

**T.C.  
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK ARDIÇ (*Juniperus excelsa*) BİTKİSİNİN GÖKKUŞAĞI  
ALABALIKLARININ (*Oncorhynchus mykiss*) BAĞIŞIKLIK  
YANITI ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Selçuk İSPİR**

**Danışman  
Jüri Üyesi  
Jüri Üyesi**

**Doç. Dr. Soner BİLEN  
Prof. Dr. Derya GÜROY  
Dr. Öğr. Üyesi Ertuğrul TERZİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANA BİLİM DALI**

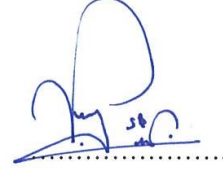
**KASTAMONU – 2018**

## TEZ ONAYI

**Selçuk İSPİR** tarafından hazırlanan " **Yüksek Ardıç (*Juniperus excelsa*) Bitkisinin Gökkuşaağı Alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) Bağışıklık Yanıtı Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi** " adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve **oy birliği** ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Su Ürünleri Yetiştiriciliği Ana Bilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Doç. Dr. Soner BİLEN  
Kastamonu Üniversitesi



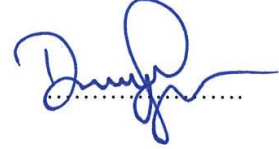
Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Ertuğrul TERZİ  
Kastamonu Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Derya GÜROY  
Yalova Üniversitesi



11/06/2018

Enstitü Müdür V.

Doç. Dr. Mehmet Altan KURNAZ



## TAAHHÜTNAME

Tez içindeki 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 bildirir ve taahhüt ederim.



Selçuk İSPİR

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### YÜKSEK ARDIÇ (*Juniperus excelsa*) BİTKİSİNİN GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARININ (*Oncorhynchus mykiss*) BAĞIŞIKLIK YANITI ÜZERİNE ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Selçuk İSPİR  
Kastamonu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Soner BİLEN

Bu çalışmada, yüksek ardıç (*Juniperus excelsa*) sulu methanolik özütünün gökkuşağı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) bağışıklık sistemi üzerinde meydana getirdiği değişimler incelenmiştir. Bu amaçla, bitkilerin dört farklı dozdaki (0 mg/kg (Kontrol), 1 mg/kg, 4 mg/kg ve 8 mg/kg) sulu methanolik özütü ile besleme şıngası kullanılarak günde iki defa oral yolla beslenmişlerdir. Çalışmanın 7 ve 14. günlerinde, tüm deneme gruplarından ön böbrek ve kan örnekleri alınmıştır. Tüm bu örneklerden, bağışıklık yanıtı belirlemek için, oksidatif radikal salınımları (NBT), lizozim (LYS) ve myeloperoksidaz aktiviteleri ile, sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-8 ve IL-12 gen sunumları belirlenmiştir. Çalışma sonunda tüm gruplar *Yersinia ruckeri* enfeksiyonu ile kontrol testine tabi tutulmuşlardır. Çalışma sonuçlarına göre yüksek ardıçın gökkuşağı alabalıklarında 8mg/kg balık başına olacak şekilde balıklara verilmesi balıkların bağışıklık yanıtlarında olumlu etkiler göstereceği ve *Yersinia ruckeri* enfeksiyonuna karşı koruma sağlayacağı ifade edilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Yüksek ardıç, gökkuşağı alabalığı, bağışıklık yanıtı, immunostimulat.

**2018, 33 sayfa**

**Bilim Kodu: 1207**

## ABSTRACT

MSc. Thesis

DETERMINATION OF EFFECTS OF GREEK JUNIPER (*Juniperus excelsa*) ON  
IMMUNE RESPONSES OF RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)

Selcuk ISPIR  
Kastamonu University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Aquaculture

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Soner BILEN

**Abstract:** In the present study, effects of greek juniper (*Juniperus excelsa*) aqueous methanolic extract on immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). With this aim, four different concentration the extract were given to the experimental fishes using feeding needle twice in a day. 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day of the study, head kidney tissue and blood samples were collected from each experimental group. From those samples, in other to determine the immune responses, oxidative radical production, lysozyme and myeloperoxidase and also gene expression of cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-12 were determined. At the end of the study fishes were challenged with *Yersinia ruckeri*. According to study results, using of 8mg/kg /fish dosage of greek juniper adding to the fish feed could be showed positive effects and protect fishes from *Y. ruckeri* infection.

**Key Words:** Greek juniper, rainbow trout, immune response, immunostimulant.

**2018, 33 pages**

**Science Code: 1207**

## TEŞEKKÜR

Tez alıőması boyunca yardımlarını esirgemeyen danıőmanım Doç. Dr. Soner BİLEN'e, saha ve laboratuvar çalıőmalarındaki katkılarından dolayı Arő. Gör. O. Nezih KENANOĞLU ve Yiğit TAŐTAN'a, ve son olarak da bu süreçte manevi desteğini hiç eksik etmeyen sevgili aileme teőekkürü borç bilirim.

Selçuk İSPİR  
Kastamonu, Haziran, 2018

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
GRAFİKLER DİZİNİ .....	xi
TABLolar DİZİNİ .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Yüksek Ardıç ( <i>Juniperus excelsa</i> ) Bitkisinin Genel Özellikleri .....	4
1.2. Çalışmanın Amacı .....	5
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	6
3. YÖNTEM.....	10
3.1. Materyal.....	10
3.1.1. Balık Materyali .....	10
3.1.2. Deneme Yeri.....	10
3.1.3. Yüksek ardıç Bitkisi ( <i>Juniperus excelsa</i> ) .....	10
3.2. Yöntem .....	11
3.2.1. Bitki Özütünün Çıkarılması.....	11
3.2.2. İmmunolojik Yanıtlar .....	11
3.2.2.1. Oksidatif radikal üretimi (NBT) .....	11
3.2.2.2. Lizozim aktivitesi (LYS) .....	12
3.2.2.3. Myeloperoksidaz aktivitesi (MPO) .....	12
3.2.2.4. Gen ekspresyonu .....	12
3.2.2.4.1. Total RNA izolasyonu .....	13
3.2.2.4.2. cDNA sentezi.....	13
3.2.2.4.3. Quantitative RT-PCR.....	13
3.2.5. Deneyin Kurgulanması .....	14
3.2.6. İstatistiksel Analizler .....	15
4. BULGULAR.....	16

4.1. Bağışıklık Sisteminde Meydana Gelen Değişimler.....	16
4.1.1. Oksidatif Radikal Salınımları (NBT).....	16
4.1.2. Lizozim Aktivitesi (LYS).....	17
4.1.3. Myeloperoksidaz Aktivitesi (MPO) .....	18
4.1.4. Gen Ekpresyonları .....	19
4.1.5. Kontrol Testi ( <i>Yersinia ruckerii</i> ) .....	22
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	24
KAYNAKLAR .....	27
ÖZGEÇMİŞ .....	33

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

C	Santigrat
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleikasit
EDTA	Etilen-diamin-tetra-asetat
FAO	Food and Agriculture Organization
gr	Gram
Gr +	Gram Pozitif
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
kg	Kilogram
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
O <sub>2</sub>	Oksijen
OH <sup>-</sup>	Hidroksit
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
U	Unite
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
°	Derece
%	Yüzde
YA	Yüksek Ardıç
K	Kontrol

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 1.1. Yüksek ardıç bitkisi .....	4

## GRAFİKLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Grafik 4.1. Yüksek ardıç sulu methanolik özütünün 14 gün boyunca gökkuşağı alabalıklarına oral yolla beslenme şırıngası kullanılarak verilmesi sonucunda oksidatif radikal üretimlerinde meydana gelen değişimler (mg/ml) Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. ....	16
Grafik 4.2. Yüksek ardıç sulu methanolik özütünün 14 gün boyunca gökkuşağı alabalıklarına oral yolla beslenme şırıngası kullanılarak verilmesi sonucunda lizozim aktivitelerinde meydana gelen değişimler (U/ml) Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. ....	18
Grafik 4.3. Yüksek ardıç sulu methanolik özütünün 14 gün boyunca gökkuşağı alabalıklarına oral yolla beslenme şırıngası kullanılarak verilmesi sonucunda myeloperoksidaz aktivitelerinde meydana gelen değişimler (U/ml) Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. ....	19
Grafik 4.4. Yüksek ardıç sulu methanolik özütünün 14 gün boyunca gökkuşağı alabalıklarına oral yolla beslenme şırıngası kullanılarak verilmesi sonucunda IL-1 $\beta$ gen sunumlarında meydana gelen değişimler (Katlama Değişimi). Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. ....	20
Grafik 4.5. Yüksek ardıç sulu methanolik özütünün 14 gün boyunca gökkuşağı alabalıklarına oral yolla beslenme şırıngası kullanılarak verilmesi sonucunda IL-8 gen sunumlarında meydana gelen değişimler (Katlama Değişimi). Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. ....	21
Grafik 4.6. Yersinia ruckeri enfeksiyonu ile intraperitoneal olarak enfekte edilen deneme gruplarının yaşama oranları (%). Üstel simgeler grupların kendi aralarındaki farklılığı ifade eder .....	22
Grafik 4.7. Yersinia ruckeri enfeksiyonu ile intraperitoneal olarak enfekte edilen deneme gruplarının yaşama oranları (%). Üstel simgeler grupların kendi aralarındaki farklılığı ifade eder .....	23

## TABLÖLAR DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan primerler.....	14

## 1. GİRİŞ

Dünyada en hızlı gelişen gıda sektörlerinden biri su ürünleri yetiştiriciliği olmakla birlikte son on yılda meydana gelen bu hızlı büyümenin nedenleri kesinlikle, balıkların ve kabuklu deniz hayvanlarının gıda globali olarak yüksek oranda talep edilmesidir. Bu on yıllık süre zarfında yıllık % 7.7'nin üzerinde ortalama büyüme oranı ile dünya genelinde yükselen bir gıda üretimi sanayisidir ve büyük bir yüzdesi Asya'dan dünyaya ulaşmaktadır. FAO istatistiklerine bakıldığında 2030 yılında su ürünleri yetiştiriciliği toplam üretiminin 187 milyon tona ulaşacağı öngörülmektedir (Msangi vd., 2013). Yine FAO tahminlerine göre su ürünleri yetiştiricilik sektörü benzer bir büyüme ivmesi göstermesi takdirinde, üretim miktarının 2020 yılı dahilinde 132 milyon ton balık ve kabuklu deniz hayvanları ve 43 milyon ton su yosunu olacaktır.

Su ürünleri yetiştiriciliğinin avantajları; geniş uygulama alanı, artan nüfus ile ihtiyaç duyulan talebin karşılanması, iş gücü açısından istihdam alanı yaratması ve ihracat fırsatları sunması olarak sıralanabilmektedir. Bununla birlikte geleneksel su ürünleri üretiminden daha fazla verim sağlanmaktadır.

Su ürünleri yetiştiriciliği artan dünya nüfusu ile birlikte yüksek düzeyde protein, önemli yağ asitleri, vitamin ve mineral içeren balık ve diğer suda yaşayan ürünleri tedarik ederek dünya genelinde insani beslenme ihtiyacı çalışmalarında önemli katkılar sağlayarak aynı zamanda ülkeler için ekonomiye olumlu katkılar sağlamakta, istihdam kaynakları sağlayarak kullanılan kaynakların karlılığını önemli derecede arttırıp ülkelerin global yönden gelişime çok büyük katkılar sunmaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliği aynı zamanda çevre dostu olup, başka bir sanayi ve faaliyetin zararlı etkilerinin azaltılmasına yardım ederek çevreye verimli katkılarda da bulunabilir.

Ülkemizde su ürünleri yetiştiricilik uygulamalarına dünden bugüne bakıldığında, 1960'lı yılların sonunda gökkuşağı alabalığı (*Onchorhynchus mykiss*) yetiştiriciliği ve sazan balığı (*Cyprinus carpio*) ile başlamış olan su ürünleri yetiştiricilik uygulamaları daha sonra 1980'li yılların ortalarında Çipura (*Sparus aurata*) ve Avrupa Deniz Levreği (*Dicentrarchus labrax*) kültüre alınmasıyla ilerleyerek

gelişmiştir (Deniz, 2010). Günümüzde FAO ülkemizi dünya akvakültüründe üçüncü ülke olarak değerlendirmektedir (Güner, Güleç, İkiz ve Kayaci, 2014). Ülkemizde su ürünleri yetiştiriciliği içinde en önemli yeri tutan alabalık hem üretim miktarı bakımından hem de pazardaki tercih edilme bakımından deniz balıklarına önemli bir alternatif olarak gösterilmektedir (Yiğit ve Aral 1999). Alabalık üretimi başlangıçta sadece toprak havuzlarda ve tatlı sularda yapılmış olup toprak ve beton havuzlardaki yetiştiricilikten başka, son yıllarda toprak ve beton kanallarda, küvet ve tanklarda, silolarda ve kafeslerde endüstriyel alabalık yetiştiriciliği hızlı bir gelişme göstermiştir (Çelikkale 1982, 1998; Lagon ve Johnston 1992, Kiriş ve Dikel 2002).

Su ürünleri yetiştiricilik sektöründe doğrudan canlı ve doğa ile içiçe çalışıldığından bazı handikaplar da mevcuttur. Bu sektördeki en önemli sınırlayıcı faktörler balıktaki bakteriler, virüsler ve parazitler dahil olmak üzere balık kültüründeki hastalıklar sayılabilmekte; bunlar balık kültürü üretiminin kısmen veya tamamen kaybedilmesine neden olabilmektedir. Bunların yanında aşırı stok fazlalığı, sıcaklıktaki yüksek veya hızlı değişim, düşük su kalitesi ve zayıf beslenme durumu gibi bazı faktörlerde balıklar açısından stres veya bağışıklık tepkileri gibi fizyolojik değişikliklere neden olur ve dolayısıyla da hastalığa cevap verebilirliği azaltıp gerekli müdahalenin zamanında müdahale edilememesi durumunda stok kayıplarına sebep olabilmektedir. Bu durum ekonomik kayıplara yol açabileceği için, farklı veteriner ilaçları, enfeksiyon salgınlarını engellemek veya tedavi etmek için su ürünleri yetiştiriciliğinde yerinde ve zamanında kullanılmalıdır. Antimikrobiyal ve diğer veteriner ilaçları zaman zaman banyolarda ve hastalıklar meydana gelmeden önce veya hasta hayvanları tedavi etmek veya büyüme performansını arttırmak için yapılan uygulamalarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Reverter vd., 2014).

Bağışıklık sistemi, hem dışarıdan (bakteriler, virüsler, parazitler) hem de vücudun içinden (kötü huylu ve otoraktif hücreler) kaynaklanan yıkıcı güçlere karşı ana savunma sistemi olarak tanımlanır. Balıklarda bağışıklık sistemi, bazı farklılıklara rağmen daha yüksek omurgalı hayvanların sistemine fizyolojik olarak benzemesine karşın, balıklar yaşam süresince erken embriyonik dönemlerden itibaren parazit olmayan organizmalardır ve hayatta kalabilmeleri doğal bağışıklık sistemine dayanmaktadır. Balıklarda bağışıklık sistemi hücresel ve humoral etkenlere ayrılan,

doğuştan (non-spesifik) ve adaptif (spesifik) iki bağışıklık sistemine sahiptir. Spesifik olmayan bağışıklık tepkileri üzerinde etkisi olabilen, çeşitli dahili ve harici etkenler bulunur. Sıcaklıktaki, basınçtaki ve yoğunluktaki değişikliklerin, bazı gıda ek maddeleri ve immonostimülan bunların etkililiğini arttırabildiği halde, bu tepkiler üzerinde baskılayıcı etkileri bulunabilir (Uribe vd., 2011).

Antibiyotik, aşı ve immonostimülan kullanımını kapsayan, balık hastalıklarını kontrol edebilecek bazı yöntemler vardır. Bununla birlikte, antibiyotiklerin kullanımı toksisite, maliyet ve hükümet kısıtlaması dahil olmak üzere bazı sorunlar meydana getirmektedir. Antibiyotik direnci, su ürünleri yetiştiricilik ortamında, insan patojenlerine doğru olumsuz şekilde dönüşebilir ve antibiyotik kalıntısı balık bünyesinde insan sağlığı için tehlikeli olabilecek seviyede birikebilir. Bunlara ek olarak, yoğun akva kültüründe görülen hastalıkların kontrolü antibiyotiğe dirençli patojen, biyolojik birikim, kirlilik ve immünosüprasyon artışı ile sonuçlanmıştır (Manoppo vd., 2015).

Kemoterapötik maddelere ve aşılar ek olarak immonostimülanların kullanılması, balık yetiştiriciler tarafından yaygın şekilde kabul edilmektedir. İmmonostimülanların bütün enfeksiyon hastalıklarına karşı savunma yetenekleri olup olmadığı gibi, immonostimülanların etkililiğine dair kullanıcıların sorduğu pek çok soru vardır (Sakai, 1999). İmmonostimülanlar, doğal ve adaptif savunma mekanizmalarını arttırarak hastalığa direnç kapasitesini geliştirebilirler (Rao vd., 2006).

Günümüzde su ürünlerinde çeşitli baharat ve tıbbi bitkilerin kullanımıyla ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Özellikle alternatif olarak su ürünleri yetiştiriciliğinde bu bitkisel kaynaklar fenolikleri, polipeptitleri, terponoidleri, polifenolikleri, quinonları, lektinleri ve alkaloidleri içermesi nedeniyle antibiyotik ve diğer sentetik kimyasallar yerine kullanılabilir. Bu bitkisel kaynakların içerdikleri çeşitli bileşikler sayesinde antiviral, antibakteriyal, antifungal, antiparasitik olmalarıyla birlikte bağışıklığı arttırıcı, hematolojik ve biyokimyasal kriterleri güçlendirici etki göstermeleri, sentetik ürünlere alternatif olabileceklerini kanıtlamaktadır (Citarasu, 2010).

Su ürünleri yetiştiriciliğinde, bakteriyel sentez, hayvan ve bitki bileşimi gibi çeşitli maddelerin, immonostimulanlar gibi kullanılabileceğini bildiren pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu zamana kadar, çok fazla sayıda geleneksel tıbbi bitkiler, Su ürünleri yetiştiriciliğinde farklı hastalıklardan kaçınmak ve bu hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır (Ghareghanipoor vd., 2014). Doğal bitki üretimi, antistres, büyüme artışı, isteğin teşvik edilmesi, bağışıklık tepkilerinin etkinleştirilmesi ve uyarılması, enfeksiyonların engellenmesi gibi pek çok faaliyetin artırılması için önerilmektedir (Pandey vd., 2012).

Toksisiteye neden olmadan tedavi ve hastalıkla mücadelede daha isabetli ve ucuz bir kaynak olan şifalı otlar ve bitkiler balık kültürlerinde sağladığı pekçok avantaj ile pratikte kullanımları yaygındır (Madhuri, S., Mandloi, A.K., Govind,P. & Sahni, Y.P., 2012).

### **1.1. Yüksek Ardıç (*Juniperus excelsa*) Bitkisinin Genel Özellikleri**

Üreyip çoğalabilmek için ardıç kuşuna ihtiyacı olan ardıç ağacı, iğne yapraklı bir ağaç türü olan ardıç bitkisi mevsimsel olarak aynı isimle meyve verir ve insan vücudunun ihtiyaç duyduğu bir meyve üretmektedir. Mevsime bağlı olarak ürettiği ardıç meyvesi ile pek çok hastalığa tedavi olan ağaç aynı zamanda yağıyla da çare olabilmektedir. Türk tarihinde olduğu kadar dünya tarihinde de kutsal ağaçlar listesinde yeri olan ardıç ağacının, manevi anlam taşıdığına inanılmakta ve bu nedenle parklara, bahçelere ve ormanlar gibi pek çok alana ardıç ağacı dikilmektedir. Ardıcın bereket, huzur ve sağlık getirdiği bilinmektedir.

Pek çok türü olan ardıç bitkisinin bir türü olan Yüksek Ardıcın kozalakları mavimsi ve siyah renkte ve ülkemizin birçok yerinde rahatlıkla yetişebilmektedir (Şekil.1.1.)



Şekil 1.1. Yüksek ardıç bitkisi (URL.1)

Yüksek ardıç ağacının faydaları hem yaprakları hem de meyvesi ile olmaktadır. İnsanlarda çoğunlukla meyvesi kullanılan ağacın en iyi geldiği alan boşaltım sistemi olup özellikle idrar söktürme ve kötü idrar kokusunu giderme konusunda meyvesi oldukça etkili olduğu bilinmektedir. Bunun yanında vücuda alındığında kötü kokuya neden olan her etmeni ortadan kaldıran yüksek ardıç meyvesi, ağız kokusu problemlerine de çözüm sunmaktadır. Bağışıklık sistemi zayıf olan bireyleri mikroplardan koruyan bitki, metabolizmanın güçlü kalmasını sağlamaktadır. Bunlardan başka ardıç ağacının; regl sancularına, gut hastalığına, romatizmaya, bağırsak sorunlarına, deri hastalıklarına iyi geldiği ve damar sertliğini önlediği bilinmektedir (URL.2).

## 1.2. Çalışmanın Amacı

Çalışmamızın amacı, uyarılmış hücre içi solunumsal patlama analizi, miyeloperoksidaz ve lizozim faaliyeti dahil olmak üzere ülkemizde en çok yetiştiriciliği yapılan Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) spesifik olmayan sistemin bazı immünolojik parametreleri üzerinden 15, 30 ve 45 günlük kontrol grubuna kıyasla, yüksek ardıç (*Juniperus excelsa*) bitkisinin % 1, % 2, % 3 olan farklı dozlarının etkilerini açıklığa kavuşturmasıdır.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

Yetiştiricilikte kullanılan balık türlerinde, yem değerlendirme, büyüme ve yaşama oranlarının artırılması için, yeme çeşitli katkı maddeleri eklenmekte böylece bağışıklığı destekleyici, hastalıklara karşı direnci artırıcı ve oksidatif stresi azaltıcı etkilerinden faydalanılmaktadır. Günümüzde bu amaçla tıbbi bitki özütleri alternatif olarak kullanılmaktadır (Bilen ve Bilen, 2012). Tıbbi bitkilerin, balıkların büyüme performanslarına ve bağışıklık sistemlerine önemli avantajlar sağladığına dair literatürde bu alanla ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır.

Düğenci vd. (2003), ökse otu (*Viscum album*), ısırgan otu (*Urtica dioica*) ve zencefil (*Zingiber officinale*) sulu ekstraktlarının, alabalıkta bağışıklık sistemi üzerine etkilerini araştırmışlar ve ekstraktları % 0,1 ve % 1 oranında yemlere katarak 21 gün boyunca balıkların beslenmesinde denemişlerdir. Zencefil ile beslenen balıkların bağışıklık sisteminde kayda değer bir değişiklik gözlenmiş olup, fagozitozis ve solunum etkisinin tüm gruplarda kontrol grubuna oranla daha yüksek bulunduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca plazmadaki protein seviyesinin tüm gruplarda arttığını, fakat en yüksek plazma protein seviyesinin % 1 zencefil ile beslenen gruplarda olduğunu tespit etmişlerdir.

Watanuki vd. (2006), sazan balıklarında (*Cyprinus carpio*) yaptıkları bağışıklık çalışmasında, yeme 1, 10 ve 25 mg/kg olacak şekilde *Spirulina platensis* katmışlar ve bağışıklık uyarıcı etkisini araştırmışlardır. Uygulama sonrası 1, 3 ve 5. günlerde yaptıkları bağışıklık testleri sonucunda, *S. platensis* uygulanan tüm gruplardaki fagozitik aktivitenin ve böbrekteki fagozitik hücrelerin süperoksid üretiminin arttığını bulmuşlardır. Sonuç olarak, sazan balıklarında *S. platensis* 'in bağışıklık sistemini uyarıcı etkileri olduğunu belirtmişlerdir.

Bilen ve Bulut (2010), Akdeniz defnesinin (*Laurus nobilis*) gökkuşacağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) %0.5 ve %1 dozlarında denemişler ve spesifik olmayan bağışıklık sistemi parametrelerinden NBT, lizozim aktivitesi ve toplam plazma protein seviyelerinde kontrol grubuna göre herhangi bir değişiklik olmadığını ( $P>0.05$ ) fakat fagozitik aktivitenin her iki deneme grubu içinde kontrol grubuna göre önemli derece arttığını tespit etmişlerdir ( $P<0.05$ ).

Ekici vd. (2010), kekik (*Origanum vulgare*), melisa (*Melissa oleum*), karabaş (*Lavandulae romanae oleum*), biberiye (*Rosmarinus officinalis*) ve zencefil (*Zingiber officinale*) gibi bitkisel uçucu yağlarının kimyasal bileşimlerini, *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Flavobacterium psychrophilum* ve *Lactococcus garvieae* gibi çeşitli bakteriyel patojenler üzerinde in vitro ortamda antibakteriyal etkilerini incelemişlerdir. Sonuç olarak kekik ve melisa uçucu yağlarının diğer bitkisel yağlara oranla daha güçlü bir antimikrobiyal etki gösterdiğini ve kekik yağının spektrumunun geniş bir etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Bilen vd. (2011), tetranın (*Cotinus coggyria*) gökkuşacağı alabalıklarında bağışıklığı destekleyici etkisini araştırdıkları çalışmalarında 0.5 ve 1 mg/kg dozlarında olacak şekilde denemişler, sonuç olarak hücre içi ve hücre dışı oksidatif radikal salınımının, fagositik ve lizozim aktivitelerinin, toplam plazma protein seviyelerinin her iki deneme grubu içinde kontrol grubuna göre önemli derecede arttığı sonucuna varmışlardır (P<0.05). Spesifik olmayan bağışıklık sistemi parametrelerine en yüksek %0.1 olan grupta rastlamışlardır.

Bilen vd. (2013) tetranın (*Cotinus coggyria*) metanolik özütünü üç farklı dozda (0, 0,5, 1, 1,5 g kg<sup>-1</sup>) içeren yemlerle 4 hafta boyunca koi balıklarında (*Cyprinus carpio*) *Vibrio anguillarum* enfeksiyonuna karşı etkilerini incelemişler, 1,5 kg<sup>-1</sup> tetra verilen grupta NBT değerini en yüksek bulmuşlardır. Lizozim ve miyeloperoksidaz aktivitelerini tetra uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre kayda değer oranda yüksek buldukları çalışmada (P<0,05). Akyuvar ve hemogloblin konsantrasyonlarını 1 kg<sup>-1</sup> tetra içeren grupta yüksek bulmuşlardır (P<0,05).

Gültepe vd. (2014) tilapia (*Oreochromis mossambicus*) balıklarında denedikleri bahçe kekiği (*Thymus vulgaris*), biberiye (*Rosmarinus officinalis*) ve çemen otunu (*Trigonella foenum graecum*) %1 seviyesinde 45 gün boyunca balıkları deneme gruplarına ayırarak denemişlerdir. Deneme gruplarında fagozitik aktivite, hematokrit, beyaz kan hücresi, kırmızı kan hücresi, nötrofil ve monosit seviyelerinde önemli artış gözlemlenmişlerdir (P<0.05). Deneme başlatıldıktan 45 gün sonra 100 µl *Streptococcus iniae* verilen balıklarda gruplara göre sırasıyla bahçe kekiği, biberiye ve çemen otu için kümülatif ölüm oranları %22, %27 ve %31 iken kontrol grubunda %61 olarak bulmuşlardır.

Bilen vd. (2014a), Tetra (*Cotinus coggygria*) özütünün koi sazanlarında (*Cyprinus carpio*) *Aeromonas hydrophila* bakterisine karşı immün yanıt ve direnç olan etkisini araştırmışlar, bunun için tetra içeren yem gruplarını 0.5, 1 ve 1.5 g/kg olacak şekilde dizayn etmişlerdir. Sonuç olarak NBT değerleri tüm deneme gruplarında kontrol grubuna göre yüksek bulunmuşken, sırasıyla deneme gruplarında 1.5, 0.5 ve 1.0 g/kg için bu değerin arttığını tespit etmişlerdir. Lizozim ve myeloperoksidaz değerleri yine kontrol grubuna göre önemli derecede artış göstermişken bu değer için artış sıralamasının 1.5, 1.0 ve 0.5 şeklinde olduğunu belirtmişlerdir.

Bilen vd. (2014b) ısırgan otunun (*Urtica dioica*) metanolik özütünün japon balıklarında (*Carassius auratus*) bağışıklık sistemi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada 0,1 ve 0,5 g/kg yem olacak şekilde özütün iki farklı konsantrasyonunu japon balığı yemi içerisine katarak denemişler ve balıkları bu yemlerle 30 gün boyunca beslenmişlerdir. Çalışma sonunda tüm bağışıklık yanıtların kontrol grubuna göre her iki grupta kayda değer artış olduğunu, en yüksek bağışıklık yanıtın % 0,5 ısırgan otu içeren grupta görüldüğünü belirtmişlerdir (P<0.05). Bilen ve ark., (2014) ısırgan otu özütünün japon balıkları için etkili bir bağışıklık uyarıcı olduğunu belirtmişlerdir.

Bilen vd. (2015) kavak mantarını (*Pleurotus ostreatus*) ve ısırgan otunu (*Urtica dioica*) gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Aeromonas hydrophila* karşı bağışıklığı destekleyici özelliğini araştırdıkları çalışmada, söz konusu bitkilerin özütlerini 0.1 ve 0.5 gkg<sup>-1</sup> olacak şekilde yeme ilave ederek denemişlerdir. Fagozitik aktivitenin tüm deneme gruplarında arttığını gözlemledikleri çalışmada, NBT (Nitroblue tetrazolium) değerlerinin tüm deneme gruplarında kontrol grubuna göre arttığı sonucuna ulaşmışlardır (P<0.05). Lizozim aktivitesinin ise tüm deneme gruplarında kontrol grubuna göre arttığı belirtilen çalışmada en yüksek lizozim aktivitesi değerine 0.5 g kg<sup>-1</sup> lık grupta rastlamışlardır.

Bilen vd. (2016), gebre otunun (*Capparis spinosa*) gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) spesifik olmayan immün aktivitesine ve büyüme performansına etkisini araştırdıkları çalışmalarında, gebre otunun metanolik özütlerini yeme 0.1 ve 0.5 g kg<sup>-1</sup> olacak şekilde ilave ederek serumdan fagozitik, lizozim ve myeloperoksidaz aktivitelerine bakmışlardır. Sonuç olarak iki deneme grubunun kontrol grubuna göre fagozitik aktiviteyi arttırdığı ve aralarında ise önemli

bir farklılık bulunmadığını; lizozim ve myeloperoksidaz aktivitelerinin ise en yüksek 0.1 g kg<sup>-1</sup> grubunda görüldüğünü belirtmişlerdir.

Altunoğlu vd. (2017), çörek otunun (*Nigella sativa*) bağışıklığı destekleyici özelliğini gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) 0.1 ve 0.5 g kg<sup>-1</sup> dozlarında 30 gün boyunca denemişler, NBT değerinin en yüksek 0.5 g kg<sup>-1</sup> lık grupta rastlanıldığını, lizozim ve myeloperoksidaz aktivitelerinin ise deneme gruplarında kontrol grubuna göre önemli derecede arttığını belirtmişlerdir.

Diler vd. (2018) pelin otunun (*Artemisia vulgaris*) gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) bağışıklık ve *Vibrio anguillarum*'a karşı direnç sağlayan uygun dozlarını araştırdıkları çalışmada, pelin otunu balıkların yemlerine toz (%0, %0.1, %0.5, %1, %2) ve etanol ekstraktı (250 ve 1000 mg/kg) ilave ederek immünolojik yanıtı incelemişlerdir. NBT, lizozim ve fagositik aktivitenin kontrol grubuna göre arttığını tespit ettikleri çalışmada pelin otunun yemlere ilave edilmesi ile balıkların immün sistemi ve *V. anguillarum*'a karşı direnci arttırdığını, bu özellikleriyle immünoestimülant olarak kullanılabileceğini de eklemişlerdir.

### 3. YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Balık Materyali

Deneyde, 2016 yılında Germeçtepe İç Su ve Deniz Balıkları Üretim, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde üretimi yapılan ve ortalama ağırlıkları  $13,02 \pm 0,02$  g olan toplam 360 adet gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792) yavrusu kullanılmıştır. Araştırma Birimi'nin yavru büyütme kafeslerinden rastgele seçilen balıklardan 12 adet herbiri 100 L olan akvaryumlara 30'ar adet yerleştirilmiştir.

##### 3.1.2. Deneme Yeri

Deneme, Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Balık Hastalıkları Laboratuvarı'nda 14 gün boyunca yürütülmüş ve deney esnasında yapılan örneklemlerden elde edilen veriler Su Ürünleri Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda tamamlanmıştır.

##### 3.1.3. Yüksek Ardıç Bitkisi (*Juniperus excelsa*)

Çalışmada, gökkuşağı alabalıklarının bağışıklık sistemi üzerindeki immunostimulant yanıtların belirlenmesi için yüksek ardıç bitkisinin (*Juniperus excelsa*) sivri yaprakları kullanılmıştır. Bu bitkiler Kastamonu İli çevresinde yer alana kırsal bölgelerden temin edilmiş ve Su Ürünleri Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'na getirilerek gölge ortamda tüm nemini kaybetmesi için kurutulmuştur. Kurutulan bitki yaprakları yüksek hızlı bitki değirmeninde öğütülerek toz haline getirilmiştir ve toz haline getirilen bitkilerin sulu metanolik özütü çıkarılmıştır (Bilen vd., 2016).

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Bitki Özütünün Çıkarılması

Bu çalışmada kullanılan yüksek ardiç bitkisinin (*Juniperus excelsa*) sivri yaprakları belirtildiği üzere Kastamonu İli çevresinde yer alana kırsal bölgelerden temin edilmiştir. Toz haline getirilmiş bitkilerin sulu metanolik özütleri çıkarılma işleminde (Bilen, vd., 2016) kısaca, % 40'lık metanol hazırlanmış ve 1 L karışım içerisine 100 g bitki tozu eklenmiş ve güneş görmeyen yerde günde iki defa ters yüz edilerek üç gün boyunca beklenmiştir. Daha sonra bu örnekler Whatman filtre kâğıdından (47 mm) geçirilerek iri partiküller ayrılmıştır. Süzölmüş sıvı kısım vakum evaporatöre transfer edilmiş ve burada tüm sıvı kısım giderilinceye kadar 75 C°'de bekletilmiştir. Çalışma sonunda özüt miktarını net olarak belirlemek için 50 g saf su 50 C°'de ısıtılmış, evaporatör balonu içinde yer alan özüte eklenmiş ve çıkan örnek tartılarak toplam özüt miktarı belirlenmiştir. Daha sonra bu özütler kullanılacak doza göre PBS içerisinde hazırlanmış ve çalışmada kullanılincaya kadar -20 C°'de saklanmış, çalışma müddetince de +4 C°'de tutulmuştur.

### 3.2.2. İmmunolojik Yanıtlar

İmmunolojik yanıtların belirlenmesinde balıklardan kan örnekleri alınmış, ayrıca sitokin gen yanıtlarının belirlenmesi için ön böbrek dokuları alınmıştır. Balıklar örnekleme dönemlerinde yüksek dozda karanfil yağı ile bayıltılmış ve örnekleme gerçekleştirilmiştir. Kan örneklerinden örnekleme anında NBT testi, sonrasında serum çıkarılarak diğer testler yapılmıştır. Çalışmada toplanan ön böbrek hücreleri RNA later solüsyonu içerisine alınmış ve bir gece + 4°C'de bekletildikten sonra - 80°C'de gen ekspresyonu çalışmasının yapılacağı güne kadar saklanmıştır.

#### 3.2.2.1. Oksidatif radikal üretimi (NBT)

Oksidatif radikal salınımlarını belirlenmesinde NBT indirgemesi yöntemi kullanılmıştır (Siwicki ve Anderson, 1993). Bu bağlamda, balıklardan alınan kan örneklerinden 0,1 ml örnek, % 0,2 NBT içeren 0,1 ml solüsyon ile karıştırılmıştır. Bu karışım oda sıcaklığında 30 dakika süresince inkübe edilmiştir. Daha sonra

karışımdaki aktivasyonu durdurmak için karışımdan 50 µl süspansiyon alınmış ve cam tübe transfer edilmiş ve üzerine 1,0 ml N,N-dimethyl formamid eklenmiştir. Bu karışım 4000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve partiküller süspansiyondan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra bu karışım ayrı bir tüp içerisine alınmış ve 540 nm optik densitede N,N-dimethyl formamid kör örneğine karşı okunmuştur. Sonuçlar mg/ml olarak ifade edilmiştir.

#### **3.2.2.2. Lizozim aktivitesi (LYS)**

Lizozim aktivitesi Siwicki, Anderson ve Rumsey (1994)'e göre turbidimetrik yöntem kullanılarak yapılmıştır. Kısaca, serumdan 100 µl örnek alınmış, bunun üzerine 200 µl *Mycrococcus lysodeikteus* (0,2 mg/ml) eklenmiş ve 520 nm dalga boyunda 0 ve 4. dakikalarda Microplate Reader kullanılarak okunmuştur. Sonuçlar lizozim U/ml olarak verilmiştir.

#### **3.2.2.3. Myeloperoksidaz aktivitesi (MPO)**

Myeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin belirlenmesinde, 30 µL serum örneği ile 370 µl Ca<sup>2+</sup> veya Mg<sup>2+</sup> içermeyen HBSS karıştırılmıştır. Bu karışımın üzerine 100 µl 0,1 mg/ml 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin dihidroklorid ve % 0,006 hidrojen peroksit eklenmiştir. Reaksiyon absorbans farkı ölçülmüş ve reaksiyon hızı IU olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, 0,5 ml reaksiyon karışımının her bir (ΔA 450/dakika/mL) dakikadaki indirgenmesine göre verilmiştir (Quade ve Roth 1997).

#### **3.2.2.4. Gen ekspresyonu**

Çalışmada her 7 ve 14. günler sonunda balıkların ön böbrek dokuları alınmış ve bu dokulardan önce Total RNA izolasyonu yapılmış ve sonrasında cDNA'lar oluşturularak ölçümleri yapılmıştır. Uygun primerler kullanılarak balıkların gen sunumları tespit edilmiştir

#### **3.2.2.4.1. Total RNA izolasyonu**

Çalışmada toplanan böbrek örneklerinden Total RNA örnekleri BIOLINE kit (ISOLATE II RNA Mini Kit) kullanılarak üretici firma protokollerine göre yapılmıştır. Kısaca, yaklaşık 30 mg böbrek örneği RNA izolasyonu için alınmıştır. Örnekler 600 µl Trizol içerisinde homojenizatör kullanılarak izole edilmiştir. İzole edilen örneklerden üretici protokolüne göre santrifüj adımları uygulanarak Total RNA elde edilmiştir. Elde edilen RNA'nın saflığı ve kalitesi Multiscan GO (Thermo Scientific, USA) kullanılarak tespit edilmiştir. Miktarı belirlenen örnekler 15 ng/µl olacak şekilde seyreltilerek cDNA hazırlamada kullanılmıştır. Örnekler kullanılmadıkları esnada -80°C'de saklanmıştır.

#### **3.2.2.4.2. cDNA sentezi**

Seyreltilen RNAlar genomic DNA'nın uzaklaştırılması için 1 U DNase I (BIOLINE) ile muamele edilmiştir. İzole edilen Total RNAlar'dan BIOLINE kit (SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit) kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. Bu işlemde 1 µg seyreltilmiş ve genomik DNA'sı uzaklaştırılan RNA, 15 pmol/µL oligo dT primer, 4 µL 5x TransAmp Buffer, 1 µL of Reverse Transcriptase, oligo dT primer ve 20 µL nükleaz içermeyen su eklenerek reaksiyon karışımı oluşturulmuştur. Reaksiyon karışımı thermal cycler (ThermoFischer Scientific) içerisinde 25 °C'de 10 dakika tavlama, 42 °C'de 15 dakika ters transkripsiyon ve 85 °C'de 5 dakika inaktivasyon aşamalarından geçirilerek cDNA sentezlenmiştir. Elde edilen cDNA'nın saflığı ve kalitesi Multiscan GO (Thermo Scientific, USA) kullanılarak tespit edilmiştir. Miktarı belirlenen örnekler 20 ng/µl olacak şekilde seyreltilerek gen sunumlarının belirlenmesinde kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### **3.2.2.4.3. Quantitative RT-PCR**

cDNA sentezinden sonra, qRT-PCR analizi Rotor-Gene qPCR belirleme sistemi (Qiagen, Germany) vasıtasıyla SensiFAST SYBR No-ROX Kit PCR kit (BIOLINE, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Genlere özel spesifik primerler kullanılmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan primerler

Gen	Primer Dizisi	Amplifikasyon boyu (bp)	Kaynak
B-aktin	F5'ATGGAAGGTGAAATCGCC 3' R5' TGCCAGATCTTCTCCATG 3'	186	Sigh ve ark. 2004
IL-1 $\beta$	F5'ACCGAGTTCAAGGACAAGGA 3' R5' CATTTCATCAGGACCCAGCAC 3'	181	Awad ve ark. 2011
IL-8	F5'CACAGACAGAGAAGGAAGGAAAG3' R5'TGCTCATCTTGGGGTTACAGA 3'	162	Awad ve ark. 2011
IL-12- $\beta$	F5' GAACCCAGACGACGATGATT3' R5' GTTCAAACCTCCAACCCTCCA 3'	190	Komatsu ve ark., 2009

qRT-PCR karışımı 12.5  $\mu$ L of 2 $\times$  SYBR Green Master Mix, 0.1  $\mu$ g of şablon DNA, 0.4  $\mu$ M spesifik genlerin ileri ve geri primerleri (IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-12, ve referans olarak  $\beta$ -aktin) ve 20  $\mu$ L nükleaz içermeyen su ile tamamlanarak hazırlanmıştır. qRT-PCR adımları sırasıyla: 95  $^{\circ}$ C'de 5 saniye denaturasyon sonrasında tavlama ve uzatma safhalarını içeren 60  $^{\circ}$ C'de 10 saniye tutulmuş ve bu işlem 45 döngü olarak yapılmıştır. Bunun akabinde örnekler 95  $^{\circ}$ C denatüre edilmiş ve 65  $^{\circ}$ C'de tutulmuştur. Floresan sinyaller 530 nm dalga boyunda 60  $^{\circ}$ C'den 95  $^{\circ}$ C'ye her 1 saniyede 0.5  $^{\circ}$ C değişimde eritme eğri analizini uygulamak için ölçülmüştür qRT-PCR her örnekleme aşamasında her akvaryumdan alınan 3 örneğin her birinden 3 tekerrür olacak şekilde okumaları yapılmıştır.  $\Delta C_T$  ve  $\Delta\Delta C_T$  değerleri aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir.

$$\Delta C_T = C_T \text{ hedef gen} - C_T \text{ referans gen}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Uygulama yapılmış örnek} - \Delta C_T \text{ kontrol örneği}$$

Sonuçlar  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  metodu kullanılarak belirlenmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001) .

### 3.2.5. Deneyin Kurgulanması

Çalışmada kullanılacak olan balıklar iki hafta boyunca aynı tip yemle beslenerek adaptasyon sürecine alınmış ve çalışma başlamadan önce ölen balıklar deneme ortamından uzaklaştırılmıştır. Balıklar çalışmada kullanılan 12 adet 100 L'lik

akvaryumlara 30'ar adet stoklanmıştır. Yüksek ardıç sulu methanolik özütü 0 (kontrol), 1 mg/kg, 4 mg/kg ve 8mg/kg/ balık olacak şekilde balıklara günde iki defa besleme şıngası kullanılarak oral yolla verilmiştir. Balıklar alışma süresince doyana kadar günde iki defa beslenmişlerdir. Çalışmanın 7 ve 14. günlerinde balıkların n böbrek dokuları ile kan örneklere alınmıştır. Kan örneklere immünolojik analizler, doku örneklere ise gen sunumları belirlenmiştir.

### **3.2.6. İstatistiksel Analizler**

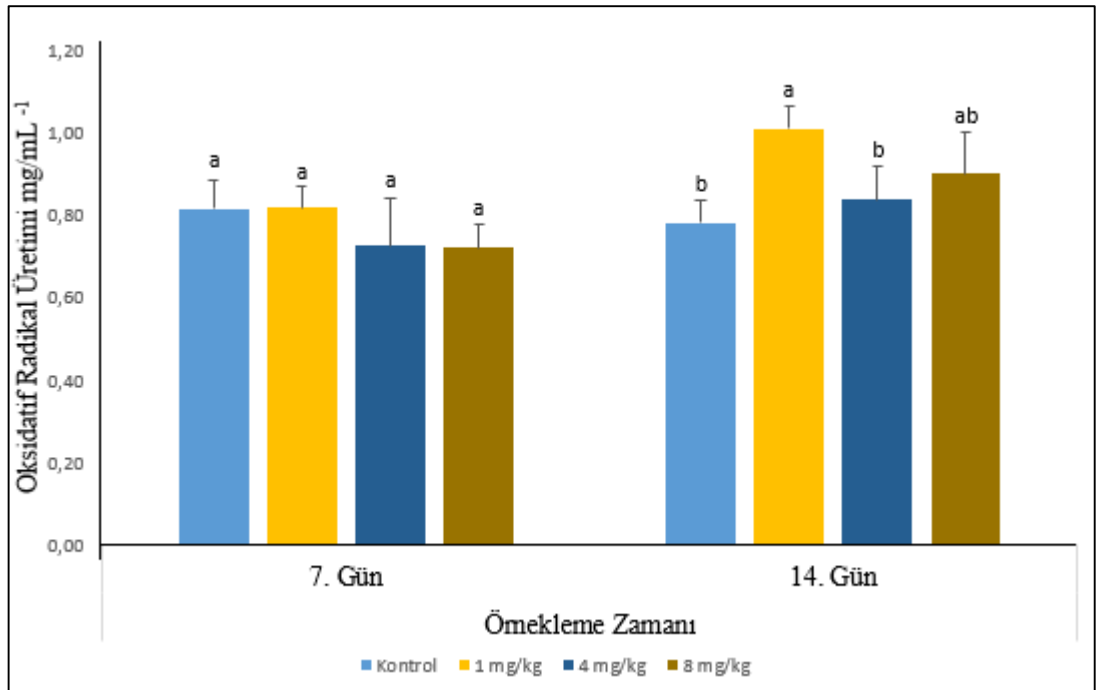
Deneyde elde edilen bütün verilerin ortalama ve standart hata ( $\pm$ SE) değerleri Microsoft Office Excel programı yardımıyla hesaplanmıştır. Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS 22 paket programı kullanılmıştır. Veriler ANOVA testine tabi tutulduktan sonra gruplar arasındaki farklılıklar % 95 güven aralığı içeresinde Tukey testi kullanılarak belirlenmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Bağışıklık Sisteminde Meydana Gelen Değişimler

#### 4.1.1. Oksidatif Radikal Salınımları (NBT)

14 gün süren çalışma sonunda örnekleme günleri olan 7ve 14. gün elde edilen NBT aktiviteleri Grafik 4.1’de verilmiştir.



Grafik 4.1. Yüksek ardıç sulu methanolik özütünün 14 gün boyunca gökkuşuğı alabalıklarına oral yolla beslenme şırıngası kullanılarak verilmesi sonucunda oksidatif radikal üretimlerinde meydana gelen değişimler (mg/ml) Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

Bu çalışmada elde edilen NBT aktivitesi verilerine göre çalışmanın 7. gününde en yüksek NBT aktivitesi 1YA (0,82±0,05 mg/ml) grubunda elde edilmiştir. Daha sonra sırasıyla K (0,81±0,07 mg/ml), 4YA (0,72±0,12 mg/ml) ve 8YA (0,72±0,06 mg/ml) gruplarında gözlenmiştir. Bununla birlikte 7. gün verileri arasında istatistiksel açıdan kayda değer bir değişim gözlenmemiştir (P>0,05). Çalışmanın 14. gününde elde edilen veriler değerlendirildiğinde en yüksek NBT değeri 1YA (1,01±0,05 mg/ml)

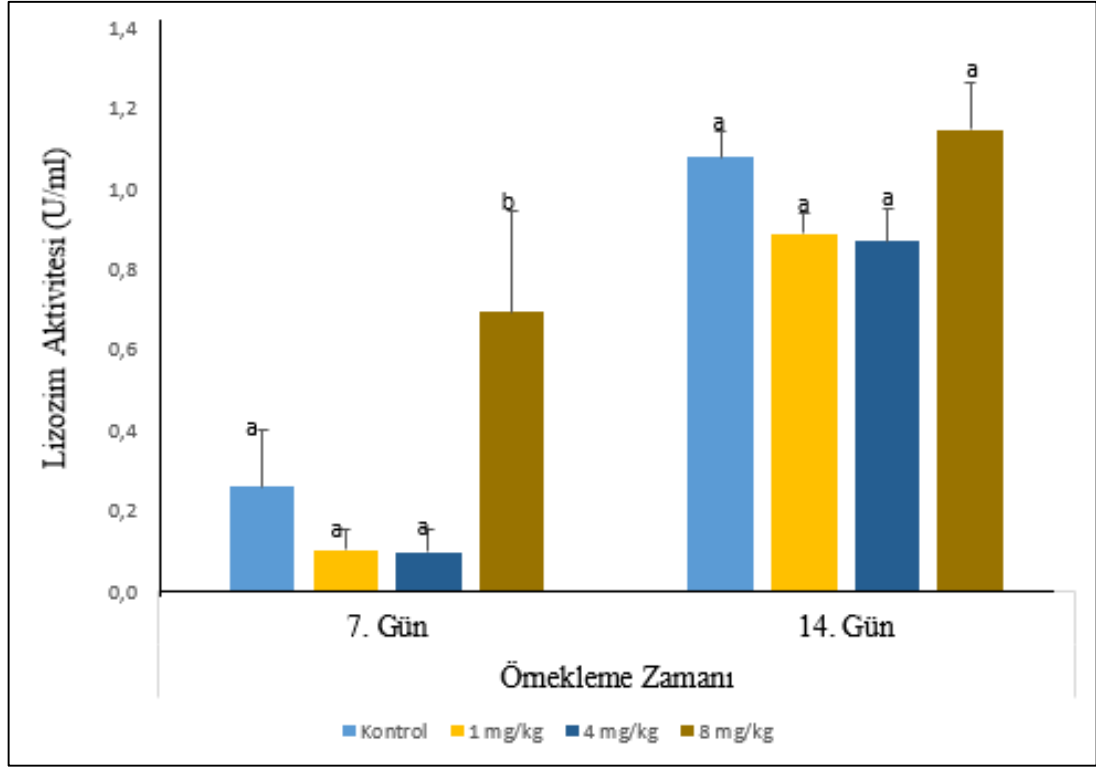
grubunda gözlenmiştir. Bunu sırasıyla 8YA ( $0,90\pm 0,10$  mg/ml) grubu, 4YA ( $0,84\pm 0,08$  mg/ml) grubu ve en son olarak da K ( $0,78\pm 0,06$  mg/ml) grubu takip etmiştir. Bu değerleri içerisinde 1YA grubu 8YA grubu ile benzerlik gösterirken ( $P>0,05$ ), bundan farklı olarak 4 YA ve K gruplarında önemli derecede yüksek tespit edilmiştir ( $P<0,05$ ). 8YA grubu hem 1YA grubu ile hem de 4YA ve K grupları ile benzerlik göstermiştir. Bundan farklı olarak 4YA ve K gruplarının NBT değerleri kayda değer oranda düşük çıkmıştır. Kontrol grubuna kıyasla değerlendirme yapıldığında 1YA grubu önemli derecede farklılık gösterirken diğer gruplar kontrol grubu ile benzerlik göstermiştir.

#### **4.1.2. Lizozim Aktivitesi (LYS)**

14 gün süren çalışmada 7 ve 14. günlerde balıklardan alınan kan örneklerinden izole edilen serumlardan LYS aktivitelerinde meydana gelen değişimler incelenmiştir. Elde edilen veriler Grafik 4.2’de ifade edilmiştir.

Çalışma sonunda elde edilen LYS aktiviteleri kontrol edildiğinde, çalışmanın 7. gününde en yüksek LYS aktivitesi 8YA ( $0,69\pm 0,25$  U/ml) grubunda elde edilmiştir. Daha sonra sırasıyla LYS değerleri K ( $0,26\pm 0,14$  U/ml), 1YA ( $0,10\pm 0,05$  U/ml) ve 4YA ( $0,10\pm 0,06$  U/ml) grupları gelmiştir. Gruplar kendi aralarında kıyaslandığında 8YA grubu diğer gruplardan önemli derecede farklı tespit edilmişken ( $P>0,05$ ) Diğer gruplar arasında K grubu yüksek olmasına rağmen gruplar arasında önemli bir farklılık belirlememiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen veriler kontrol grubuna kıyasla değerlendirildiğinde 8YA grubu LYS aktivitesi kayda değer yüksek tespit edilmişken bundan farklı olarak 1YA ve 4YA grupları arasında önemli bir değişiklik tespit edilememiştir.

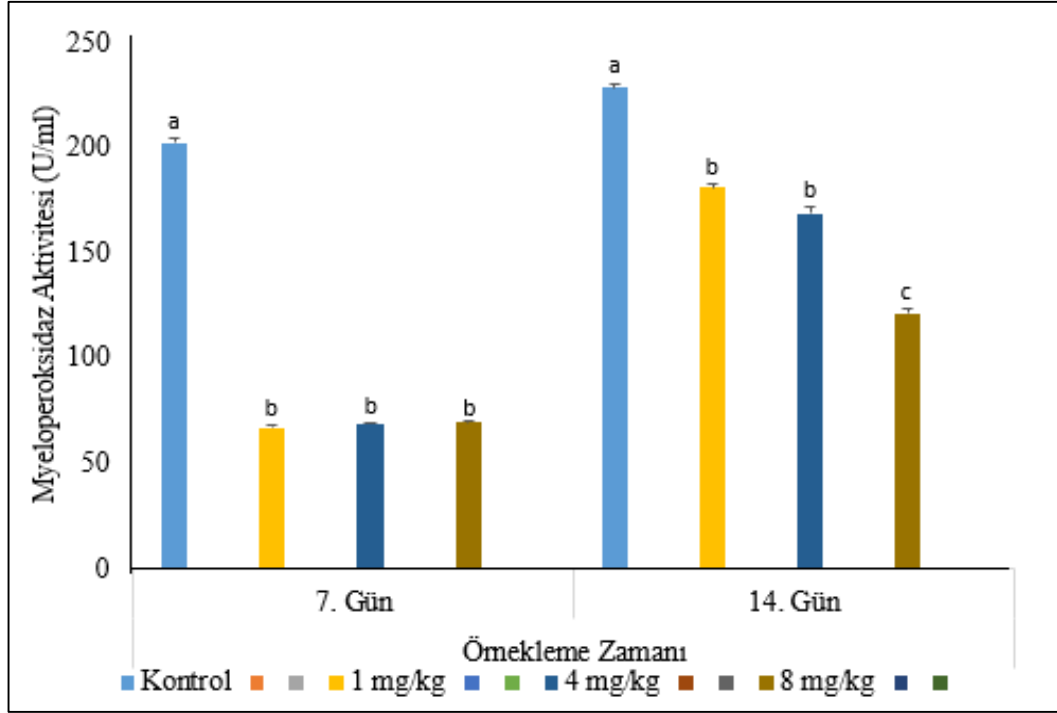


Grafik 4.2. Yüksek ardiç sulu metanolik özütünün 14 gün boyunca gökkuşuğu alabalıklarına oral yolla beslenme şıngası kullanılarak verilmesi sonucunda lizoim aktivitelerinde meydana gelen değişimler (U/ml) Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

#### 4.1.3. Myeloperoksidaz Aktivitesi (MPO)

Çalışma sonunda elde edilen MPO aktiviteleri Grafik 4.3'te ifade edilmiştir.

Bu sonuçlar ışığında çalışmanın 7. Gününde yapılan MPO aktivitesi sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek aktivite K (202,24±2,54 U/ml) grubunda tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla 8YA (69,18±0,93 U/ml), 4YA (68,95±0,63 U/ml) ve 1YA (66,76±1,62 U/ml) grupları takip etmiştir. Deneme gruplarından 1YA, 4YA ve 8YA grupları kendi içlerinde istatistiksel açıdan bir farklılık oluşturmazken bundan farklı olarak K grubu tüm bu gruplardan kayda değer oranda yüksek tespit edilmiştir (P<0,05). Diğer bir ifadeyle, tüm örnekleme gruplarının MPO aktiviteleri kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azalma göstermiştir (P<0,05). Çalışmanın 14. günü elde edilen sonuçları değerlendirildiğinde tüm gruplar arasında farklılıklar gözlenmiştir.



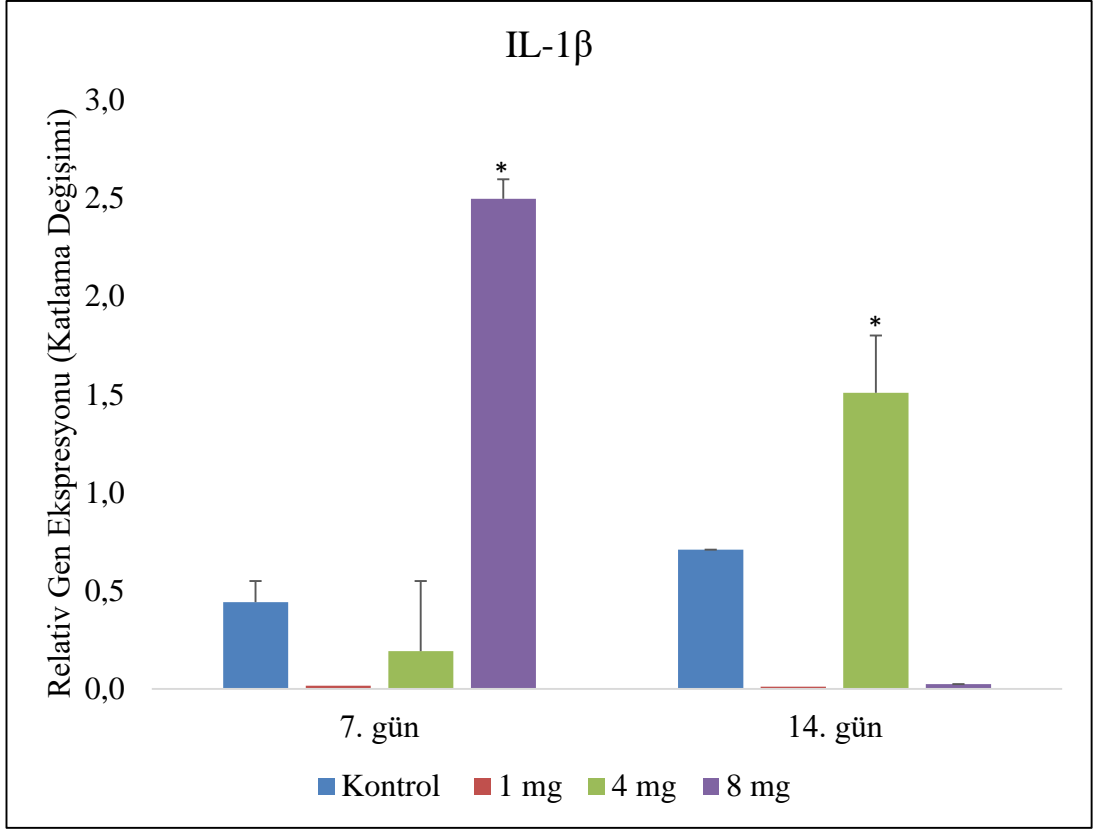
Grafik 4.3. Yüksek ardıç sulu metanolik özütünün 14 gün boyunca gökkuşuğu alabalıklarına oral yolla beslenme şırıngası kullanılarak verilmesi sonucunda myeloperoksidaz aktivitelerinde meydana gelen değişimler (U/ml) Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

Çalışmanın 14. günü değerlendirildiğinde en yüksek MPO değeri K ( $228,55 \pm 1,86$  U/ml) grubunda tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla 1YA ( $181,04 \pm 1,90$  U/ml), 4YA ( $168,88 \pm 2,83$  U/ml) ve 8YA ( $121,41 \pm 1,77$  U/ml) grupları takip etmiştir. 1YA ve 4YA grupları arasında farklılık gözlenmezken ( $P > 0,05$ ) bunlardan farklı olarak 8YA grubunda önemli derecede azalma gözlenmiştir ( $P < 0,05$ ). Tüm gruplar kontrol grubu ile kıyaslandığında 1YA ve 4YA grupları kayda değer oranda düşmüştür ( $P < 0,05$ ). En düşük MPO değeri 14. günde 8YA grubunda gözlenmiştir.

#### 4.1.4. Gen Ekspresyonları

Bu çalışmada bağışıklık sisteminde meydana gelen değişimlerin incelenmesinde sitokin gen sunumlarında meydana gelen değişimler incelenmiştir. Bu bağlamda IL-1 $\beta$ , IL-8 ve IL-12 genlerinde meydana gelen değişimler incelenmiştir.

Çalışmanın sonunda IL-1 $\beta$  gen sunumlarında meydana gelen değişimler Grafik 4.4'te ifade edilmiştir.

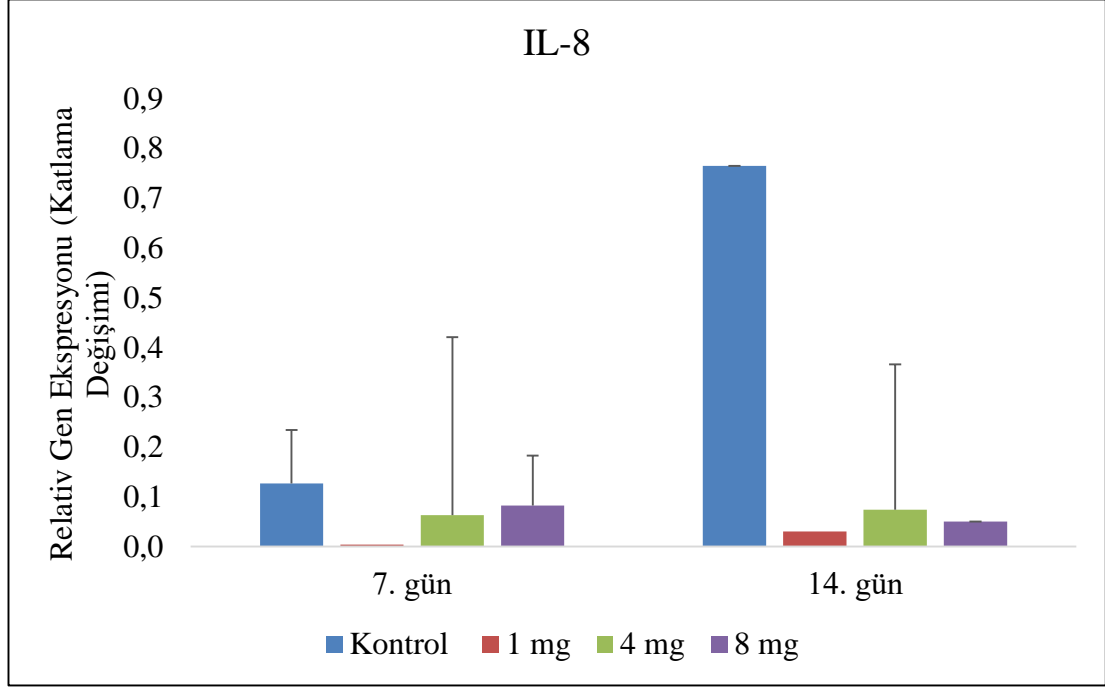


Grafik 4.4. Yüksek ardıç sulu metanolik özütünün 14 gün boyunca gökkuşağı alabalıklarına oral yolla beslenme şıngası kullanılarak verilmesi sonucunda IL-1 $\beta$  gen sunumlarında meydana gelen değişimler (Katlama Değişimi). Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

Çalışmanın 7. gününde elde edilen veriler değerlendirildiğinde en yüksek IL-1  $\beta$  değeri 8YA ( $2,5\pm 0,1$ ) grubunda elde edilmiştir. Diğer gruplarda IL-1  $\beta$  aktivitesi sırasıyla K ( $0,44\pm 0,1$ ), 4YA ( $0,19\pm 0,09$ ), 1YA ( $0,02\pm 0,01$ ) gruplarında elde edilmiştir. Tüm gruplar kıyaslandığında en yüksek IL-1B değeri 8YA grubunda elde edilirken bu değer K grubu ile kıyaslandığında önemli derece farklı bulunmuştur ( $P < 0,05$ ). Bundan farklı olarak 1 YA ve 4 YA değeri kontrol grubuna kıyasla düşüş göstermişken bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ( $P > 0,05$ ).

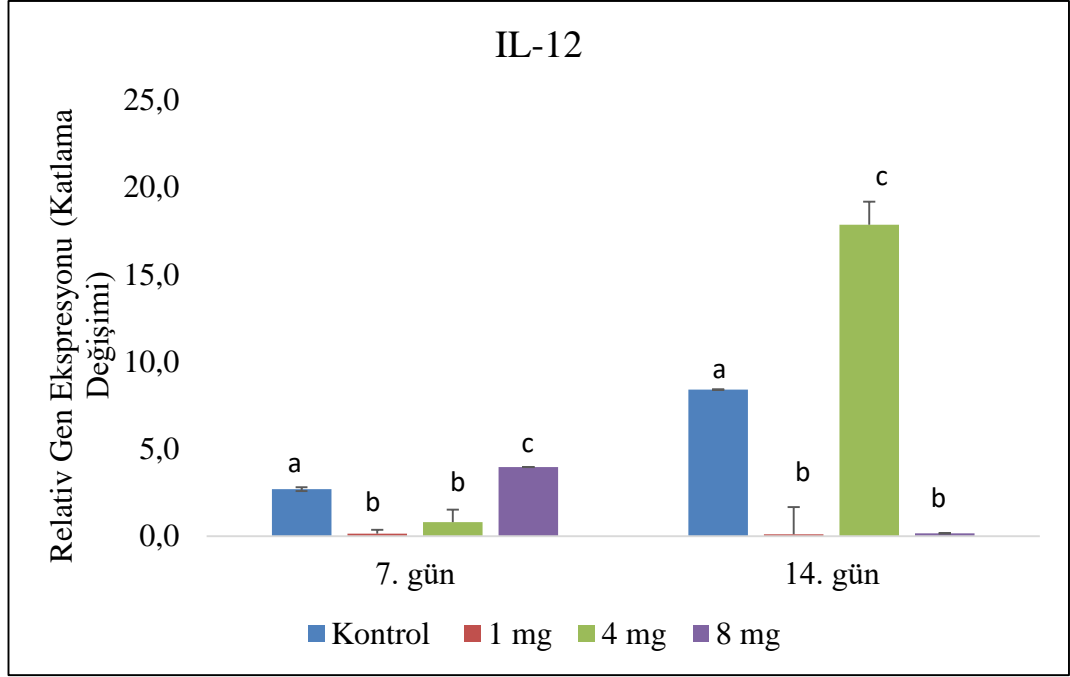
Çalışmanın 14. gününde elde edilen değerler incelendiğinde, en yüksek IL-1 $\beta$  değeri 4YA ( $1,51\pm 0,29$ ) grubunda gözlenmiştir. Bunu sırasıyla K ( $0,71\pm 0,01$ ), 8YA ( $0,02\pm 0,01$ ) ve 1YA grubunda elde edilmiştir. Bu değerler kıyaslandığında en yüksek IL-1 $\beta$  değeri 4YA grubunda elde edilmiştir. Bu değerler kontrol grubu ile kıyaslandığında 4YA grubundaki artış önemli farklılık gösterirken 1YA ve 4YA grubu kontrol grubuna kıyasla benzerlik göstermiştir.

Çalışma sonunda elde edilen IL-8 gen sunumlarında meydana gelen değişimler Grafik 4.5'te ifade edilmiştir.



Grafik 4.5. Yüksek ardiç sulu metanolik özütünün 14 gün boyunca gökkuşuğu alabalıklarına oral yolla beslenme şırıngası kullanılarak verilmesi sonucunda IL-8 gen sunumlarında meydana gelen değişimler (Katlama Değişimi). Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

Bu çalışma sonunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde çalışmanın 7. Gününde en yüksek IL-8 değeri K ( $0,13 \pm 0,01$ ) grubunda daha sonra sırası ile 8YA ( $0,08 \pm 0,01$ ), 4YA ( $0,06 \pm 0,01$ ), ve 1YA grubunda gözlenmiştir. Tüm gruplar değerlendirildiğinde gruplar arasında önemli bir artış yada azalma söz konusu değildir ( $P > 0,05$ ). Çalışmanın 14. Gününe bakıldığında ise benzer olarak K grubunda bir artıştan söz etmek mümkünken bu gruplar arasında bir farklılık gözlenmemiştir ( $P > 0,05$ ).



Grafik 4.6. Yüksek ardıç sulu metanolik özütünün 14 gün boyunca gökkuşağı alabalıklarına oral yolla beslenme şırıngası kullanılarak verilmesi sonucunda IL-12 gen sunumlarında meydana gelen değişimler (Katlama Değişimi). Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

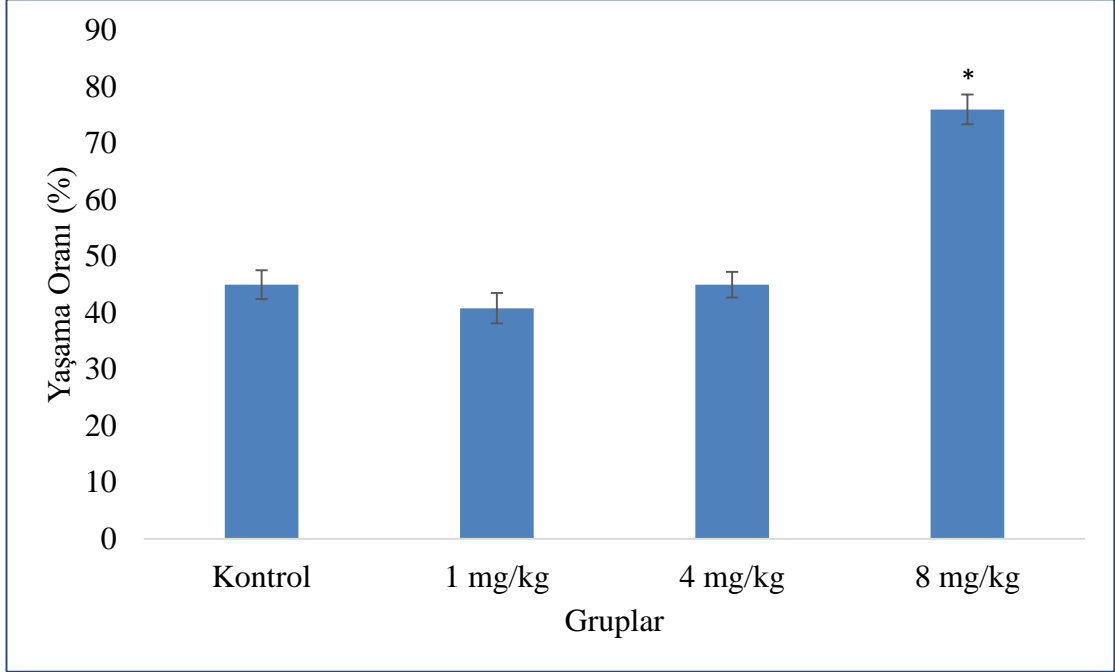
Çalışma sonunda elde edilene veriler değerlendirildiğin, çalışmanın 7. günde en yüksek IL-12 değerinin 8YA grubunda elde edildiği, sonra sırasıyla K ve 4YA, 1YA grubu şeklinde olduğu görülmektedir. Çalışmada 8YA grubunun kontrol grubuna kıyasla önemli derece de attığı ( $P<0,01$ ), bundan farklı olarak 4YA ve 1YA gruplarının is önemli derecede azaldığı ( $P>0,05$ ) belirlenmiştir.

Çalışmanın 14. gününde 7.gün değerlerinden farklı olarak en yüksek IL-12 değeri 4YA grubunda elde edilmiştir. Bu sırasıyla K, 8YA ve 1 YA grupları izlemiştir. 4YA grubunda elde edilen değer kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli derecede artış göstermiştir. Bundan farklı olarak 8YA ve 1 YA grupları kontrol grubuna göre azalırken bu grupların arasında bir farklılık gözlenememiştir.

#### 4.1.5. Kontrol Testi (*Yersinia ruckerii*)

Bu çalışma sonunda balıklar *Y. ruckerii* ile çalışmanın sonunda 14. gününde intraperitoneal olarak enfekte edilmiştir. Balıklar kontrol testine tabi tutulduktan sonra

yaşama oranları 10 gün boyunca gözlenerek kaydedilmiştir. Çalışma sonucu elde edilen veriler Grafik 4.6'da verilmiştir.



Grafik 4.7. *Yersinia ruckeri* enfeksiyonu ile intraperitoneal olarak enfekte edilen deneme gruplarının yaşama oranları (%). Üstel simgeler grupların kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

Çalışma sonuçlarına göre en yüksek yaşama oranı 8YA ( $76 \pm 2,63$  (%)) grubunda gözlenmiştir. Bunu sırasıyla 4YA ( $45 \pm 1,56$  (%)), K ( $45 \pm 1,42$  (%)), ve 1YA ( $40 \pm 0,74$  (%)), grubunda gözlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre en yüksek yaşama oranı 8YA grubunda tespit edilmiş olup kontrol grubuna kıyasla önemli derecede farklı tespit edilmiştir ( $P < 0,05$ ). Bundan farklı olarak 4YA ve 1 YA grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli değişiklik gözlenmemiştir ( $P > 0,05$ ).

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada farklı oranlarda yüksek ardiç sulu methanolik özütü ile 14 gün boyunca oral yolla verilen gökkuşığı alabalıklarının bağışıklık sisteminde meydana gelen değişimler NBT, LYS, MPO ve bunlara ek olarak sitokinlerden IL-1 $\beta$ , IL-8 ve IL-12 gen sunumları belirlenerek tespit edilmiştir. Ayrıca çalışma sonunda balıklar *Y. ruckeri* ile kontrol testine tabi tutularak 10 gün boyunca balıkların yaşama oranları kaydedilmiştir. Çalışma sonunda deneme gruplarında genel olarak NBT, LYS ve MPO aktivitelerinde değişim gözlenmezken IL-1B gen sunumunun 8YA grubunda önemli derecede arttığı gözlenmiştir. Bağışıklık parametrelerinde genel olarak bir değişim gözlenmezken kontrol testi sonuçlarına göre en yüksek yaşama oranı 8YA grubunda gözlenmiştir.

Oksidatif radikal salınımı (OH $^-$ , O $_2^-$ ), vücut içerisinde özellikle nötrofiller tarafından meydana getirilen önemli bir savunma mekanizmasıdır (Anderson, vd. 1992). İnflamasyonun başlangıcında son derece önemli bir durum olan NBT, nitro blue tetrazolium ile vücut hücrelerinin, özellikle oksidatif harekete geçmiş nötrofillerdeki oksidatif radikallerden kaynaklanan aktivitelerinde, boyanması ile belirlenir. Bu çalışmada, oksidatif radikal salınımları incelendiğinde çalışmanın 7. gününde bir değişiklik gözlemezken 14. günde 4YA grubunda önemli bir artış tespit edilmiştir. Şahan, vd. (2017), farklı dozlarda kuşburnu (*Rosa canina*) içeren yemlerle besledikleri gökkuşığı alabalıklarında çalışmamızda 4YA grubuna benzer olarak NBT'nin arttığını tespit etmişlerdir. Altunoglu, vd. (2017), yaptıkları çalışmada çörekotu (*Nigella sativa*) ile besledikleri gökkuşığı alabalıklarının NBT'lerinde önemi artışlar tespit etmişlerdir. Bilen, vd. (2016), ısırgan otu (*Urtica dioica*) ve istiridye mantarı (*Pleurotus ostreatus*) ile besledikleri gökkuşığı alabalıklarında benzer şekilde NBT miktarlarında artış gözlemlemiştir. Nilavan, vd. (2017) piperin içeren yemlerle besledikleri Hindistan sazanlarında (*Labeo rohita*) çalışmamızın 14. gününe benzer olarak NBT'lerinde artış gözlemlemiştir.

Lizozim peptid yapıda olup opsinin görevi görmektedir (Magnadottir, 2006). Lizozim bakterilerin hücre duvarlarını parçalayarak koloni oluşturmalarına engel olur (Alexander ve Ingram, 1992). Çalışmamızın 7. gününde 8AK grubu içerisinde

lizozim aktivitelerinde artış gözlenmiştir. Benzer şekilde Bilen vd. (2016), yaptıkları çalışmada ısırgan otu sulu metanolik özütü ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının lizozim aktivitelerinde önemli artışlar tespit etmişlerdir. Benzer olarak Altunoglu vd. (2017), yaptıkları çalışmada çörek otu sulu metanolik özütünün gökkuşağı alabalıklarının lizozim aktivitelerinde artış gözlemlemişlerdir. Çalışmamızın diğer gruplarına benzer olarak ise Hindistan sazanlarının piperin ile beslenmesi sonucu çalışmamıza benzer olarak lizozim aktivelerinde artış gözlenmemiştir (Nilavan vd. 2017). Vazirzadeh vd. (2017), *Ducrosia anethifolia* esansiyel yağları ile besledikleri gökkuşağı alabalıklarının lizozim aktivitelerinde bir değişim gözlememişlerdir. Çalışmamızdan farklı olarak Bilen ve Bulut (2010), defne yaprağı tozu ile besledikleri gökkuşağı alabalıklarının MPO aktivitelerinde bir değişim saptamamışlardır.

Myeloperoksidaz makrofajları (Grattendick vd. 2002) ve nötrofilleri uyaran ((Lau vd. 2005) önemli bir enzimdir. Bu hücrelerden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> salınımını hızlandırır. Çalışmamızda MPO aktiviteleri denem grupların kontrol grubuna göre azalma göstermiştir. Çalışmamızdan farklı olarak Bilen vd. (2016), istiridye mantarı ve ısırgan otu ile beslenen gökkuşağı alabalıklarında MPO aktivitelerinde önemli artışlar tespit etmişlerdir. Bilen, vd. (2016), kapari sulu metanolik özütü ile besledikleri gökkuşağı alabalıklarının MPO aktivitelerinde önemli artışlar tespit etmişlerdir.

IL-1  $\beta$ , savunma sisteminde saldırını başlaması ve doku hasarının oluşmasında moderatör görev almakta ve diğer sitokinlerin salgılanarak hücrelerin aktive edilmesinde rol oynarlar (Low vd. 2003). Bu çalışmada, çalışmanın 7 ve 14. günlerinde 8YA ve 4YA grupları içerisinde artış göstermiştir. Bu durum bağışıklık yanıtın aktif başladığına bir işarettir. Çalışmamıza benzer olarak Na-Phatthalung vd. (2018) yaptıkları çalışmada *Rhodomyrtus tomentosa* yaprak özütlerinin gökkuşağı alabalıklarında gen sunumlarını düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Yine benzer olarak, Altunoglu vd. (2017), çörek otu ile besledikleri gökkuşağı alabalıklarında, Bilen vd. (2016) kapari ile besledikleri gökkuşağı alabalıklarında IL-1 $\beta$  gen sunumlarının önemli derecede arttığını tespit etmişlerdir. *Ducrosia anethifolia* ile beslenen gökkuşağı alabalıklarında IL-1 $\beta$  gen sunumlarının arttığı tespit edilmiştir (Vazirzadeh vd. 2017)

IL-8 pro-inflamator sitokin olup inflamasyonu başaldığına önemli bir işaret ver markadır. Bununla birlikte bu çalışmada hiçbir örnekleme döneminde artış göstermemiş, gruplar arasında farklılık oluşmamıştır. Gökkuşığı alabalıkları lökositleri üzerinde *Rhodomyrtus tomentosa* özütünün gen sunumlarını redükte ettiği belirlenmiştir Na-Phatthalung vd. (2018). Bilen vd. (2016) kaparinin, Altunoglu vd. (2017) çörek otunun gökkuşığı alabalıklarının IL-8 gen sunumları önemli derecede arttırdığını tespit etmişlerdir.

IL-12 heterodimerik formda aktif olup peptit zincirlerine kovalent bağlanan ve hücre bazlı bağışıklık yanıtı kontrol eden sitokinlerdendir. Bu çalışmada, çalışmanın 7 ve 14. günlerinde 8YA ve 4YA gruplarına önemli derecede artmıştır. IL-12 gen sunumlarının çalışmamıza benzer olarak Altunoglu vd. (2017) yaptıkları çalışmada elde etkileri sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Şahan vd. (2017) kuşburnu unu ile besledikleri gökkuşığı alabalıklarında *Y. ruckeri* enfeksiyonuna karşı yaşama oranlarında önemli artışlar gözlemlemişlerdir. Bilen vd. (2016), çalışmamıza benzer olarak *A. hydrophila* enfeksiyonuna karşı ısırgan otunun sulu metanolik özütünün etkilerini inceledikleri çalışmalarında kontrol testlerinde yaşama oranlarında artış tespit etmişlerdir. Bundan farklı olarak Altunoglu vd. (2017) çörek otunun gökkuşığı alabalıklarında *A. hydrophila* enfeksiyonuna karşı koruma sağlamadığını tespit etmişlerdir. Yine çalışmamızdan farklı olarak Bilen vd. (2016) istiridye mantarı sulu metanolik özütü ile besledikleri gökkuşığı alabalıklarında yaşama oranlarının *A. hydrophila* enfeksiyonuna karşı yaşama oranını arttırmadığını tespit etmişlerdir. Baba vd. (2018), yaptıkları çalışmada *Olea europea* ile besledikleri gökkuşığı alabalıklarının *Y. ruckeri* enfeksiyonuna karşı yaşama oranlarını arttırdığını tespit etmişlerdir.

Sonuç olarak yüksek ardiç sulu metanolik özütü ile beslenen gökkuşığı alabalıklarının bağışıklık yanıtları üzerinde olumlu etkilerini olduğu ve buna ek olarak *Y. ruckerii* enfeksiyonuna karşı gökkuşığı alabalıklarında koruma sağladığı ve 14 günlük kullanımın uygun olacağı kanaatine varılmıştır. Özellikle balıklara yüksek ardicın 8 mg/balık olacak şekilde verilmesinin uygun olacağı tespit edilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Alexander, J.B., Ingram, G.A. 1992. Non-cellular and non-specific defense mechanisms of fish *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2, 249-280.
- Altunoğlu, Celik, Y., 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., Moritomo, T., Grooth, R. (1992). Neutrophil, glass-adherent, nitroblue tetrazolium assay gives early indication of immunization effectiveness in rainbow trout. [Veterinary Immunology and Immunopathology](#). 30(4), 419-429.
- Amer, S. A. (2016). Effect of *Spirulina platensis* as feed supplement on growth performance, immune response and antioxidant status of mono-sex Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Benha Veterinary Medical Journal*, 30(1), 1-10.
- Auroma, O.I. (1999). Freeradicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pasific J. Clin. Nutr.*, 8(1), 53-63.
- Awad, E., Mitchell, W.J., & Auatin, B. (2011). Effect of dietary supplements on cytokine gene expression in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*. 34, 629–634.
- Baba, E., Acar, Ü., Yılmaz, S., Zemheri, F., & Ergün, S. (2018). Dietary olive leaf (*Olea europea* 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.
- Bilen, S., Bulut, M. (2010). Effects of laurel (*Laurus nobilis*) on the non-specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Veterinary and Animal Advances*, 9(8), 1275-1279. DOI: 10.3923/javaa.2010.1275.1279
- Bilen, S., Bulut, M., Bilen, A.M., 2011. Immunostimulant effects of *Cotinus coggyria* on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology* 30, 451–455.
- Bilen, S., Bilen M. A., 2012. Tetra (*Cotinus coggyria*) ve Defne (*Laurus nobilis*) Bitkilerinin Alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) Büyüme Teşvik Edici Etkileri. *Alınteri, Zira Bilimler Dergisi*, 22(B): 26-33.
- Bilen, S., S. Yılmaz, and A. M. Bilen. 2013. Influence of Tetra (*Cotinus coggyria*) extract against *Vibrio anguillarum* infection in koi carp, *Cyprinus carpio* with

- reference to haematological and immunological changes. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 13:527–532.
- Bilen, S., Yılmaz, S., Bilen, A.M., Biswas, G., 2014a. Effects of dietary incorporation of tetra (*Cotinus coggygia*) extract on immune response and resistance to *Aeromonas hydrophila* in koi Carp (*Cyprinus carpio*). *Isr. J. Aquacult. Bamidgeh* 66, 1–6.
- Bilen, S., Soydaş, E., & Bilen, A. M. (2014). Isırgan otunun (*Urtica dioica*) metanolik özütünün japon balıklarının (*Carassius auratus*) doğal olmayan bağışıklık yanıtı üzerine etkileri. *Alınleri Zirai Bilimler Dergisi*, 27(2), 24-28.
- Bilen, S., Bilen, A.M., Önal, U. (2015). The effects of oxygen supplementation on growth and survival of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in different stocking densities. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 14(3), 538-545.
- 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. Ünal, H. Güvensoy. (2016a). 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 (2016) 90e94.
- Bilen, S., Altunoğlu, Ç.Y., Ulu, F., Biswas, G. (2016b). Innate immune and growth promoting responses to caper (*Capparis spinosa*) extract in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 57, 206-212. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.08.040.
- 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.
- Citarasu, T. (2010). Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture international*, 18(3), 403-414.
- C. Low, S. Wadsworth, C. Burrells, C.J. (2003). Secombes Expression of immune genes in turbot (*Scophthalmus maximus*) fed a nucleotide-supplemented diet *Aquaculture*, 221 , pp. 23-40
- Çelikkale, M.S. (1982). Kafeslerde Alabalık Yetiştiriciliğinde Değişik Stok ve Yemleme Tekniklerinin Karşılaştırılması, Ankara Üniversitesi Basımevi.

- Çelikkale, M. S. (1998). İç Su Balıkları Yetiştiriciliği, Cilt 1, Birinci Baskı, K.T.Ü. Basımevi, Trabzon.
- Dafre, A.L., Reischl, E. (1990). High hemoglobin mixed disulfide content in hemolysates from stressed shark. *Comp. Biochem. Physiol.* 96(B), 215–219.
- Davies, K.J.A., (2000). An overview of oxidative stres. *IUBMB Life.* 50, 241-244.
- Deniz, H. (2007). Aquaculture development in Turkey, Aquaculture and Fisheries Infoday and N Event, 14-15 November 2007, Brussels.
- Diler, Ö., Görmez, Ö., Terzioğlu, S., Atabay, A. (2018). Pelin Otunun (*Artemisia vulgaris* L) Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) Hastalıklara Karşı Direnç Ve Spesifik Olmayan Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkisi. *Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Reaserch*, 4(1), 1-11.
- Düğenci K.S., Arda N. ve Candan A., (2003). Some Medicinal Plants As Immunostimulant for Fish. *Journal of Ethnopharmacology*, 88: 99–106.
- Ekici, S., Diler, Ö., Didinen, B.I. ve Kubilay, A. (2010). Balıklardan İzole Edilen Bakteriyel Patojenlere Karşı Bazı Bitkisel Uçucu Yağlarının Antibakteriyal Aktivitesi. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Dergisi*, 17(A): 47– 54.
- Ghareghanipoor, M. ., Akbary, P., Akhlaghi, M., Fereidouni,M.S. (2014). Non-specific immune responses and immune related genes expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*,Walbaum) fed zataria multiflora boiss extract. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*,3 (5), 140-146.
- Giannenas, I., Triantafillou, E., Stavrakakisa, S., Margaronic, M., Mavridis, S., Steinere, T., Karagounic, E. (2012). Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 350–353, 26–32.
- Grattendick, K., Stuart, R., Roberts, E., Lincoln, J., Lefkowitz, S. S.,Bollen, A., ... & Lefkowitz, D. L. (2002). Alveolar macrophage activation by myeloperoxidase: a model for exacerbation of lung inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 26(6), 716-722.
- Gültepe, N., Bilen, S., Yılmaz, S., Güroy, D., Aydın, S., (2014). Effects of herbs and spice on health status of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) challenged with *Streptococcus iniae*. *Acta Vet. Brno.* 83, 125–131.
- Güner, Y., Güleç, F., İkiz, M., Kayaci, A (2014) . General view to turkish carp (*C. carpio*) production 67. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 7 (2), 66-69.

- Kiriş, G.A., Dikel, S. 2002. Fiber tank ve beton havuza yerleştirilmiş ağ kafeslerdeki gökkuşağı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) besi performansları ve karkas kompozisyonları. E. U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences. 19 (3-4): 371–380.
- Komatsu, K., Tsutsui, S., Hino, K., Araki, K., Yoshiura, Y., Yamamoto, A., Nakamura, O., & Watanabe, T. (2009). Expression profiles of cytokines released in intestinal epithelial cells of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in response to bacterial infection. *Developmental and Comparative Immunology*. 33, 499–506.
- Lagon, S. H., Johnston, W. E. 1992. Economics of commercial trout production, *Aquaculture*, 100: 25-46.
- Lau, C. M., Broughton, C., Tabor, A. S., Akira, S., Flavell, R. A., Mamula, M. J., ...& Marshak-Rothstein, A. (2005). RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *Journal of Experimental Medicine*, 202(9), 1171-1177.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. [Methods](#). 25(4), 402-408.
- Madhuri, S., Mandloi, A.K., Govind, P. & Sahni, Y.P., (2012). Antimicrobial activity of some medicinal plants against fish pathogens. *International Research Journal of Pharmacy*, 3, 28-30.
- Magnadottir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*. 20, 137-151.
- Manoppo, H., Tumbol, R. A., Manurung, U. N (2015) . Incorporation of baker's yeast cells as immunostimulant in feed enhance resistance of nile tilapia to aeromonas hydrophila. *International Journal of Pharm Tech Research*, 8(5), 797-802.
- Msangi, S., Kobayashi, M., Batka, M., Vannuccini, S., Dey, M. M., Anderson, J. L. (2013). Fish to 2030: prospects for fisheries and aquaculture. *World bank report*, (83177-glb),80,1-25.
- Na-Phatthalung, P., Teles, M., Voravuthikunchai, S.P., Tort, L., Fierro-Castro, C. (2018). Immunomodulatory effects of *Rhodomyrtus tomentosa* leaf extract and its derivative compound, rhodomyrtone, on head kidney macrophages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 44(2), 543–555.
- Nilavan, E. S., Raman, R. P., Srivastava, P. P., Basha, K. A., Kumar, K., Kumar, A., ... & Kumar, S. (2017). Dietary Piperine Improves Haemato Immunological

- Parameters, Growth Profiles And Resistance Against *Aeromonas Hydrophila* In *Labeo Rohita* (Hamilton, 1822). *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 32(3/4), 189-203.
- Pandey, G., Madhuri, S., Mandloi, A. K. (2012). Medicinal plants useful in fish diseases. *Pl. Arch*, 12(1), 1-4.
- Peteri, A., Nandi, S., Chowdhury, S. N. (1992). Manual on seed production of carps. *Fisheries and Aquaculture Department Rome*. 59.1-8.
- Quade, M.J., Roth, J.A. (1997). A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 19;58(3-4), 239-48.
- Raida, M.K., Buchmann, K., Development of adaptive immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) surviving an infection with *Yersinia ruckeri*. *Fish & Shellfish Immunology*. 25, 533–541.
- Rao, Y. V., Das, B. K., Jyotirmayee, P., Chakrabarti, R. (2006). Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish shellfish immunology*, 20(3), 263-273.
- 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.
- Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172(1), 63-92.
- Sigh, J., Lindenstrøm, T., & Buchmann, K. (2004). 2004, The parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* induces expression of immune relevant genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*. 27, 409–417.
- Siwicki A. K., Anderson, D.P. (1993). Immunostimulation in fish: measuring the effects of stimulants by serological and immunological methods. Pages 1–24 in A. K. Siwicki, and D. P. Anderson, editors. *The Nordic Symposium on Fish Immunology*, Lysekil, Sweden.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout effects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41,125-139.
- Şahan, A., Duman, S., Çolak, S. Ö., Çınar, E., Bilgin, R. (2017). Determination of some hematological and non-specific immune defences, oxidative stress and histopathological status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed rosehip (*Rosa canina*) to *Yersinia ruckeri*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17,91-100.

Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinari medicina*, 56(10), 486-503.

URL.2. *Yüksek ardiç bitkisi* 01.06.2018 tarihinde <http://www.euforgen.org/species/juniperus-excelsa/> adresinden alınmıştır.

URL.2. 01.06.2018 tarihinde <http://www.ardic.gen.tr/ardic-bitkisi.html> adresinden alınmıştır.

Vazirzadeh, A., Dehghan, F., Kazemeini, F. 2017. Changes in growth, blood immune parameters and expression of immune related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to diet supplemented with *Ducrosia anethifolia* essential oil. *Fish & Shellfish Immunology*. 69, 164-172.

Watanuki H., Ota K., Tassakka A.R.A.C.M., Kato T. ve Sakai M., 2006. Immunostimulant Effect of Dietary *Spirulina platensis* on Carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 258: 157-163.

Yiğit, M., Aral, O. 1999. Gökkuşığı Alabalığının (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792) Tatlısu ve Denizsuyundaki Büyüme Farklılıklarının Karşılaştırılması. *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*. 23:53-59

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Selçuk İSPİR  
Doğum Yeri ve Yılı : Kastamonu - 1984  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce  
E-posta : selcukispir@gmail.com



### **Eğitim Durumu**

Lise : Kastamonu Kuzeykent Lisesi  
Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sinop Su Ürünleri Fakültesi