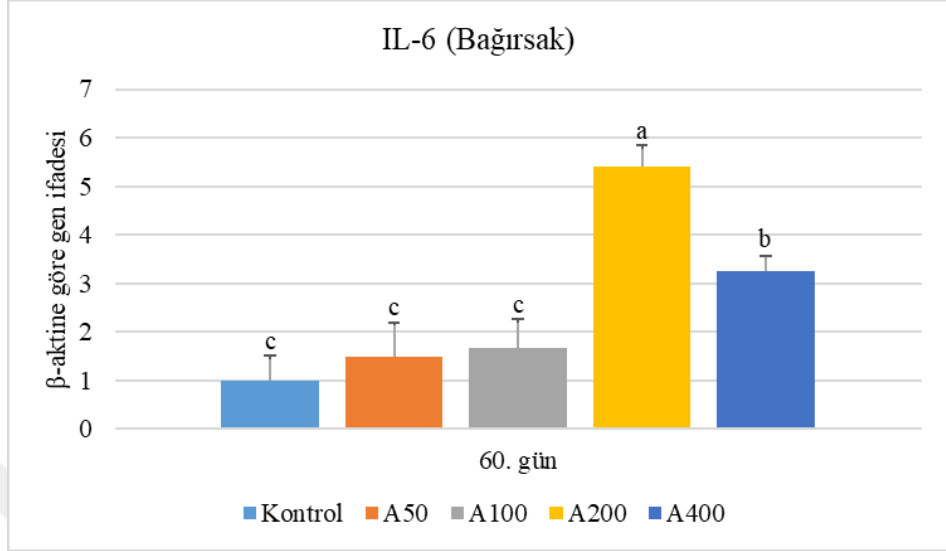
IL-6 geninin dalaktaki ekspresyon seviyeleri deney gruplarının tümünde kontrole göre artış göstermiş olup ($p < 0,05$), A400 grubundaki bu artış diğer tüm gruplara göre en yüksek düzeyde gerçekleşmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 Akçakesme bitkisinin çipura dalağında IL-6 gen ifadesine etkisi

IL-6 geninin bağırsaktaki ekspresyon düzeyi, A200 grubunda en yüksek düzeyde olarak bulunmuştur ($p < 0,05$). A400 grubunda ise IL-6 gen ifadesi A100'den düşük seviyede olsa da kontrol grubuna göre 3,3 katlık bir artış göstermiştir ($p < 0,05$).

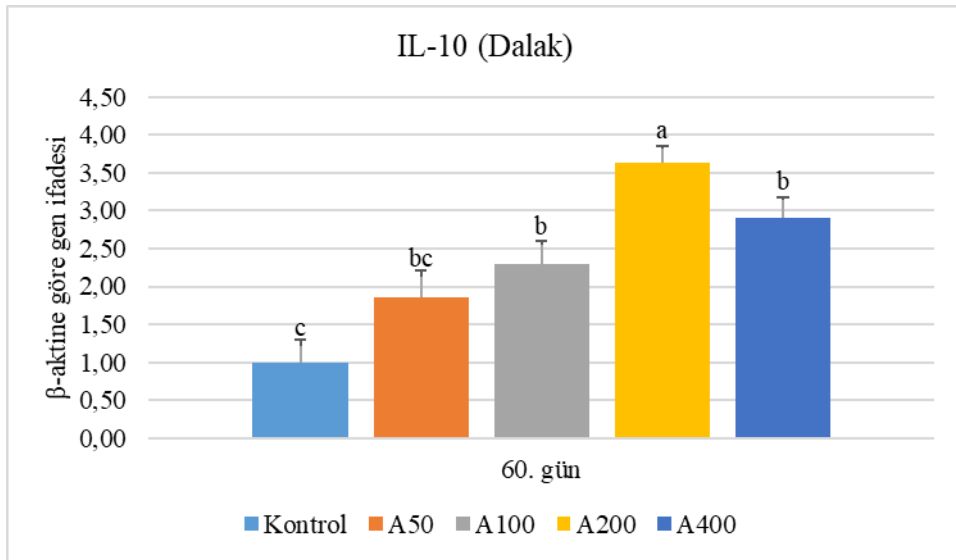
Kontrol, A50 ve A100 grupları arasında IL-6 gen ekspresyonunda önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 Akçakesme bitkisinin çipura bağırsağında IL-6 gen ifadesine etkisi

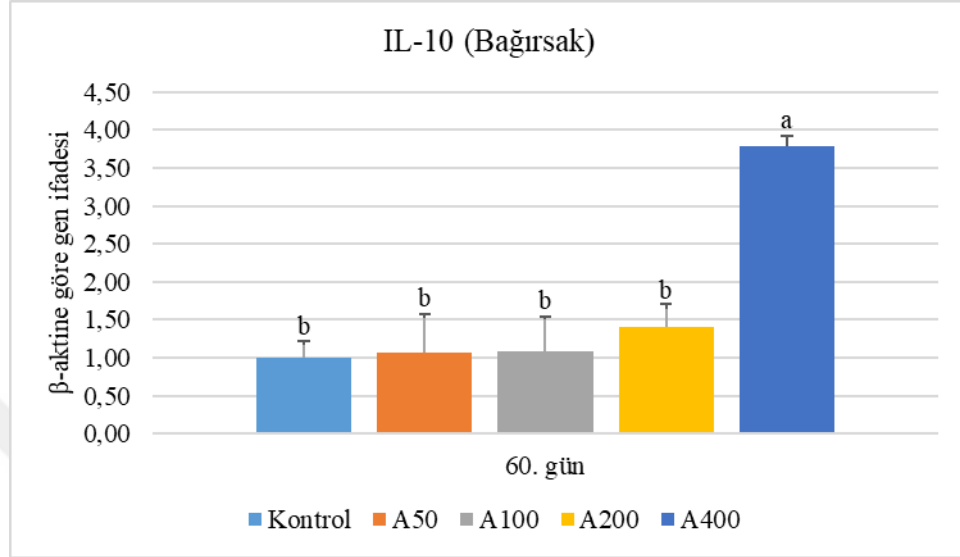
4.2.5.3 IL-10

IL-10 geninin dalaktaki ekspresyon düzeylerine göre A200 grubu diğer tüm gruplara göre en yüksek seviyede iken ($p<0,05$), A100 ve A400 grupları A200'den sonra kontrol grubuna göre önemli artış gösteren gruplar olmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.21).



Şekil 4.21 Akçakesme bitkisinin çipura dalağında IL-10 gen ifadesine etkisi

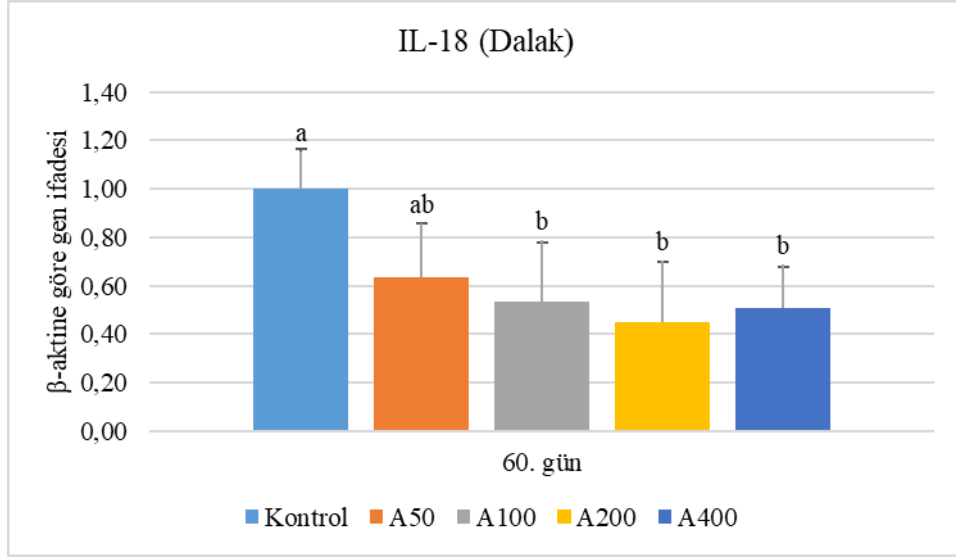
IL-10 sitokininin gruplara göre bağırsaktaki ekspresyon düzeyi dalaktakinden farklı olup, A400 grubu kontrol grubuna göre 3,8 kat artışla diğer tüm gruplara göre farklılık gösteren tek grup olmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.22).



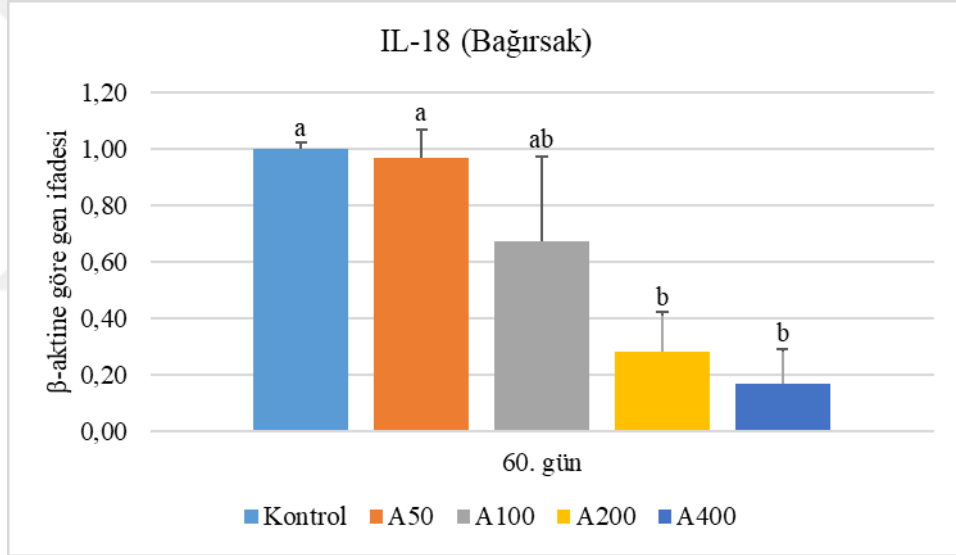
Şekil 4.22 Akçakesme bitkisinin çipura bağırsağında IL-10 gen ifadesine etkisi

4.2.5.4 IL-18

IL-18 geninin dalaktaki düzeylerine bakıldığında A50 grubu kontrolle benzerlik gösterirken ($p>0,05$), A100; A200 ve A400 gruplarının ekspresyon seviyelerinde kontrole göre düşüş olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.23). Bağırsakta ise kontrol, A50 ve A100 grupları gen ekspresyon seviyeleri benzerlik göstermiş olup ($p>0,05$), A200 ve A400 gruplarının gen ifadelerinde diğer gruplara göre azalma meydana gelmiştir ($P<0,05$) (Şekil 4.24).



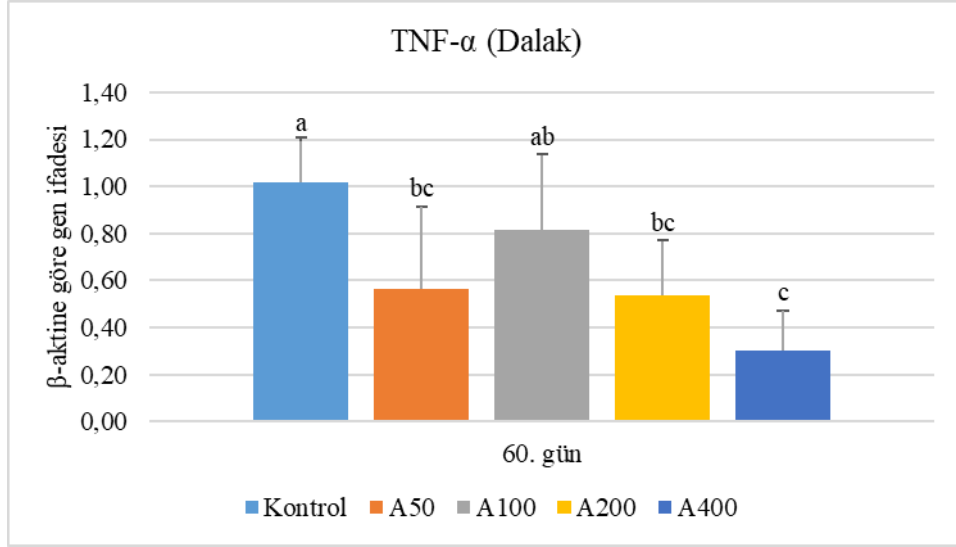
Şekil 4.23 Akçakesme bitkisinin çipura dalağında IL-18 gen ifadesine etkisi



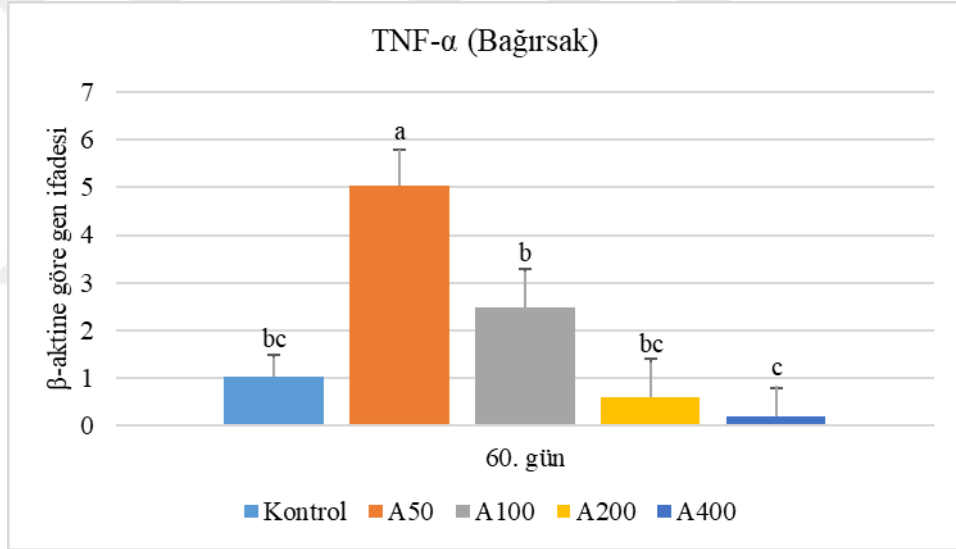
Şekil 4.24 Akçakesme bitkisinin çipura bağırsağında IL-18 gen ifadesine etkisi

4.2.5.5 TNF- α

TNF- α gen ekspresyonu açısından, dalakta kontrol grubu ile A100 grubu arasında benzerlik olduğu ($p>0,05$) fakat diğer deney gruplarının kontrol grubundan düşük seviyelerde olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.25). Bağırsakta ise dalaktaki gen ifadelerinden farklı olarak TNF- α sadece A50 grubunda kontrole göre önemli derecede artmış ($p<0,05$), A100; A200 ve A400 grupları ise kontrolle benzerlik göstermiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.26).



Şekil 4.25 Akçakesme bitkisinin çipura dalağında TNF- α gen ifadesine etkisi



Şekil 4.26 Akçakesme bitkisinin çipura bağırsağında TNF- α gen ifadesine etkisi

5. TARTIŞMA

Balık yetiştiriciliğinde, hastalıkların kontrolünde belirli bir kullanım potansiyeline sahip olan ilaç, kimyasal ve antibiyotiklere alternatif olarak immunostimulantların kullanımını günümüzde birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir. Bu bağlamda, genellikle bağışıklık tepkisini modüle etmek, potansiyel terapötik önlemler almak ve özellikle balık hastalıklarını önlemek ve kontrol etmek için tıbbi bitki ürünlerinin kullanımına odaklanılmıştır (Awad ve Austin, 2010; Bilen vd., 2021a; Secombes, 1996; Terzi vd., 2021). Farklı bitkisel özütlerin çeşitli balık türleri üzerinde denemeleri neticesinde balıkların büyüme performansları, hematolojisi, doğal ve adaptif bağışıklık sistemleri alanında sonuçları birbiriyle örtüşen veya bağımsız olan pek çok araştırma literatüre kazandırılmıştır (Altunoglu vd., 2017; Baba, 2017; Bilen vd., 2011; Çelik, 2020; Sönmez vd., 2022; Yılmaz vd., 2020).

Balıklarda yem katkı maddesi olarak kullanılan şifalı bitkilerin iştahı artırdığı, ağırlık artışı desteklediği ve spesifik büyüme oranlarına olumlu etkiler sağladığı bilinmektedir (Awad ve Awaad, 2017). Bu çalışmada, ısırgan otu etanolik özütü ile beslenen balıkların bütün gruplarında büyüme parametrelerinin kontrol grubuna benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir ($p>0,05$). Sonuçlarımızdan farklı olarak; Bilen vd. (2016b), gökkuşağı alabalıklarında 100 ve 500 mg kg⁻¹ dozlarında denedikleri ısırgan otunun kontrol grubuna göre CAA, SBO ve YDO değerlerini düşürdüğünü belirtmişlerdir ($p<0,05$). Bilen vd. (2016b) çalışmalarında, gökkuşağı alabalıklarında denenen 100 mg kg⁻¹ ısırgan otunun 500 mg kg⁻¹ doza göre YDO değerinde daha fazla olumlu etki gösterdiğini belirtmişlerdir ($p<0,05$). Bu durumu açıklayıcı olarak; ısırgan otunun içeriğindeki fitatlar (fitik asit), oksalatlar ve saponinler gibi bazı beslenmeyi olumsuz yönde etkileyebilecek bileşiklerin mevcut olması gösterilebilir (Zare vd., 2023). Örneğin; saponinlerin immüno-uyarıcı ve antikanserojenik etkilerinin yanında; aşırı seviyelerinin, insanlarda ve hayvanlarda hipokolesterolemiye, hipoglisemiye, hasarlı protein sindirimine, bağırsakta vitamin/mineral alımının azalmasına, büyümeye, yem alımına ve üremeye olumsuz etkileri olduğu belirtilmiştir (Francis vd., 2002). Fakat bu durumun tersine Saeidi vd. (2017), gökkuşağı alabalıklarında %3 ısırgan otu etanolik özüt takviyesinin, %1 ve %2'lik gruplara göre FCR değerini

olumlu yönde etkilediğini tespit etmişler ($p<0,05$) ve bu durumu ısırgan otunun yem lezzetini olumlu etkilediğine buna bağlı olarak balıkların yem alımını artırdığına yorumlamışlardır. Bu görüşü destekleyici olarak ısırgan otu için; Bedford (2000), yapraktaki kapsaisin, sinnamaldehit ve karvakrol gibi biyoaktif bileşiklerin, gıda kullanım etkinliğini artırabildiğini; Jamroz (2002), ısırgan otunun büyüme performansını iyileştirdiğini; Lee ve Gao (2012) ise sindirim enzimi salgılanmasını ve dolayısıyla besin emilimini arttırdığını belirtmişlerdir. Ayrıca, fenolik bileşikler, balık bağırsağında çeşitli patojenik ve patojenik olmayan bakteri türlerinin kolonizasyonunun engellenmesi nedeniyle büyüme performansını da uyarılmış olabileceği de literatürde yer alan bilgiler arasındadır (Van Hai, 2015). Zare vd. (2023) ise ısırgan otunun büyümeye ve diğer fizyolojik parametrelere olabilecek yan etkilerinden dolayı optimum dozun gerekliliği üzerinde durmuştur. Awad ve Austin (2010), toz halinde %1 ve %2 oranlarında yeme ilave ettikleri ısırgan otunun gökkuşağı alabalıklarında, sindirim enzimlerini aktive ettiğini böylece ağırlık artışı (WG) ve spesifik büyüme oranı (SGR) değerlerinde önemli gelişmelerin sağlandığını tespit etmişlerdir ($p<0,05$). Mehrabi vd. (2020)'nin, gökkuşağı alabalığı ile yaptıkları çalışmalarında yeme ilave ettikleri farklı dozlarda (%0,5; %1 ve %1,5) toz halindeki ısırgan otunun etkilerini 8 haftalık süreyle denemişlerdir. Mehrabi vd. (2020), tüm deney gruplarındaki balıklarda; CAA, SBO ve YDO değerlerindeki artışların kontrol grubuna göre önemli ölçüde olduğu sonucuna ulaşmışlardır ($p<0,05$). Saeidi vd. (2017) ise yeme %3 oranında ısırgan otu eklenmesinin, kontrol yemi ile beslenen balıklara kıyasla gökkuşağı alabalığında WG ve SGR'yi arttırdığını tespit etmişlerdir ($p<0,05$). Zare vd. (2023), gökkuşağı alabalıklarında, toz haline getirdikleri ısırgan otunun 30 g kg⁻¹ oranında yeme ilavesi sonucunda CAA ve SBO değerlerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde artış gösterdiğini tespit etmişlerdir ($p<0,05$). Balık büyüme performansı üzerine yapılan araştırmalarda farklı sonuçların elde edilmesinin nedeni olarak; balık türlerinin veya farklı dozlardaki bitkisel özütlerin çeşitli bağırsak mikrobiyotasına etki etkileyebileceğinden kaynaklandığı görüşleri literatürde mevcuttur (Dezfoulnejad ve Taravat, 2022).

Çalışmamızda, akçakesme bitkisi ile beslenen gruplardan elde edilen sonuçlara bakıldığında, 30. günde A100 ve A200 gruplarında meydana gelen YDO'nındaki değişimlerin diğer akçakesme ve kontrol gruplarına göre olumlu yönde olduğu

($p < 0,05$), fakat A50 ve A400 gruplarının kontrol ile benzer seviyede olduğu tespit edilmiştir ($p > 0,05$). Bulgularımıza benzer şekilde Baba vd. (2018), %0; %0,1; %0,25; %0,5 ve %1 oranlarında zeytin yaprağı etanolik özütü katkılı yem ile 60 gün süreyle besledikleri gökkuşuğu alabalıklarının deneme sonundaki büyüme performanslarında kontrol grubuna göre önemli bir farklılığın olmadığını rapor etmişlerdir ($p > 0,05$). Barka (2019) ise, bu sonuçlardan farklı olarak alabalıklarda denediği, %0,1; %0,5 ve %1 oranlarında akçakesme yaprağı sulu metanolik özütlerinin artan doza bağlı olarak yem dönüşüm oranını da arttırdığını belirtmiştir. Barka (2019), özellikle %1'lik akçakesme yaprağı özütünün, kontrol grubuna göre yem dönüşüm oranında artışa neden olduğunu ve bu artışın önemli olduğunu belirtmiştir ($p < 0,05$). Araştırma bulgularımızdan farklı olarak Barka (2019), akçakesme yaprağından özütlediği tüm deney gruplarında CAA ve SBO değerlerinde, kontrol grubuna göre artış sağlandığını ve tüm gruplar içerisinde en iyi sonuca %0,5'lik doz ile ulaşıldığını tespit etmiştir ($p < 0,05$). Bilen vd. (2019b), çipura balıklarının yemine ilave ettikleri, 500 mg kg⁻¹ ve 1000 mg kg⁻¹ oranlarında tetra (*Cotinus coggygria*) sulu metanolik özütünün, kontrol grubuna göre balıkların YDO değerlerinde önemli farklılığa neden olmadığını tespit belirtmişlerdir ($p > 0,05$). Bulgularımıza göre akçakesme 100 ve 200 mg kg⁻¹ etanolik özütlerinin 30 günde çipuraların YDO değerlerinde iyileşme sağladığı görülürken; Bilen vd. (2019b), 500 mg kg⁻¹ ve 1000 mg kg⁻¹ oranlarında ebe gümece (*Malva sylvestri*) metanolik özütlerinin, 60. günün sonunda çipuraların kontrol grubuna göre YDO değerini iyileştirdiği sonucuna varmışlardır ($p < 0,05$). Beltrán vd. (2020) ise; %0,5 ve %1 oranlarında kekik tozu katkılı yemlerle 30 gün süreyle besledikleri çipura balıklarının, CAA ve SBO değerlerinde önemli bir farklılığın olmadığını belirtmişlerdir ($p > 0,05$). Çipura balıklarında yem katkısı olarak denenilen 50 g kg⁻¹ oranında ezilmiş çemen otu (*Trigonella foenum graecum*) tohumunun ise, SBO ve CAA değerlerine anlamlı bir katkı sağladığı belirtilmiştir ($p < 0,05$) (Bahi vd., 2017).

Balıklarda kan hücresi sayımları; beslenme, su kalitesi, hastalıklara bağlı olabilecek değişiklikleri veya tedaviye yanıt olarak balığın sağlık durumunu izlemek için kullanılabilen bir yöntemdir (Fazio, 2019). Ayrıca hematolojik parametrelerin balık sağlığının takip edilmesi açısından önemli birer gösterge olduğu belirtilmiştir (Yılmaz vd., 2016). Balıkların rutin hematolojik değerlendirmesi, toplam eritrosit sayısı (RBC), hematokrit (Hct), hemogloblin konsantrasyonu (Hb), eritrosit indeksleri (MCV, MCH,

MCHC) parametrelerini içermektedir. Bu çalışmada deney gruplarının hematolojik parametreleri, kontrol grubuna göre karşılaştırılmış; ısırgan otu denemesinde gruplar arasında önemli bir farklılığın olmadığı ($p>0,05$); akçakesme denemesinde ise A200 grubunda kontrol grubuna göre, Hct ve MCV hematolojik değerlerinin arttığı; MCHC'nin ise azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu parametrelerin dışında ısırgan otu ve akçakesme gruplarında hematolojik açıdan önemli bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Bizim sonuçlarımızdan farklı olarak; Awad ve Austin (2010), %1 oranında ısırgan otunun yeme ilavesi sonucunda gökkuşacağı alabalıklarında Hct ve Hb seviyelerinde artış sağlandığını tespit etmişlerdir ($p<0,05$). Saeidi vd. (2017) ise %3 ısırgan otu diyet takviyesinin gökkuşacağı alabalıklarında Hct, Hb, lenfosit, nötrofil ve RBC değerlerini arttırdığını; 60. günde ise %2 ve %3 ısırgan otu kullanımının en yüksek RBC, WB, lenfosit ve nötrofil artışını sağladığını belirtmişlerdir ($p<0,05$). Mehrabi vd. (2020), ısırgan otunu toz halinde gökkuşacağı alabalığı yem katkı maddesi olarak denedikleri çalışmalarında, ısırgan tozu ilavesinin, balıklarda RBC, Hb konsantrasyonu ve Hct seviyelerini kontrole göre önemli ölçüde arttırdığını belirtmişlerdir ($p<0,05$). Benzer şekilde Zare vd. (2023), yeme ilave ettikleri 10 gkg^{-1} oranında ısırgan otunun gökkuşacağı alabalıklarında RBC, Hb, Hct, MCV ve MCH kan parametrelerini arttırdığını belirtmişlerdir ($p<0,05$). Bu sonuçlardan farklı Acar vd. (2018), yem katkı maddesi olarak denedikleri %60 oranında lupin (*Lupinus albus*) ilavesinin gökkuşacağı alabalıklarında Hct ve MCV değerlerini diğer gruplara göre önemli düşürdüğünü belirtmişlerdir ($p<0,05$). Mohamed vd. (2018), kereviz (*Apium graveolens*) sulu metanolik özütünü %0,1; %0,5 ve %1 oranlarında yem katkı maddesi olarak 45 gün süreyle sazan balıklarında denemişler ve hematolojik parametrelere (RBC, Hb, Hct, MCH ve MCHC) olan etkilerini araştırmışlardır. Mohamed vd. (2018) kontrol grubuna göre yaptıkları değerlendirme sonucunda; %0,1'lik grupta RBC, Hb ve Hct'de önemli bir artış; MCV, MCH ve MCHC'de ise azalma olduğunu belirtmişlerdir ($p<0,05$). Yılmaz vd. (2019) ise, karabaş otu yağını sazanlarda yem katkı maddesi olarak denedikleri çalışmalarında; RBC, Hct ve Hb bulgularında, balık için bildirilmiş olan (Baba vd., 2016; Field vd., 1943; Tripathi vd., 2004) referans değerleri [RBC: 0,65-4,66 10^6 mm^{-3} , Hct: %21-40 Hb: 6,3-12,4 g/dL] aralığında olduğu belirtmişlerdir. Yılmaz vd. (2019), %0,5'lik grupta söz konusu parametrelerin tümünün önemli derecede düştüğü ($p<0,05$), %1 'lik grupta ise Hct, MCV ve MCHC değerlerinde düşüş yaşanırken ($p<0,05$); RBC, Hb ve MCH için anlamlı bir fark

olmadığını belirtmiştir ($p>0,05$). Bu sonuçlardan farklı olarak Almabrok vd. (2018), gümüşü ihlamur (*Tilia tomentosa*) % 40 metanolik özütünün %0,01; %0,05 ve %0,1 oranlarında yem katkı maddesi olarak 45 gün süreyle sazan balıklarında denemesi sonucunda hematolojik parametrelerde (RBC, Hb, Hct, MCH ve MCHC) bir değişime sebebiyet vermediğini belirtmişlerdir ($p>0,05$). Almabrok vd. (2018) elde ettikleri bu sonucu, gümüşü ihlamur metanolik özütünün balıkları fizyolojik olarak strese sokmadığının göstergesi olarak yorumlamışlardır.

İmmünostimulant etkiye sahip biyoaktif bileşikler içeren şifalı bitkilerin yem katkı maddesi olarak kullanılması, balıklarda spesifik ve spesifik olmayan bağışıklık tepkilerinin artmasını sağlamaktadır (Ghosh vd., 2019) . Bu çalışmada, NBT indirgenmesi sonucu solunum patlaması aktivitesinin I200 grubunda kontrol grubunda yüksek ($p<0,05$); lizozim ve myeloperoksidaz aktivitelerinin ise I100 grubunda diğer gruplara göre daha yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Mehrabi vd. (2020), gökkuşığı alabalığında %0,1; %0,5 ve %1 ısırgan otu ile yaptıkları çalışmalarında kontrol grubuna göre solunum patlamasının değişim göstermediği ($p>0,05$), lizozim aktivitesinin ise %0,5'lik grupta önemli ölçüde arttığını tespit etmişlerdir ($p<0,05$). Bilen vd. (2016b), yeme ilave ettikleri 0,1 ve 0,5 g kg⁻¹ oranlarında ısırgan otu metanolik özütlerinin, gökkuşığı alabalıklarında süperoksit anyon üretimini, fagositik aktiviteyi, lizozim ve myeloperoksidaz aktivitelerini kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttırdığını belirtmiş olup; özellikle fagositik aktivite ile lizozim aktivitelerinin doz artışına bağlı olarak artış gösterdiğini tespit etmişlerdir ($p<0,05$). Zare vd. (2023), gökkuşığı alabalıklarında 30 g kg⁻¹ oranında toz halindeki ısırgan otunun lizozim aktivitesini kontrol ve 10 g kg⁻¹ gruplarına göre önemli ölçüde arttırdığını tespit etmişlerdir ($p<0,05$). Saeidi vd. (2017), %3'lük ısırgan otu etanolik özütünün gökkuşığı alabalıklarında 4. hafta ve 8. hafta sonlarında lizozim ve solunum patlama aktivitesinin önemli ölçüde arttığını tespit etmişlerdir ($p<0,05$). Çalışmamızın akçakesme bitkisi gruplarında, lizozim aktivitesinin A100 grubunda; myeloperoksidaz aktivitesinin ise A200 ve A400 gruplarında diğer tüm gruplara göre önemli düzeyde arttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde Barka (2019), %0,1 ve %0,5 oranlarında yeme ilave ettikleri akçakesme yaprağı metanolik özütlerinin gökkuşığı alabalıklarında lizozim aktivitesine 15. ve 45. günlerde etki göstermediğini, 75. günde ise %0,1 grubunda artışın diğer gruplara göre önemli

olduğunu tespit etmişlerdir ($p<0,05$). Bu çalışmada akçakesme etanolik özütünün 200 ve 400 mgkg⁻¹ dozlarının çipura balıklarında 60. günde MPO değerini diğer gruplara göre arttırdığı tespit edilmiş olup; Barka (2019), ise 45. günde %0,1 ve %0,5 oranlarındaki akçakesme özütlerinin MPO değerinde önemli artışlar sağladığını belirtmişlerdir ($p<0,05$). Çalışmamıza benzer şekilde Bilen vd. (2019b), 500 mg kg⁻¹ ebe gümece özütünün çipura ve levrek balıklarında 60. günde solunum patlaması, lizozim ve myeloperoksidaz aktivite değerlerini kontrol grubuna göre önemli derecede artırdığını bulmuşlardır ($p<0,05$). Awad vd. (2015), himalaya sediri (*Cedrus deodara*) kurumuş iğne yapraklarını, %95 alkol ile özüte ederek elde ettikleri dihidro kuersetini çipura yemlerine (%0, kontrol), %0,1; %0,5 ve %1 oranlarında ilave ederek 14 gün boyunca besleme denemesinde kullanmışlardır. Awad vd. (2015) %0,1 ve %1 dihidro kuersetininin çipura balıklarında solunum patlama aktivitesini kontrol grubuna göre önemli derecede aktive ettiğini tespit etmişlerdir ($P<0,05$). Guardiola vd. (2018) ise, %0 (kontrol); %1; %5; %10 çemen tohumunu yem katkı maddesi olarak çipuralarda denemişler ve %10 çemen ilavesinin solunum patlama aktivitesinde diğer gruplara göre önemli artış sağladığını keşfetmişlerdir ($p<0,05$). Bu çalışmalardan farklı olarak %0 (kontrol); %0,5 ve %1 oranlarında kekik tozu katkılı yemlerle 30 gün süreyle beslenen çipura balıklarında; lizozim ve solunum patlama aktivitelerinde herhangi bir farklılığın olmadığı belirtilmiştir (Beltrán vd., 2020). Haghghi ve Rohani (2015) ise %80 kekik etanolik özütünü denedikleri gökkuşacağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) solunum patlama aktivitesini arttırdığını belirtmişlerdir.

İmmun sistemdeki kaynağı, makrofajlar ve B hücreleri olan IL-1 β proenflamatuvar sitokini doğal bağışıklıkta önemli bir rol almaktadır (Male vd., 2006; Sakai, 1999; Sakai vd., 2021). Bu çalışmanın ısırgan otu denemesinde IL1- β geni için, dalaktaki ve bağırsaktaki en yüksek ekspresyon seviyelerinin I50 ve I100 gruplarında olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bulgularımıza benzer şekilde Mehrabi vd. (2020), gökkuşacağı alabalıklarında %0,5; %1 ve %1,5 oranlarında toz halinde yem katkı maddesi olarak denedikleri ısırgan otunun, IL-1 β bağımlı gen ekspresyonuna etkisini araştırmışlar sonuç olarak %0,5'lik grupta kontrol grubuna göre önemli artış tespit etmişlerdir ($p<0,05$). Mehrabi vd. (2020), yine bulgularımıza paralel olarak artan ısırgan otu dozu ile birlikte gen ekspresyonu seviyesinde azalma meydana geldiğini ve kontrole benzer seviyeye düştüğünü belirtmişlerdir. Zeytingiller familyasından olan Akçakesme denemesinde

(deneme 2) ise IL-1 β geninin, hem dalakta hemde bağırsakta ekspresyon düzeylerinin A200 ve A400 gruplarında kontrol grubuna göre önemli fark gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,05$). Baba vd. (2018), zeytin yaprağından (*Olea europea*) elde ettikleri sulu etanolik özütlerini %0; %0,1; %0,25; %0,5 ve %1 oranlarında gökkuşığı alabalıklarında yem katkı maddesi olarak denemişler, sonuç olarak kontrol grubuna göre IL-1 β geninin dalaktaki ekspresyonunun sadece %0,1'lik grupta arttığını tespit etmişlerdir ($p<0,05$). Benzer şekilde Zemheri-Navruz vd. (2019) ise, sazan balıklarında %0; %0,1; %0,25; %0,5 ve %1 oranlarında denedikleri zeytin yaprağı sulu etanolik özütlerinden dalakta sadece %0,1'lik grupta, kontrol grubuna göre IL-1 β geninin katlanma değerinde önemli artış olduğunu belirtmişlerdir ($p<0,05$). Montero vd. (2010), bitkisel yağları (soya fasülyesi ve keten tohumu yağları) çipura balıklarının yemlerine katarak 75 gün süreyle gerçekleştirdikleri besleme çalışmasının sonunda, proksimal bağırsakta (ince bağırsağın ilk ve en kısa bölümü), TNF- α ve IL-1 β genlerinin ekspresyonunu etkilemediğini belirtmişlerdir ($p>0,05$). Hoseinifar vd. (2018), adi sazan balıklarında denedikleri farklı konsantrasyonlarda 0 (kontrol), %0,25, %0,5 ve %1 malta eriği (*Eriobotrya japonica*) yaprak özütünün balıkların özellikle bağırsak dokularında IL-1 β , TNF- α ve IL-8 gen ekspresyon düzeylerini kontrol grubuna göre arttırdığını belirtmişlerdir ($p<0,05$).

IL-6 geninin ısırgan otu denemesi sonucunda dalaktaki ekspresyon düzeylerinin I400 grubuna kadar artan dozla birlikte arttığı ve en yüksek düzeye I200 grubunda ulaştığı ($p<0,05$); fakat I400 grubunda ani olarak azaldığı görülmüştür ($p<0,05$). Bunun nedeni olarak ısırgan otunun 400 mgkg⁻¹ doza çıkarıldığı zaman yemin tadını baskılayarak balıkların yeme olan ilgisini azaltmasıyla ilgili olduğu düşünülmüştür. Bağırsakta, IL-6 gen ekspresyonunun yaklaşık 7 kat artışıyla en yüksek seviyeye ulaştığı I100 grubundan sonra dozun artmasıyla düşüş yaşandığı görülmüştür, fakat I200 ve I400 grupları yine de kontrole göre yaklaşık 3,5 kat artışlarını korumuşlardır ($p<0,05$). Mehrabi vd. (2020), %0,5 ve %1 ısırgan otu ilavesinin gökkuşığı alabalıklarında IL-6 gen ekspresyonunu kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttırdığını tespit etmişlerdir ($p<0,05$). Akçakesme denemesinde ise dalakta A400, bağırsakta ise A200 grubunda diğer tüm gruplara göre en yüksek IL-6 gen ekspresyon düzeylerine ulaşılmıştır ($p<0,05$). IL-6 geni ekspresyon seviyeleri dalakta kontrol grubuna göre A400 grubunda yaklaşık 10 kat artış gösterirken, bağırsakta A200 grubunda 5,5 kat artış

göstermiştir ($p<0,05$). Castellana vd. (2008), çipura balıklarının, önemli bir patojeni olan *Vibrio anguillarum* ile in vivo olarak enfekte edilmesinden sonra, baş böbrek lökositlerinde IL-6'nın yüksek oranda eksprese edildiğini bildirmişlerdir ($p<0,05$).

IL-10 gen ifadesinin, ısırgan otu denemesinde IL-6 ile çok benzer sonuçlar gösterdiği ve yine dalakta I200, bağırsakta ise I100 gruplarında, diğer tüm gruplara göre en yüksek ekspresyon seviyelerine ulaşıldığı sonucuna varılmıştır ($p<0,05$). Akçakesme denemesinin IL-10 sonuçlarına bakıldığında ise; dalakta A200 grubunda, bağırsakta ise A400 grubunda kontrole göre yaklaşık 3,5 katlık bir ekspresyon artış ile karşılaşılmıştır ($p<0,05$). İnterlökin (IL-10), proinflamatuvar mediatörlerden sonra üretilen kritik bir anti-inflamatuvar sitokin olup, IL-6 ise enflamasyona yanıt olarak hemen sentezlenen bir sitokin olarak bilinmektedir (Wen vd., 2020). IL-1 β ; IL-6 ve IL-10 genlerinin dalaktaki ekspresyon düzeylerindeki artış ısırgan otu ile akçakesme bitkisi denemeleri arasında karşılaştırıldığı zaman önemli farklılıklar göze çarpmaktadır. Isırgan otu denemesinde kontrol grubuna göre en yüksek seviyelere dalak dokusunda; IL-1 β için 123 kat, IL-6 için yaklaşık 167 kat, IL-10 için ise yaklaşık 74 kat artışla ulaşıldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu durumdan farklı olarak akçakesme denemesinde kontrol grubuna göre bu değerler sırasıyla yaklaşık 4; 10,5 ve 3,5 kat artış ile kendisini göstermektedir ($p<0,05$). Bu durum ısırgan otunun, akçakesme bitkisine göre söz konusu sitokinlerin dalaktaki uyarımına daha fazla etki sağladığını bize göstermiştir.

IL-18 gen ekspresyon düzeylerine bakıldığında; ısırgan otu denemesinde artan doz ile birlikte dalakta I400 grubuna kadar katlanma değerinde artış olduğu, I200 grubunda gen ekspresyon düzeyinin kontrole göre 30 kat arttığı tespit edilmiştir. Bağırsakta ise bu artışın dozdan bağımsız bir şekilde maksimum 6 kat şeklinde I50, I100 ve I200 gruplarında olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu sonuçların tersine IL-18 gen ekspresyonu için akçakesme denemesinde artan dozlarla birlikte ekspresyon düzeylerinde düşüş olduğu, bu düşüşün A200 ve A400 gruplarında kontrole göre önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

TNF- α 'nın dalak ve bağırsak dokularındaki ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, ısırgan otu denemesinde I200 ve I400 gruplarında kontrol grubuna göre önemli artış

tespit edilmiştir ($p<0,05$). Akçakesme denemesinde A200 ve A400 gruplarında TNF- α 'nın dalakta kontrole göre ekspresyon seviyesinde azalma görülürken ($p<0,05$), bağırsakta kontrol grubu ile benzerlik göstermiştir ($p<0,05$). Mehrabi vd. (2020), gökkuşığı alabalığı diyetinde %0,5 oranında ısırgan otu tozu ilavesinin, IL-1 β ; IL-6; IL-8 ve TNF- α genlerinin ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna göre önemli artışlar sağladığını tespit etmişlerdir ($p<0,05$). Zemheri-Navruz vd. (2019), zeytin yaprağı etanolik özütünün sazan balığı dalak dokusunda TNF- α gen ekspresyonunu %0,1'lik grupta kontrole göre arttırdığını, fakat %1'lik grupta ise söz konusu ekspresyon değerlerinin azaldığını belirtmiştir ($p<0,05$). Baba vd. (2018), %0,1'lik zeytin yaprağı etanolik özütünün gökkuşığı alabalıklarının dalak dokusunda TNF- α gen ifadesinin kontrole göre arttığını tespit etmişlerdir ($p<0,05$).

Isırgan otu denenen gruplarda 60 günlük besleme sürecinin sonunda *Vibrio (Listonella) anguillarum* bakterisi ile kontrol testine tabi tutulan çipura balıklarında en iyi hayatta kalma oranının 1100 (%96) grubunda olduğu tespit edilmiş ve özellikle kontrol grubuna (%33) göre yüksek başarı elde edilmiştir. Mehrabi vd. (2020), gökkuşığı alabalıklarında, *Saprolegnia parasitica* bakterisi ile yaptıkları hayatta kalma testi sonucunda, kontrol grubunda %56 lık yaşama oranı tespit ettiklerini, %0,5'lik ısırgan otu tozu denedikleri grupta ise %86 ile en iyi yaşama oranına ulaştıklarını belirtmişlerdir ($p<0,05$). Mehrabi vd. (2020), gökkuşığı alabalıklarını *Saprolegnia parasitica* bakterisi ile kontrol testine tabi tutmalarının neticesinde %0,5'lik ısırgan otu ile takviye edilmiş grupta %86 ile kontrol grubuna (%56) göre en iyi yaşama oranına ulaşmışlar ($p<0,05$). Baba vd. (2018) ise, 20 gün süreyle *Yersinia ruckeri* bakterisi ile kontrol testine tabi tuttukları gökkuşığı alabalıklarında en yüksek hayatta kalma oranının %0,1'lik zeytin yaprağı özütü ile takviye edilmiş grupta kaydetmişlerdir ($p<0,05$).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1 Sonuçlar

Bu çalışmada yeme ilave edilen ısırgan otu ve akçakesme bitkilerinin %96 etanolik özütlerinin çipuralarda büyüme performansına, hematolojik parametrelere, bağışıklık parametrelerine, IL-1 β ; IL-6; IL-10; IL-18 ve TNF- α gen ifadelerine ayrıca sadece ısırgan otu denemesi için *Vibrio (Listonella) anguillarum* bakterisine karşı hayatta kalma oranına olan etkileri 2 farklı in vivo deneme ile araştırılmıştır. Sonuç olarak:

❖ Isırgan otunun denenen dozlarında çipura balıklarının büyüme performanslarında değişime neden olmadığı ($p>0,05$). Yeme ilave edilen 100 mg/kg ile 200 mg/kg akçakesmenin ise 30 günlük kullanımı sonrasında, çipura yavrularında YDO değerini düşürerek büyüme performansına katkı sağladığı bulunmuştur ($p<0,05$).

❖ Hematolojik parametreler açısından değerlendirildiğinde; ısırgan otunun çipura balıklarının hematolojisinde değişiklik yaratmadığı ($p>0,05$), akçakesmenin 200mg/kg dozunun ise Hct ve MCV değerlerini arttırdığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).

❖ 100 mg/kg ısırgan otunun lizozim ve myeloperoksidaz aktivitelerini kontrole göre arttırdığı ($p<0,05$); akçakesmenin ise 100 mg/kg dozunun lizozim aktivitesinde benzer artışı sağlarken; 200 mg/kg ve 400 mg/kg dozlarının myeloperoksidaz aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir ($p<0,05$).

❖ Solunum patlaması aktivitesinin, sadece ısırgan otu denemesi için gerçekleştirilebilmesi neticesinde; 200 mg/kg dozun diğer kontrole göre önemli artış sağladığı bulunmuştur ($p<0,05$).

❖ Isırgan otu denemesinin gen ekspresyonu analizleri neticesinde, 50 mg/kg; 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarının çalışılan tüm interlökin genler için dalakta ve bağırsakta kontrol grubuna göre önemli düzeyde artışlar sağladığı tespit edilmiştir

($p<0,05$). TNF- α geni için ise bu artışın söz konusu dokularda sadece 200 mg/kg ve 400 mg/kg dozlarda olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

❖ Akçakesmenin 100 mg/kg, 200 mg/kg ve 400 mg/kg dozlarında, dalakta IL-1 β ; IL-6; IL-10 gen ifadelerinde kontrole göre önemli artış sağladığı ($p<0,05$), bağırsakta ise söz konusu üç sitokin için 400 mg/kg 'lık dozda artışın önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ayrıca akçakesme deney gruplarının dalaktaki ve bağırsaktaki IL-18 ekspresyon seviyelerinin kontrolden yüksek olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). TNF- α geni için ise sadece bağırsakta A50 grubunda kontrole göre artışın önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

❖ Isırgan otu denemesinde *Vibrio (Listonella) anguillarum* bakterisi ile yapılan kontrol testi sonucunda; %96'lık değer ile en iyi yaşama oranına, 100 mg/kg dozun denendiği grupta ulaşılmıştır ($p<0,05$).

6.2 Öneriler

Bu çalışmadan elde edilen veriler ile birlikte aşağıdaki öneriler ön plana çıkmaktadır:

❖ Yeme ilave edilen 100 mg/kg oranında ısırgan otunun, araştırılan bağışıklık parametrelerinde genel bir artış sağladığı ve bu artışın gen ifadeleri ile de desteklendiği tespit edilmiş olup ($p<0,05$), *Vibrio (Listonella) anguillarum* bakterisine karşı %96 oranında önemli bir koruyucu etki sağlamıştır ($p<0,05$).

❖ Akçakesme etanolik özütünün ise, 100 mg/kg oranında yeme ilavesinin lizozim aktivitesini ve bazı sitokin gen yanıtlarını arttırdığı bununla birlikte doz arttıkça (200 ve 400 mg/kg) sitokin yanıtların ekspresyonlarının daha da arttığı tespit edilmiştir. Bu sebepten akçakesme bitkisi için ileride yapılabilecek yem ilavesi çalışmalarında daha yüksek doz denemeleri gerçekleştirilebilir.

❖ Aynı ayrı denemelerde gerçekleştirilmiş olan iki bitkinin etkilerine bakıldığında, ısırgan otunun gen ekspresyonu katlama değerlerine etkisinin akçakesmeye göre yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. Bu sebepten ısırgan

otunun çipura bağışıklık sistemine olan etkinliği bu çalışma sonucunda daha da ön plana çıkmıştır.

❖ Çipura yavrularının 100 mg/kg oranında ısırgan otu takviyesiyle beslenmesi neticesinde; *Vibrio (Listonella) anguillarum* bakterisine karşı yüksek koruyuculuk sağladığı bulunmuştur.

❖ Akçakesme veya ısırgan otu özütlerinin çalışılan dozlarda, çipura yavrularının hematolojik parametrelerinde olumsuz bir etki yaratmadığı ve bağışıklığa önemli katkı sağladığı bu amaçla güvenli bir şekilde kullanılabilceği düşünölmektedir.



KAYNAKLAR

- Aanyu, M., Betancor, M.B., & Monroig, O. (2018). Effects of dietary limonene and thymol on the growth and nutritional physiology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 488, 217-226.
- Abdellatief, S.A., Abdel Rahman, A.N., & Abdallah, F.D. (2018). Evaluation of Immunostimulant activity of Spirulina platensis (*Arthrospira platensis*) and Sage (*Salvia officinalis*) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Zagazig Veterinary Journal*, 46(1), 25-36.
- Abidin, Z.U., Hassan, H.U., Masood, Z., Rafique, N., Paray, B.A., Gabol, K., Zulfiqar, T. (2022). Effect of dietary supplementation of neem, Azadirachta indica leaf extracts on enhancing the growth performance, chemical composition and survival of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4), 3075-3081.
- Abós, B., Bailey, C., & Tafalla, C. (2022). Adaptive Immunity. In K. Buchmann & C. J. Secombes (Eds.), *Principles of Fish Immunology* (pp. 105-140). Switzerland: Springer.
- Acar, Ü., Kesbiç, O.S., Yılmaz, S., & Karabayır, A. (2018). Growth performance, haematological and serum biochemical profiles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with varying levels of lupin (*Lupinus albus*) meal. *Aquaculture Research*, 49(7), 2579-2586.
- Ahmadifar, E., Dawood, M.A., Moghadam, M.S., Sheikhzadeh, N., Hoseinifar, S.H., & Musthafa, M.S. (2019). Modulation of immune parameters and antioxidant defense in zebrafish (*Danio rerio*) using dietary apple cider vinegar. *Aquaculture*, 513, 734412.
- Ahmadifar, E., Pourmohammadi Fallah, H., Yousefi, M., Dawood, M.A., Hoseinifar, S.H., Adineh, H., Doan, H.V. (2021). The gene regulatory roles of herbal extracts on the growth, immune system, and reproduction of fish. *Animals*, 11(8), 2167.
- Ahmed, I., Reshi, Q.M., & Fazio, F. (2020). The influence of the endogenous and exogenous factors on hematological parameters in different fish species: a review. *Aquaculture International*, 28(3), 869-899.
- Ahmed, K.M., & Parsuraman, S. (2014). *Urtica dioica* L.,(Urticaceae): a stinging nettle. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 5(1), 6.
- Akira, S., Hirano, T., Taga, T., & Kishimoto, T. (1990). Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *The FASEB journal*, 4(11), 2860-2867.

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Molecular biology of the Cell ((New York: Garland Science Taylor & Francis Group). *Inc., ZDA.*
- Alibaşoğlu, M.Y., Tahsin. (1997). Kan ve Hemopoietic Sistem *Veteriner ve Sistemik Patoloji* (pp. 207-262).
- Almabrok, A.A., Amhamed, I.D., Mohamed, G.A., Bilen, S., & Altief, T.A.S. (2018). Effect of *Tilia tomentosa* methanolic extract on growth performance, digestive enzyme activity, immune response and haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio*). *Marine Science and Technology Bulletin*, 7(1), 12-20.
- Altunoglu, Y.C., Bilen, S., Ulu, F., & Biswas, G. (2017). Immune responses to methanolic extract of black cumin (*Nigella sativa*) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 103-109.
- Anderson, D.P. (1992). Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 281-307.
- Arda, M. (1985). *İmmunoloji*. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi.
- Arda, M., Seğer, S., & Sarıeyyüpoğlu, M. (2005). Balık hastalıkları, medisan yayın serisi: 61, II. *Baskı Medisan Yayınevi, Ankara.*
- Awad, E., & Austin, B. (2010). Use of lupin, *Lupinus perennis*, mango, *Mangifera indica*, and stinging nettle, *Urtica dioica*, as feed additives to prevent *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 33(5), 413-420.
- Awad, E., Austin, B., & Lyndon, A. (2012). Effect of dietary supplements on digestive enzymes and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of American Science*, 8(12), 858-864.
- Awad, E., & Awaad, A. (2017). Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 40-54.
- Awad, E., Awaad, A., & Esteban, M.A. (2015). Effects of dihydroquercetin obtained from deodar (*Cedrus deodara*) on immune status of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 43(1), 43-50.
- Awad, E., Cerezuela, R., & Esteban, M.Á. (2015b). Effects of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) immune status and growth performance. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2), 454-464.
- Ayan, A.K., alışkan, Ö., & ırak, C. (2006). Isırganotu (*Urtica* spp.)'nun ekonomik önemi ve tarımı. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. (Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi)*, 21(3), 357-363.
- Aydın, M., & Sözer, A. (2016). Presence of the gilthead seabream in the Black Sea. *Turkish Journal of Maritime and Marine Sciences*, 2(2), 104-110.

- Baba, E. (2017). Su ürünleri yetiştiriciliğinde bitkisel immunostimulant kullanımı. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 7(3), 249-256.
- Baba, E., Acar, Ü., Öntaş, C., Kesbiç, O.S., & Yılmaz, S. (2016). The use of *Avena sativa* extract against *Aeromonas hydrophila* and its effect on growth performance, hematological and immunological parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). *Italian Journal of Animal Science*, 15(2), 325-333.
- Baba, E., Acar, Ü., Yılmaz, S., Zemheri, F., & Ergün, S. (2018). Dietary olive leaf (*Olea europaea* L.) extract alters some immune gene expression levels and disease resistance to *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & Shellfish Immunology*, 79, 28-33.
- Bahi, A., Guardiola, F., Messina, C., Mahdhi, A., Cerezuela, R., Santulli, A., Esteban, M. (2017). Effects of dietary administration of fenugreek seeds, alone or in combination with probiotics, on growth performance parameters, humoral immune response and gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 60, 50-58.
- Balcı, B.A., & Aktop, Y. (2019). Yeme çakşır otu (*Ferula elaeochytris* k. 1947) ilavesinin Japon balığının (*Carassius auratus* l. 1758) büyüme ve gonad gelişimi üzerine etkisi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 9(1), 347-359.
- Ballero, M., & Fresu, I. (1993). Le piante di uso officinale nella Barbagia di Seui (Sardegna Centrale). *FITOTERAPIA-MILANO*-, 64, 141-141.
- Barka, A.B.A. (2019). *Akçakesme (Phillyrea latifolia) bitkisinin gökkuşağı alabalıklarının (Oncorhynchus mykiss) bağışıklık yanıtı üzerine etkilerinin belirlenmesi*. (Doktora tezi), Kastamonu Üniversitesi, Kastamonu.
- Başusta, G. (2005). Fish hematology and hematological techniques. *Research Techniques in Fish Biology (in Turkish)*. Nobel Publications, Ankara, 275, 300.
- Bauchot, M.L.H., J.C. (1986). Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean Tortonese (Ed.), *Sparidae* (Vol. 2, pp. 883-907). Paris: UNESCO.
- Bedford, M. (2000). Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimise subsequent problems. *World's Poultry Science Journal*, 56(4), 347-365.
- Bellakhdar, J. (1997). La pharmacopée traditionnelle marocaine (Moroccan Traditional pharmacopeia). Edited by Ibis Press. Paris (France).
- Beltrán, J.M.G., Silvera, D.G., Ruiz, C.E., Campo, V., Chupani, L., Faggio, C., & Esteban, M.Á. (2020). Effects of dietary *Origanum vulgare* on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) immune and antioxidant status. *Fish & Shellfish Immunology*, 99, 452-461.

- Berkarda, B., & Eyüboğlu, H. (1983). Hematoloji laboratuvar yöntemleri. *Ar Basım Yayım., İstanbul.*
- Bilen, S., Ali, G.A.M., Amhamed, I.D., & Almabrok, A.A. (2021a). Modulatory effects of laurel-leaf cistus (*Cistus laurifolius*) ethanolic extract on innate immune responses and disease resistance in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish & Shellfish Immunology*, 116, 98-106.
- Bilen, S., Altunoglu, Y.C., Ulu, F., & Biswas, G. (2016a). Innate immune and growth promoting responses to caper (*Capparis spinosa*) extract in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 57, 206-212.
- Bilen, S., Bulut, M., & Bilen, A.M. (2011). Immunostimulant effects of *Cotinus coggyria* on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 30(2), 451-455.
- Bilen, S., & Elbeshti, H.T.A.G. (2019a). A new potential therapeutic remedy against *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using tetra, *Cotinus coggyria*. *Journal of Fish Diseases*, 42(10), 1369-1381.
- Bilen, S., Filogh, A.M., Ali, A.B., Kenanoğlu, O.N., & Zoral, M.A. (2020b). Effect of common mallow (*Malva sylvestris*) dietary supplementation on growth performance, digestive enzyme activities, haematological and immune responses of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture International*, 28(1), 73-84.
- Bilen, S., Kenanoglu, O.N., Terzi, E., Ozdemir, R.C., & Sonmez, A.Y. (2019b). Effects of tetra (*Cotinus coggyria*) and common mallow (*Malva sylvestris*) plant extracts on growth performance and immune response in Gilthead Sea bream (*Sparus aurata*) and European Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 512, 734251.
- Bilen, S., Sirtiyah, A.M.A., & Terzi, E. (2019c). Therapeutic effects of beard lichen, *Usnea barbata* extract against *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 87, 401-409.
- Bilen, S., Ünal, S., & Güvensoy, H. (2016b). Effects of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and nettle (*Urtica dioica*) methanolic extracts on immune responses and resistance to *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 454, 90-94.
- Bjørngen, H., & Koppang, E.O. (2022). Anatomy of teleost fish immune structures and organs. *Principles of Fish Immunology*, 1-30.
- Blaxhall, P., & Daisley, K. (1973). Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of fish biology*, 5(6), 771-781.
- Boshra, H., Li, J., & Sunyer, J. (2006). Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 239-262.

- Bowden, T., Cook, P., & Rombout, J. (2005). Development and function of the thymus in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*, 19(5), 413-427.
- Bowden, T.J. (2008). Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(4), 373-383.
- Bricknell, I., & Dalmo, R.A. (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 19(5), 457-472.
- Buchmann, K. (1999). Immune mechanisms in fish skin against monogeneans-a model. *Folia Parasitologica*, 46(1), 1-8.
- Burdock, G.A., & Carabin, I.G. (2004). Generally recognized as safe (GRAS): history and description. *Toxicology letters*, 150(1), 3-18.
- Burnet, F.M. (1941). The Production of Antibodies. A Review and a Theoretical Discussion. *The Production of Antibodies. A Review and a Theoretical Discussion*.
- Candan, A., & Karataş, S. (2010). Balık Sağlığı. *Kalmak Ofset, İstanbul*.
- Carretero, C.R., Díaz Lanza, A.M., Matellano, L.F., Sánchezb, A.R., & Castillo, L.V. (2001). Phytochemical analysis of *Phillyrea latifolia* L., a new source of oleuropeoside. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 56(5-6), 353-356.
- Castellana, B., Iliev, D.B., Sepulcre, M.P., MacKenzie, S., Goetz, F.W., Mulero, V., & Planas, J.V. (2008). Molecular characterization of interleukin-6 in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Molecular immunology*, 45(12), 3363.
- Castro, R., & Tafalla, C. (2015). Overview of fish immunity *Mucosal health in aquaculture* (pp. 3-54): Elsevier.
- Chantanachookhin, C., Seikai, T., & Tanaka, M. (1991). Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. *Aquaculture*, 99(1-2), 143-155.
- Chaoui, L., Kara, M.H., Faure, E., & Quignard, J.P. (2006). Growth and reproduction of the gilthead seabream *Sparus aurata* in Mellah lagoon (north-eastern Algeria). *Scientia Marina*, 70(3), 545-552.
- Chettri, J.K., Raida, M.K., Holten-Andersen, L., Kania, P.W., & Buchmann, K. (2011). PAMP induced expression of immune relevant genes in head kidney leukocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental & Comparative Immunology*, 35(4), 476-482.
- Chrubasik, J.E., Roufogalis, B.D., Wagner, H., & Chrubasik, S.A. (2007). A comprehensive review on nettle effect and efficacy profiles, Part I: Herba urticae. *Phytomedicine*, 14(6), 423-435.
- Citarasu, T. (2010). Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18(3), 403-414.

- Cnaani, A., Tinman, S., Avidar, Y., Ron, M., & Hulata, G. (2004). Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oreochromis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O. niloticus*. *Aquaculture Research*, 35(15), 1434-1440.
- Colorni, A., & Padrós, F. (2011). Diseases and health management. *Sparidae*, 321-357.
- Costa, M.M., Maehr, T., Diaz-Rosales, P., Secombes, C.J., & Wang, T. (2011). Bioactivity studies of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-6: effects on macrophage growth and antimicrobial peptide gene expression. *Molecular immunology*, 48(15-16), 1903-1916.
- Cross, M., Mangelsdorf, I., Wedel, A., & Renkawitz, R. (1988). Mouse lysozyme M gene: isolation, characterization, and expression studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(17), 6232-6236.
- Çelik, E.Ş., Akbulut, M., Sağır Odabaşı, S., & Anıl Odabaşı, D. (2006). Farklı tür balıklarda hematolojik indekslerin referans değerleri.
- Çelik, S.Y. (2020). Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Balık Yetiştiriciliğinde Kullanım Potansiyelleri. *Menba Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 6(2), 86-94.
- Çöteli, F.T. (2020). Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü (TEPGE) (Vol. 317).
- Dalmo, R.A., & Bøgwald, J. (2022). Innate Immunity. In K. Buchmann & C. J. Secombes (Eds.), *Principles of Fish Immunology*. Switzerland. doi: 10.1007/978-3-030-85420-1
- Davis, L., & Kuttan, G. (2002). Effect of *Withania somnifera* on CTL activity. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 21(1), 115-118.
- Dawood, M.A., Metwally, A.E.-S., Elkomy, A.H., Gewaily, M.S., Abdo, S.E., Abdel-Razek, M.A., Abdel-Latif, H.M. (2020). The impact of menthol essential oil against inflammation, immunosuppression, and histopathological alterations induced by chlorpyrifos in Nile tilapia. *Fish & Shellfish Immunology*, 102, 316-325.
- Demers, N.E., & Bayne, C.J. (1997). The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental & Comparative Immunology*, 21(4), 363-373.
- Devkota, H.P., Paudel, K.R., Khanal, S., Baral, A., Panth, N., Adhikari-Devkota, A., Chellappan, D.K. (2022). Stinging nettle (*Urtica dioica* L.): Nutritional composition, bioactive compounds, and food functional properties. *Molecules*, 27(16), 5219.

- Dezfoulnejad, M.C., & Taravat, M. (2022). Use of dietary rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract as a growth promotor and immunostimulant in common carp. *Aquaculture Research*, 53(4), 1553-1562.
- Dikel, S. (2015). Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Büyüme Artırıcı Olarak Sarımsak (*Allium sativum*) Kullanımı. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 3(7), 529-536.
- Diker, K. (2005). İmmunoloji (2. Baskı). *Medisan, Ankara*, 304.
- Dominguez, D., Montero, D., Zamorano, M.J., Castro, P., Fontanillas, R., Prabhu, P.A.J., & Izquierdo, M. (2021). Effects of vitamin D3 supplementation in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles fed diets high in plant based feedstuffs. *Aquaculture*, 543, 736991.
- Dong, C. (2008). TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nature Reviews Immunology*, 8(5), 337-348.
- Durmaz, Y. (2016). Balıklarda Viral Enfeksiyonlara Karşı İmmun Sistemin İşleyişi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 11(3), 355-363.
- Dügenci, S.K., Arda, N., & Candan, A. (2003). Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(1), 99-106.
- Eder, C. (2009). Mechanisms of interleukin-1 β release. *Immunobiology*, 214(7), 543-553.
- Enane, N., Frenkel, K., O'connor, J., Squibb, K., & Zelikoff, J. (1993). Biological markers of macrophage activation: applications for fish phagocytes. *Immunology*, 80(1), 68.
- Fänge, R. (1986). Lymphoid organs in sturgeons (Acipenseridae). *Veterinary immunology and immunopathology*, 12(1-4), 153-161.
- Fänge, R., & Nilsson, S. (1985). The fish spleen: structure and function. *Experientia*, 41(2), 152-158.
- FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Retrieved 19 Jun, 2020, from <http://https://www.fao.org/3/ca9229en/CA9229EN.pdf>
- Fazio, F. (2019). Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: a review. *Aquaculture*, 500, 237-242.
- Fazio, F., Marafioti, S., Arfuso, F., Piccione, G., & Faggio, C. (2013). Comparative study of the biochemical and haematological parameters of four wild Tyrrhenian fish species. *Veterinárni medicína*, 58(11), 576-581.
- Fazio, F., Marafioti, S., Arfuso, F., Piccione, G., & Faggio, C. (2013). Influence of different salinity on haematological and biochemical parameters of the widely

- cultured mullet, *Mugil cephalus*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 46(4), 211-218.
- Fearon, D.T., & Locksley, R.M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 272(5258), 50-54.
- Fernandez, M., Saenz, M., & Garcia, M. (1998). Anti-inflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50(10), 1183-1186.
- Field, J.B., Elvehjem, C., & Juday, G. (1943). A study of the blood constituents of carp and trout. *Journal of Biological Chemistry*, 148, 261-269.
- Flajnik, M.F. (1998). Churchill and the immune system of ectothermic vertebrates. *Immunological reviews*, 166(1), 5-14.
- Francescon, A.B., A.; La Rocca, A.; Bertaggia, R. (1987). Feeding habits of *Sparus aurata* as determined by numerical and gravimetric method. *Archivio di Oceanografia e Limnologia*, 21(1), 45-62.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P., & Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *British journal of Nutrition*, 88(6), 587-605.
- Francis, G., Makkar, H., & Becker, K. (2001). Effects of cyclic and regular feeding of a Quillaja saponin supplemented diet on growth and metabolism of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 24(4), 343-350.
- Fu, Y.-W., Hou, W.-Y., Yeh, S.-T., Li, C.-H., & Chen, J.-C. (2007). The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 22(6), 673-685.
- Gabriel, U.U., Akinrotimi, O.A., & Esemokumo, F. (2011). Haematological Responses of Wild Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* after Acclimation to Captivity. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 4(4).
- Ganter, U., Arcone, R., Toniatti, C., Morrone, G., & Ciliberto, G. (1989). Dual control of C-reactive protein gene expression by interleukin-1 and interleukin-6. *The EMBO journal*, 8(12), 3773-3779.
- Ghosh, K., Ray, A.K., & Ringø, E. (2019). Applications of plant ingredients for tropical and subtropical freshwater finfish: possibilities and challenges. *Reviews in Aquaculture*, 11(3), 793-815.
- Gorczynski, R., & Stanley, J. (1999). *Clinical Immunology*. Texas: Landes Bioscience.
- Gourley, T.S., Wherry, E.J., Masopust, D., & Ahmed, R. (2004). *Generation and maintenance of immunological memory*. Paper presented at the Seminars in immunology.

- Göktaş, Ö., & Gıdık, B. (2019). Tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanım alanları. *Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2(1), 145-151.
- Grauso, L., de Falco, B., Lanzotti, V., & Motti, R. (2020). Stinging nettle, *Urtica dioica* L.: Botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews*, 19, 1341-1377.
- Guardiola, F., Bahi, A., & Esteban, M. (2018). Effects of dietary administration of fenugreek seeds on metabolic parameters and immune status of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 74, 372-379.
- Haghighi, M., & Rohani, M.S. (2015). Non-specific immune responses and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with *Origanum vulgare* extract diets. *Am. Adv. J. Biol. Sci*, 1, 1-9.
- Hakverdi, A.E., & Yiğit, N. (2017). Yozgat-Akdağmadeni yöresinde bulunan bazı tıbbi ve aromatik bitkiler. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 19(2), 82-87.
- Hansen, J.D., & Zapata, A.G. (1998). Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunological reviews*, 166(1), 199-220.
- Hansen, K., Adsersen, A., Christensen, S.B., Jensen, S.R., Nyman, U., & Smitt, U.W. (1996). Isolation of an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor from *Olea europaea* and *Olea lancea*. *Phytomedicine*, 2(4), 319-325.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., & Heo, M.-S. (2011a). Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317(1-4), 1-15.
- Heath, A. (1987). Behavior and nervous system function. *Water pollution and fish physiology*, 181-196.
- Heath, A.G. (2018). *Water pollution and fish physiology*: CRC press.
- Hettiarachchi, M., Pathirage, S., & Hettiarachchi, D. (2005). Isolation of the bacterium, *Vibrio harveyi* from cultured shrimp, *Penaeus monodon* and production of vaccines against the bacterium.
- Hikima, S., Hikima, J.-i., Rojtinnakorn, J., Hirono, I., & Aoki, T. (2003). Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene*, 316, 187-195.
- Hirokawa, K., Utsuyama, M., & Kobayashi, S. (1998). Hypothalamic control of development and aging of the thymus. *Mechanisms of ageing and development*, 100(2), 177-185.
- Hjeltnes, B.R., R.J. . (1993). Vibriosis. In R. J. B. Inglis. V.; Roberts, N.R. (Ed.), *Bacterial diseases of fish* (pp. 109-121). New York: Halsted Press.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway Jr, C.A., & Ezekowitz, R. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284(5418), 1313-1318.

- Holland, M.C.H., & Lambris, J.D. (2002). The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology*, 12(5), 399-420.
- Hong, S., Li, R., Xu, Q., Secombes, C.J., & Wang, T. (2013). Two types of TNF- α exist in teleost fish: phylogeny, expression, and bioactivity analysis of type-II TNF- α 3 in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *The Journal of Immunology*, 191(12), 5959-5972.
- Hoseinifar, S.H., Shakouri, M., Yousefi, S., Van Doan, H., Shafiei, S., Yousefi, M., Faggio, C. (2020). Humoral and skin mucosal immune parameters, intestinal immune related genes expression and antioxidant defense in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed olive (*Olea europea* L.) waste. *Fish & Shellfish Immunology*, 100, 171-178.
- Hoseinifar, S.H., Zou, H.K., Van Doan, H., Kolangi Miandare, H., & Hoseini, S.M. (2018). Evaluation of some intestinal cytokines genes expression and serum innate immune parameters in common carp (*Cyprinus carpio*) fed dietary loquat (*Eriobotrya japonica*) leaf extract. *Aquaculture Research*, 49(1), 120-127.
- Hoşsu, B., Korkut, A., & Fırat, A. (2003). Balık besleme ve yem teknolojisi I (Balık Besleme Fizyolojisi ve Biyokimyası). *Baskı, Ege Üni., Su Ürünleri Fak. Yay*, 276.
- Houston, A.H. (1997). Are the classical hematological variables acceptable indicators of fish health? *Transactions of the American Fisheries Society*, 126(6), 879-894.
- Hussain, T.A., M.; Khan, S.; Satar, H.; Qureshi M.S. (2011). In Vitro screening of methanol plant extracts for their antibacterial activity. *Pak. J. Bot.*, 43, 531-538.
- Ihut, A., Raducu, C., Lațiu, C., Cocan, D., Uiuu, P., & Miresan, V. (2018). The influence of season variation on hematological parameters and oxidative stress for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 75(1), 11-15.
- Ina-Salwany, M., Al-saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F.A., Mohd-Aris, A., Amal, M., Zamri-Saad, M. (2019). Vibriosis in fish: a review on disease development and prevention. *Journal of Aquatic Animal Health*, 31(1), 3-22.
- Inglis, V., Roberts, R.J., & Bromage, N.R. (1993). Bacterial diseases of fish.
- Jamalzadeh, H.R., & Ghomi, M.R. (2009). Hematological parameters of Caspian salmon *Salmo trutta caspius* associated with age and season. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 42(1), 81-87.
- Jamroz, D. (2002). Plant extracts enhance broiler performance. *Journal of Animal Science*, 80(1), 41.

- Jang, S.I., Hardie, L.J., & Secombes, C.J. (1995). Elevation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* macrophage respiratory burst activity with macrophage-derived supernatants. *Journal of leukocyte biology*, 57(6), 943-947.
- Karaman, Z., & Dörücü, M. (2017). Balıklarda bağışıklık sistemi organları ve histolojisi. *International Journal of Pure and Applied Sciences*, 3(1), 65-74.
- Karaman, Z., & Yüngül, M. (2014). Balıklarda beslenme hastalıkları ve tedavi yöntemleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*(2), 23-28.
- Karimi, S., Kochinian, P., & Salati, A. (2013). The effect of sexuality on some haematological parameters of the yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus* in Persian Gulf. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 14(1), 65-68.
- Kaviarasan, S., Naik, G., Gangabhairathi, R., Anuradha, C., & Priyadarsini, K. (2007). In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds. *Food Chemistry*, 103(1), 31-37.
- Khalafalla, M. (2009). Utilization of some med oreochromis niloticus ical plants as feed additives for Nile Tilapia, *Oreochromis Niloticus*, Feeds. *Mediterranean Aquaculture Journal*, 2(1), 9-18.
- Kilercioğlu, S. (2021). Balıklarda bağışıklık sistemi, mukozal bağışıklık ve IL-1 β , IL-18 ve TNF- α proenflamatuvar sitokinlerinin işlevleri. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38(1), 125-134.
- Kinoshita, S., Biswas, G., Kono, T., Hikima, J., & Sakai, M. (2014). Presence of two tumor necrosis factor (tnf)- α homologs on different chromosomes of zebrafish (*Danio rerio*) and medaka (*Oryzias latipes*). *Marine genomics*, 13, 1-9.
- Kocabatmaz, M., & Ekingen, G. (1977). Preliminary investigations on some hematological norms in five freshwater fish species. *Firat Üniv. Vet. Fak. Derg*, 4(1-2), 28-40.
- Kono, T., Takayama, H., Nagamine, R., Korenaga, H., & Sakai, M. (2013). Establishment of a multiplex RT-PCR assay for the rapid detection of fish cytokines. *Veterinary immunology and immunopathology*, 151(1-2), 90-101.
- Korkut, A.Y., Kop, A., Demirtaş, N., & Cihaner, A. (2007). Balık Beslemede Gelişim Performansının İzlenme Yöntemleri. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 24(1), 201-205.
- Kumari, J., & Sahoo, P.K. (2006). Dietary levamisole modulates the immune response and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Aquaculture Research*, 37(5), 500-509.
- Lakwani, M.A., Kenanoğlu, O.N., Taştan, Y., & Bilen, S. (2022). Effects of black mustard (*Brassica nigra*) seed oil on growth performance, digestive enzyme activities and immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 53(1), 300-313.

- Lee, J.Y., & Gao, Y. (2012). Review of the application of garlic, *Allium sativum*, in aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43(4), 447-458.
- Lee, K.J., Dabrowski, K., Rinchar, J., Gomez, C., Guz, L., & Vilchez, C. (2004). Supplementation of maca (*Lepidium meyenii*) tuber meal in diets improves growth rate and survival of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) alevins and juveniles. *Aquaculture Research*, 35(3), 215-223.
- Leonardi, M., & Klempau, A. (2003). Artificial photoperiod influence on the immune system of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Southern Hemisphere. *Aquaculture*, 221(1-4), 581-591.
- Lewis, S.M., Bain, B., & Bates, I. (2006). Reference ranges and normal values. *Dacie and Lewis practical haematology*, 10, 11-21.
- Lie, Ø., Evensen, Ø., Sorensen, A., & Froysadal, E. (1989). Study on lysozyme activity in some fish species. *Diseases of aquatic organisms*, 6(1), 1-5.
- Lie, Ø., Lied, E., & Lambertsen, G. (1989). Haematological values and fatty acid composition of erythrocyte phospholipids in cod (*Gadus morhua*) fed at different water temperatures. *Aquaculture*, 79(1-4), 137-144.
- Lim, C., & Klesius, P.H. (2003). Influence of feed deprivation on hematology, macrophage chemotaxis, and resistance to *Edwardsiella ictaluri* challenge of channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15(1), 13-20.
- Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine & growth factor reviews*, 22(4), 189-195.
- Lusková, V.r. (1997). Annual cycles and normal values of hematological parameters in fishes.
- Lydyard, P., Whelan, A., & Fanger, M. (2013). *Immunology* (O. ERGANİŞ & U. S. UÇAN, Trans.): Garland Science.
- MacArthur, J.I., & Fletcher, T.C. (1985). Phagocytosis in fish *Fish immunology* (pp. 29-46): Elsevier.
- Magnadóttir, B. (1998). Comparison of immunoglobulin (IgM) from four fish species. *Icel. Agric. Sci*, 12, 47-59.
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 137-151.
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D.B., & Roitt, I. (2006). *Immunology* (T. İmir, Trans. 7th Edition ed.): Elsevier Limited.
- Manley, N.R. (2000). Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation. Paper presented at the Seminars in immunology.

- Mathlouthi, F. (2008). Effect of feeding gilthead seabream (*Sparus aurata*) with vegetable lipid sources on Cytokines gene expression: INF α and IL-1 β .
- Mayer, S. (1998). A review of the scientific justifications for maintaining cetaceans in captivity: Citeseer.
- Mehrabi, Z., Firouzbakhsh, F., Rahimi-Mianji, G., & Paknejad, H. (2020). Immunity and growth improvement of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed dietary nettle (*Urtica dioica*) against experimental challenge with *Saprolegnia parasitica*. *Fish & Shellfish Immunology*, 104, 74-82.
- Memiş, D. (2006). *Deniz Balıkları Yetiştiriciliği Ders Kitabı*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları.
- Merzouki, A., Ed-Derfoufi, F., El Aallali, A., & Molero-Mesa, J. (1997). Wild medicinal plants used by local Bouhmed population (Morocco). *Fitoterapia (Milano)*, 68(5), 444-460.
- Metin, S., Diler, Ö., & Hakan, D. (2018). Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Tıbbi Bitkilerin Anestezik Olarak Kullanımı. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 14(4), 351-356.
- Midhun, S.J., Arun, D., Edatt, L., Sruthi, M., Thushara, V., Oommen, O.V., . . . Divya, L. (2016). Modulation of digestive enzymes, GH, IGF-1 and IGF-2 genes in the teleost, Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) by dietary curcumin. *Aquaculture International*, 24(5), 1277-1286.
- Mishra, L.-C., Singh, B.B., & Dagenais, S. (2000). Scientific basis for the therapeutic use of *Withania somnifera* (ashwagandha): a review. *Alternative medicine review*, 5(4), 334-346.
- Mohamed, G.A., Amhamed, I.D., Almabrok, A.A., Barka, A.B.A., Bilen, S., & Elbeshti, R.T. (2018). Effect of celery (*Apium graveolens*) extract on the growth, haematology, immune response and digestive enzyme activity of common carp (*Cyprinus carpio*). *Marine Science and Technology Bulletin*, 7(2), 51-59.
- Montero, D., Mathlouthi, F., Tort, L., Afonso, J., Torrecillas, S., Fernández-Vaquero, A., Izquierdo, M. (2010). Replacement of dietary fish oil by vegetable oils affects humoral immunity and expression of pro-inflammatory cytokines genes in gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(6), 1073-1081.
- Moore, G.W.K., G.; Blann, A.D. (2016). *Haematology*: Oxford.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*, 19, 683.
- Mori, N.C., Michelotti, B.T., da Silva Pês, T., Bressan, C.A., Sutili, F., Kreutz, L.C., Cerqueira, V.R. (2019). Citral as a dietary additive for *Centropomus*

- undecimalis juveniles: Redox, immune innate profiles, liver enzymes and histopathology. *Aquaculture*, 501, 14-21.
- Murray, R., Mayes, P., Granner, D., & Rodwell, V. (1993). Harper'in biyokimyası. *Çevirenler: Prof. Dr. Gülriz Mentec, Prof. Dr. Biltan Ersöz. Barıs Kitabevi.*
- Mwitari, P.G., Ayeka, P.A., Ondicho, J., Matu, E.N., & Bii, C.C. (2013). Antimicrobial activity and probable mechanisms of action of medicinal plants of Kenya: *Withania somnifera*, *Warbugia ugandensis*, *Prunus africana* and *Plectrunthus barbatus*. *PLoS One*, 8(6), e65619.
- Naiel, M.A., Ismael, N.E., Negm, S.S., Ayyat, M.S., & Al-Sagheer, A.A. (2020). Rosemary leaf powder-supplemented diet enhances performance, antioxidant properties, immune status, and resistance against bacterial diseases in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 526, 735370.
- Naka, T., Nishimoto, N., & Kishimoto, T. (2002). The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Research & Therapy*, 4(3), 1-10.
- Namdeo, A.G. (2018). Cultivation of medicinal and aromatic plants *Natural products and drug discovery* (pp. 525-553): Elsevier.
- Nazri, N.M., Ahmat, N., Adnan, A., Mohamad, S.S., & Ruzaina, S.S. (2011). In vitro antibacterial and radical scavenging activities of Malaysian table salad. *African Journal of Biotechnology*, 10(30), 5728-5735.
- Nudo, L.P., & Catap, E.S. (2011). Immunostimulatory effects of *Uncaria perrottetii* (A. Rich.) Merr.(Rubiaceae) vinebark aqueous extract in Balb/C mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 613-620.
- Ocak, F. (2006). Balıklarda Lenfoid organlar ve immun sistemin özellikleri. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 3(1), 61-66.
- Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., & Hymowitz, S.G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual review of immunology*, 29, 71-109.
- Paray, B.A., Hoseini, S.M., Hoseinifar, S.H., & Van Doan, H. (2020). Effects of dietary oak (*Quercus castaneifolia*) leaf extract on growth, antioxidant, and immune characteristics and responses to crowding stress in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 524, 735276.
- Park, S.-J., Nakagawa, T., Kitamura, H., Atsumi, T., Kamon, H., Sawa, S.-i., Ishihara, K. (2004). IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *The Journal of Immunology*, 173(6), 3844-3854.
- Pastoret, P.-P., Griebel, P., Bazin, H., & Govaerts, A. (1998). *Handbook of vertebrate immunology*: Academic Press.
- Pavlidis, M.A., & Mylonas, C.C. (2011). Sparidae: Biology and aquaculture of gilthead sea bream and other species: John Wiley & Sons.

- Pérez-Cordón, G., Estensoro, I., Benedito-Palos, L., Calduch-Giner, J.A., Sitjà-Bobadilla, A., & Pérez-Sánchez, J. (2014). Interleukin gene expression is strongly modulated at the local level in a fish–parasite model. *Fish & Shellfish Immunology*, 37(2), 201-208.
- Perlmutter, D.H., Dinarello, C.A., Punsal, P.I., & Colten, H.R. (1986). Cachectin/tumor necrosis factor regulates hepatic acute-phase gene expression. *The Journal of clinical investigation*, 78(5), 1349-1354.
- Pieroni, A., Pachaly, P., Huang, Y., Van Poel, B., & Vlietinck, A. (2000). Studies on anti-complementary activity of extracts and isolated flavones from *Ligustrum vulgare* and *Phillyrea latifolia* leaves (Oleaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 70(3), 213-217.
- Plouffe, D.A., Hanington, P.C., Walsh, J.G., Wilson, E.C., & Belosevic, M. (2005). Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation*, 12(4), 266-277.
- Ponce-Monter, H., Fernández-Martínez, E., Ortiz, M.I., Ramírez-Montiel, M.L., Cruz-Elizalde, D., Pérez-Hernández, N., & Cariño-Cortés, R. (2010). Spasmolytic and anti-inflammatory effects of *Aloysia triphylla* and citral, in vitro and in vivo studies. *Journal of smooth muscle research*, 46(6), 309-319.
- Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Litinas, K., & Geromichalos, G. (2014). Novel cinnamic acid derivatives as antioxidant and anticancer agents: Design, synthesis and modeling studies. *Molecules*, 19(7), 9655-9674.
- Poppenga, R.H. (2002). Herbal medicine: potential for intoxication and interactions with conventional drugs. *Clinical techniques in small animal practice*, 17(1), 6-18.
- Post, G. (1987). *Textbook of Fish Health*. Neptune City, USA: T.F.H. Publications, Inc.
- Press, C.M., & Evensen, Ø. (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & Shellfish Immunology*, 9(4), 309-318.
- Quade, M.J., & Roth, J.A. (1997). A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Veterinary immunology and immunopathology*, 58(3-4), 239-248.
- Rairakhwada, D., Pal, A., Bhathena, Z., Sahu, N., Jha, A., & Mukherjee, S. (2007). Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish & Shellfish Immunology*, 22(5), 477-486.
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., & Sasal, P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. *Aquaculture*, 433, 50-61.

- Reyes-Cerpa, S., Maisey, K., Reyes-López, F., Toro-Ascuy, D., Sandino, A.M., & Imarai, M. (2012). Fish cytokines and immune response. *New advances and contributions to fish biology, 1*.
- Roberts, R.J. (1978). *Fish Pathology*. London: Bailliere-Tindall.
- Roca, F.J., Mulero, I., López-Muñoz, A., Sepulcre, M.P., Renshaw, S.A., Meseguer, J., & Mulero, V. (2008). Evolution of the inflammatory response in vertebrates: fish TNF- α is a powerful activator of endothelial cells but hardly activates phagocytes. *The Journal of Immunology, 181*(7), 5071-5081.
- Rombout, J., Huttenhuis, H., Picchiatti, S., & Scapigliati, G. (2005). Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology, 19*(5), 441-455.
- Rossolini, G.M., Arena, F., Pecile, P., & Pollini, S. (2014). Update on the antibiotic resistance crisis. *Current opinion in pharmacology, 18*, 56-60.
- Rutto, L.K., Xu, Y., Ramirez, E., & Brandt, M. (2013). Mineral properties and dietary value of raw and processed stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *International journal of food science, 2013*.
- Saeidi, M.R., Adel, M., Caipang, C.M.A., & Dawood, M.A. (2017). Immunological responses and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles following dietary administration of stinging nettle (*Urtica dioica*). *Fish & Shellfish Immunology, 71*, 230-238.
- Safari, R., Hoseinifar, S.H., Imanpour, M.R., Mazandarani, M., Sanchouli, H., & Paolucci, M. (2020). Effects of dietary polyphenols on mucosal and humoral immune responses, antioxidant defense and growth gene expression in beluga sturgeon (*Huso huso*). *Aquaculture, 528*, 735494.
- Said, A.A.H., Otmani, I., Derfoufi, S., & Benmoussa, A. (2015). Highlights on nutritional and therapeutic value of stinging nettle (*Urtica dioica*). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 7*(10), 8-14.
- Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture, 172*(1-2), 63-92.
- Sakai, M., Hikima, J.-i., & Kono, T. (2021). Fish cytokines: current research and applications. *Fisheries Science, 87*, 1-9.
- Saleh, N.E., Michael, F.R., & Toutou, M.M. (2015). Evaluation of garlic and onion powder as phyto-additives in the diet of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *The Egyptian Journal of Aquatic Research, 41*(2), 211-217.
- Salomón, R., Firmino, J.P., Reyes-López, F.E., Andree, K.B., González-Silvera, D., Esteban, M.A., Vallejos-Vidal, E. (2020). The growth promoting and immunomodulatory effects of a medicinal plant leaf extract obtained from *Salvia officinalis* and *Lippia citriodora* in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture, 524*, 735291.

- Santos, L., & Ramos, F. (2016). Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes: A review. *Trends in food science & technology*, 52, 16-30.
- Santoso, U., Lee, M.C., & Nan, F.H. (2013). Effects of dietary katuk leaf extract on growth performance, feeding behavior and water quality of grouper *Epinephelus coioides*. *Aceh International Journal of Science and Technology*, 2(1), 17-25.
- Saraiva, M., & O'garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 170-181.
- Saurabh, S., & Sahoo, P. (2008). Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 39(3), 223-239.
- Scapigliati, G., Buonocore, F., & Mazzini, M. (2006). Biological activity of cytokines: an evolutionary perspective. *Current pharmaceutical design*, 12(24), 3071-3082.
- Secombes, C. (1996). The nonspecific immune system: cellular defenses. *The fish immune system: organism, pathogen and environment*, 15, 63-103.
- Secombes, C., & Wang, T. (2012). The innate and adaptive immune system of fish *Infectious disease in aquaculture* (pp. 3-68): Elsevier.
- Sellon, R.K., Tonkonogy, S., Schultz, M., Dieleman, L.A., Grenther, W., Balish, E., Sartor, R.B. (1998). Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infection and immunity*, 66(11), 5224-5231.
- Shakoori, A.R., Iqbal, M.J., Mughal, A.L., & Ali, S.S. (1991). Drastic biochemical changes following 48 hours of exposure of Chinese grass carp *Ctenopharyngodon idella*, to sublethal doses of mercuric chloride. Paper presented at the Proc 1. Symp. Fish & Fisheries, Pakistan.
- Shalaby, A., Khattab, Y., & Abdel Rahman, A. (2006). Effects of Garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 12, 172-201.
- Shanthi Sree, K., Yasodamma, N., & Paramageetham, C. (2010). Phytochemical screening and invitro antibacterial activity of the methanolic leaf extract: *Sebastiania chamaelea* Muell. Arg. *The Bioscan*, 5, 173-175.
- Silva-Angulo, A., Zanini, S., Rosenthal, A., Rodrigo, D., Klein, G., & Martínez, A. (2015). Combined effect of carvacrol and citral on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* and on the occurrence of damaged cells. *Food Control*, 53, 156-162.
- Song, Q., Xiao, Y., Xiao, Z., Liu, T., Li, J., Li, P., & Han, F. (2021). Lysozymes in Fish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(50), 15039-15051.

- Sova, M. (2012). Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 12(8), 749-767.
- Sönmez, A.Y., Bilen, S., Alak, G., Hisar, O., Yanık, T., & Biswas, G. (2015). Growth performance and antioxidant enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed diets supplemented with sage, mint and thyme oils. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(1), 165-175.
- Sönmez, A.Y., Bilen, S., Taştan, Y., Kenanoğlu, O.N., & Terzi, E. (2022). Effects of dietary *Astragalus caudiculosus* (Boiss & Huet, 1856) supplementation on growth, hematology, antioxidant enzyme activities, and immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Fish & Shellfish Immunology*, 122, 366-375.
- Stasiak, S.A., & Baumann, P.C. (1996). Neutrophil activity as a potential bioindicator for contaminant analysis. *Fish & Shellfish Immunology*, 6(7), 537-539.
- Studnicka, M., & Kazun, K. (1993). Nonspecific defence barriers and mechanisms in fish. *Fish diseases diagnosis and preventious methods.–Olsztyn: Wydawnictwo IRS*, 105-111.
- Sugamata, R., Suetake, H., Kikuchi, K., & Suzuki, Y. (2009). Teleost B7 expressed on monocytes regulates T cell responses. *The Journal of Immunology*, 182(11), 6799-6806.
- Tavares-Dias, M., & de Moraes, F.R. (2004). *Hematologia de peixes teleósteos: Marcos Tavares-Dias*.
- Terzi, E., Kucukkosker, B., Bilen, S., Kenanoglu, O.N., Corum, O., Özbek, M., & Parug, S.S. (2021). A novel herbal immunostimulant for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Yersinia ruckeri*. *Fish & Shellfish Immunology*, 110, 55-66.
- Timur, G. (2008). *Balık anatomisi*. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım.
- Toledo-Ibarra, G.A., Rojas-Mayorquín, A.E., & Girón-Pérez, M.I. (2013). Influence of the cholinergic system on the immune response of teleost fishes: potential model in biomedical research. *Clinical and developmental immunology*, 2013.
- Tolon, M.T. (2019). Türkiye Su Ürünleri Ekonomisinin Tarihsel Gelişimi ve Gelecek Vizyonu In B. Y. Bekir Pakdemirli, Nedim Koşum, Zülfikar Bayraktar (Ed.), *Türkiye’de Geçmişten Günümüze Tarım Politikaları ve Ekonomisi* (Vol. 1, pp. 283-298): Akçağ Yayınevi.
- Tort, L., Puigcerver, M., Crespo, S., & Padrós, F. (2002). Cortisol and haematological response in sea bream and trout subjected to the anaesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. *Aquaculture Research*, 33(11), 907-910.
- Tripathi, N.K., Latimer, K.S., & Burnley, V.V. (2004). Hematologic reference intervals for koi (*Cyprinus carpio*), including blood cell morphology, cytochemistry, and ultrastructure. *Veterinary Clinical Pathology*, 33(2), 74-83.

- Tung, J.-P., Fraser, J.F., Wood, P., & Fung, Y.L. (2009). Respiratory burst function of ovine neutrophils. *BMC immunology*, 10(1), 1-11.
- TÜİK. (2022). Su Ürünleri, 2021. Retrieved Haziran, 2022, from <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Su-Urunleri-2021-45745>
- Uluköy, G., Kubilay, A., Didinen, B.I., Metin, S., Altun, S., Diler, Ö., Dulluç, A. (2018). Immunostimulant effects of geophyte plant extract on non-specific defence mechanisms of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*, 4(1), 36-41.
- Van Hai, N. (2015). The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. *Aquaculture*, 446, 88-96.
- Vaseeharan, B., & Thaya, R. (2014). Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquaculture International*, 22(3), 1079-1091.
- Vázquez, G.R., & Guerrero, G. (2007). Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue and cell*, 39(3), 151-160.
- Verburg-Van Kemenade, B.L., Stolte, E.H., Metz, J.R., & Chadzinska, M. (2009). Neuroendocrine-immune interactions in teleost fish. *Fish physiology*, 28, 313-364.
- Visioli, F., Bellosta, S., & Galli, C. (1998). Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life sciences*, 62(6), 541-546.
- Vosylienė, M.Z. (1999). The effect of heavy metals on haematological indices of fish (survey). *Acta Zoologica Lituanica*, 9(2), 76-82.
- Wang, T., & Secombes, C.J. (2013). The cytokine networks of adaptive immunity in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 1703-1718.
- Wassef, E., & Eisawy, A. (1985). Food and feeding habits of wild and reared glithead bream *Sparus aurata* L. *Cybiurn (Paris)*, 9(3), 233-242.
- Welman, M. (2011). National Herbarium, Pretoria. 11/11/2022, from www.plantzafrica.com
- Wen, C., Gan, N., Zeng, T., Zhang, N., Zhou, H., Zhang, A., & Wang, X. (2020). Regulation of Il-10 gene expression by Il-6 via Stat3 in grass carp head kidney leucocytes. *Gene*, 741, 144579.
- Wink, M. (2004). Evolution of toxins and antinutritional factors in plants with special emphasis on Leguminosae. *Poisonous plants and related toxins*, 1-25.

- Witeska, M., Dudyk, J., & Jarkiewicz, N. (2015). Haematological effects of 2-phenoxyethanol and etomidate in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 42(5), 537-546.
- Wittamer, V., Bertrand, J.Y., Gutschow, P.W., & Traver, D. (2011). Characterization of the mononuclear phagocyte system in zebrafish. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 117(26), 7126-7135.
- Wu, T., Jiang, Q., Wu, D., Hu, Y., Chen, S., Ding, T., Chen, J. (2019). What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review. *Food Chemistry*, 274, 698-709.
- Yazdi, F.G., Soleimani-Zad, S., van den Worm, E., & Folkerts, G. (2019). Turmeric extract: potential use as a prebiotic and anti-inflammatory compound? *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(3), 293-299.
- Yiğitarlan, K.D., Azdural, K., Yavuz, U., & Turan, F. (2011). Alabalıklarda fitoterapi uygulamaları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*(1), 63-68.
- Yılmaz, E., Çoban, D., Kırım, B., & Güler, M. (2019). Effects of extracts of feed additives including rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and aloe vera (*Aloe barbadensis*) on the growth performance and feed utility of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(6), 866-870.
- Yılmaz, E., Genc, M.A., Cek, S., Mazlum, Y., & Genc, E. (2006). Effects of orally administered *Ferula coskunii* (Apiaceae) on growth, body composition and histology of common carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 5(12), 1236-1238.
- Yılmaz, S. (2017). *Sinnamik Asit veya Bacillus subtilis'in Gökkuşluğu Alabalığı Yemlerinde Kullanımının Büyüme Performansı ve Bazı Bağışıklık Parametreleri Üzerine Etkisi*. (PhD.), Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale (457052)
- Yılmaz, S. (2020). *Balık İmmunolojisi Analiz Yöntemleri* (Vol. 1). Edirne: Paradigma Akademi Yayınları.
- Yılmaz, S., Ergun, S., & Yigit, M. (2011). Effects of thyme, rosemary and fenugreek on some hematological and immunological parameters of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture. Europe, Conferince*, 18-21.
- Yılmaz, S., & Ergün, S. (2018). Trans-cinnamic acid application for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): I. Effects on haematological, serum biochemical, non-specific immune and head kidney gene expression responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 78, 140-157.
- Yılmaz, S., Ergün, S., & Çelik, E.Ş. (2016). Effect of dietary spice supplementations on welfare status of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 86(1), 229-237.

- Yilmaz, S., Ergün, S., Yigit, M., Yilmaz, E., & Ahmadifar, E. (2020). Dietary supplementation of black mulberry (*Morus nigra*) syrup improves the growth performance, innate immune response, antioxidant status, gene expression responses, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, *107*, 211-217.
- Zapata, A., & Amemiya, C. (2000). Phylogeny of lower vertebrates and their immunological structures. *Origin and evolution of the vertebrate immune system*, 67-107.
- Zare, M., Esmaeili, N., Paolacci, S., & Stejskal, V. (2023). Nettle (*Urtica dioica*) additive as a growth promoter and immune stimulator in fish. *Aquaculture nutrition*, 2023.
- Zemheri-Navruz, F., Acar, Ü., & Yılmaz, S. (2019). Dietary supplementation of olive leaf extract increases haematological, serum biochemical parameters and immune related genes expression level in common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish & Shellfish Immunology*, *89*, 672-676.
- Zhang, J.-M., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation and pain. *International anesthesiology clinics*, *45*(2), 27.
- URL-1. Çipura (*Sparus aurata*) balığı. 25.05.2023, <https://www.turbosquid.com/3d-models/gilthead-bream-model-1224635>.
- URL-2. Çipura Yetiştiriciliği. 14/04/2022, from <http://www.atillaalpbaz.com>
- URL-3. Akçakesme. 25.05.2023, <https://tr.wikipedia.org/wiki/Ak%C3%A7akesme>
- URL-4. Mock privet. 25.05.2023, from <https://www.britannica.com/plant/ash-tree>