T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*) ÜRETİMİNDE KENEVİR TOHUMU YAĞININ (*Cannabis sativa*) İMMUNOSTİMULANT POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ

Mohamed Elsayed A. SALEH

Danışman	**Dr. Öğr. Üyesi Şükrü Şenol PARUĞ**
Jüri Üyesi	**Doç. Dr. Soner BİLEN**
Jüri Üyesi	**Dr. Öğr. Üyesi Gökhan ARSLAN**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANA BİLİM DALI

KASTAMONU – 2019

TEZ ONAYI

Mohamed Elsayed A. SALEH tarafından hazırlanan " **Gökkuşağı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Üretiminde Kenevir Tohumu Yağının (*Cannabis sativa*) İmmunostimulant Potansiyelinin 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	Dr. Öğr. Üyesi Şükrü Şenol PARUĞ Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Soner BİLEN Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Gökhan ARSLAN Atatürk Üniversitesi	.....

20/06/2019

Enstitü Müdürü	Prof. Dr. Hasbi YAPRAK	.....

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.

Mohamed Elsayed A. SALEH



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhynchus mykiss*) ÜRETİMİNDE KENEVİR TOHUMU YAĞININ (*Cannabis sativa*) İMMUNOSTİMULANT POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ

Mohamed Elsayed A. SALEH
Kastamonu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Ana Bilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi. Şükrü Şenol PARUĞ

Bu çalışmada kenevir tohumu (*Cannabis sativa*) yağının, gökkuşağı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) bağışıklık yanıtına ve büyüme performansına etkisini araştırmak amaçlanmıştır. Bu sebeple balıklar 4 farklı gruba (Kontrol, % 0,5, % 1 ve % 2) ayrılarak 60 gün boyunca beslenmişlerdir. Çalışmanın sonunda büyüme performansı, sindirim enzimi aktivitesi, oksidatif radikal üretimi, lizozim ve myeloperoksidaz gibi humoral immün yanıtları ve ayrıca IL-1, IL-8, IL-10 ve IL-6'yı içeren sitokin gen ekspresyonu araştırılmıştır.

Çalışmada K0.5 grubu diğer tüm gruplara göre en yüksek büyümeyi göstermiş olup ($P < 0.05$), FCR, K0.5 grubunda anlamlı olarak azalmış ve SGR en yüksek değere ulaşmıştır. Oksidatif radikal üretimi, çalışmanın 30. gününde diğer gruplardan daha yüksek bulunmuştur. Tripsin K0.5 ve K1 grupları için 30. günde ve K1 grubu için ise çalışmanın 60. gününde anlamlı olarak artış göstermiştir ($P<0.05$). Pepsin aktivitesinde de bu duruma benzer sonuçlar gözlenmiştir. Herhangi bir deney grubundaki amilaz aktivitesi ve herhangi bir örnekleme süresi arasında fark gözlenmemiş olup, 60. gündeki oksidatif radikal üretiminde hiçbir fark gözlenmemiştir. Lizozim, çalışmanın 30. gününde tüm deney gruplarında, kontrole kıyasla anlamlı olarak azalmıştır. Miyeloperoksidaz çalışmanın 30. gününde, K1 ve K2 gruplarında, kontrol ve K0,5 gruplarına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. K2 grubunda Böbrek IL-1β gen ekspresyonu diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük çıkmış olup, bağırsak K1 ve K2 gruplarında yine diğer gruplara göre anlamlı şekilde azalma meydana gelmiştir. Çalışmanın 60. gününde, K2 grubunda IL-1 gen ekspresyonunda artış saptanmıştır. IL-8 için, K0.5 ve K2 gruplarında, her iki örnekleme zamanı böbreklerde diğer gruplara kıyasla daha fazla regüle edildi ($P < 0.05$). Bağırsakta, K0.5 için 30. günde ve K1 için çalışmanın 60. gününde IL-8 gen ekspresyonun yükseldiği tespit edilmiştir. Hem böbrek hem de barsakta IL-10 gen ekspresyonunda benzer sonuçlar gözlendi. 30. günde böbrekte K0.5 ve kontrol grubu için 60. gününde K2 grubuna kıyasla anlamlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Aeromonas hydrophila ile kontrol testine tabi tutulan balıkların yaşama oranlarında kontrol grubuna kıyasla hiçbir fark görülmemiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, balık yemine % 0,5 oranında kenevir tohumu yağı ilavesi önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: Gökkuşağı alabalığı, kenevir tohumu yağı, sindirim enzimleri, bağışıklık yanıt, sitokin yanıtlar

2019, 45 sayfa
Bilim Kodu:1207

ABSTRACT

MSc. Thesis

IMMUNOSTIMULANT POTENTIAL OF CANNABIS (*Cannabis sativa*) SEED OIL IN RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*) CULTURE

Mohamed Elsayed A. SALEH
Kastamonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Aquaculture

Supervisor: Assistant Prof. Dr. Şükrü Şenol PARUĞ

The study was performed to examine the efficacy of dietary cannabis seed oil (*Cannabis sativa*) on the immune response and growth performance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. With this aim, fish were divided into 4 different groups containing control (0%), 0.5% (K0.5), 1% (K1) and 2% and fed with the diets during 60 days. At the end of the study, growth performance, digestive enzyme activity, humoral immune responses such as oxidative radical production, lysozyme and myeloperoxidase, and also cytokine gene expression including IL-1β, IL-8, IL-10 and IL-6 were investigated.

In the study, K0.5 group showed highest growth compared to all other groups ($P<0.05$). FCR was significantly decreased in K0.5 group and SGR was determined the highest. Oxidative radical production was determined higher that other groups at the 30^{th} day of the study. Trypsin was significantly increased on K0.5 and K1 30^{th} day and on K1 6oth day of the study ($P<0.05$). Similar results were observed on pepsin activity. No differences were observed on amylase activity in any experimental groups and any sampling time. No differences were observed on 60^{th} days' oxidative radical production. Lysozyme was significantly decreased on all experimental groups compare to control eth the 30^{th} day of the study. Myeloperoxidase was determined higher on K1 and K2 groups compared to control and K0.5 at the 30^{th} day of the study. Kidney IL-1β expression was up-regulated on K2 group compared to all other groups significantly decreased in intestine on K1 and K2 groups. 60^{th} day of the study, increased IL-1β expression was determined on K2 group. IL-8 was up-regulated on K0.5 and K2 groups compared to other groups both sampling time ($P<0.05$) in kidney. In intestine, K0.5 at he 30^{th} day, and on K1 group at the 60^{th} day of the study IL-8 gene expression was elevated. Similar results were observed on IL-10 gene expression in both kidney and intestine. was significantly up-regulated on K0.5 at the 30^{th} day, and K2 group at the 60^{th} day of the study compared to control group in kidney. IL-6 was upregulated on K2 group compared to control both sampling time ($P<0.05$).

No differences were observed on survival rate s on the groups compared to control challenged with *Aeromonas hydrophila*. According to results of the study, addition of cannabis seed oil into fish feed at the rate of 0.5 % could be recommended.

Key Words: Rainbow trout, cannabis seed oil, digestive enzyme, immune responses. cytokine responses

2019, 45 pages
Science Code:1207

TEŞEKKÜR

Tez çalışması boyunca yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Ş. Şenol PARUĞ'a, saha ve laboratuvar çalışmalarındaki katkılarından dolayı Doç. Dr. Soner BİLEN, Arş. Gör. O. Nezih KENANOĞLU ve Arş. Gör. Yiğit TAŞTAN'a, ve son olarak da bu süreçte manevi desteğini hiç eksik etmeyen sevgili eşim ve aileme teşekkürü borç bilirim.

Mohamed Elsayed A. SALEH
Kastamonu, Haziran, 2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ ONAYI ……..	ii
TAAHHÜTNAME ……	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
GRAFİKLER DİZİNİ.....	xiii
TABLOLAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Su Ürünleri Yetiştiriciliği	1
1.2. Yağ Asitlerinin Bağışıklık Sistemindeki Önemi	2
1.3. Kenevir'in (Cannabis sativa) Genel Özellikleri.....	3
1.4. Çalışmanın Amacı	4
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM	9
3.1. Materyal.....	9
3.1.1. Balık Materyali	9
3.1.2. Deneme Alanı	9
3.2. Yöntem.....	9
3.2.1. Kenevir Tohumu Yağının Çıkarılması	9
3.2.2. Kenevir Tohumu Yağ Asidi Analizi.....	10
3.2.3. Büyüme Performansı Verileri.....	10
3.2.4. Bağışıklık Yanıtların Belirlenmesi	10
3.2.4.1. NBT Yöntemi	10
3.2.4.2. Lizozim Analizi.....	11
3.2.4.3. Myeloperoksidaz (MPO) Tayini.....	11
3.2.4.4. Gen Sunumlarının Belirlenmesi	11
3.2.4.4.1. Total RNA izolasyonu.....	11

3.2.4.4.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi 12
3.2.4.4.3. Quantitative RT-PCR 12
3.2.5. Sindirim Enzimleri 13
3.2.5.1. Tripsin 13
3.2.5.2. Amilaz 14
3.2.5.3. Pepsin 14
3.2.6. Deney Düzenlemesi 15
3.2.7. İstatistiksel Analizler 15
4. BULGULAR 16
4.1. Yağ Asidi Profili 16
4.2. Büyüme Performansı Verileri 17
4.3. İmmun Yanıtlarda Meydana Gelen Değişimler 18
4.3.1. NBT Yöntemi 18
4.3.2. Lizozim Aktivitesi 19
4.3.3. Myeloperoksidaz Aktivitesi 20
4.3.4. Gen Sunumları 21
4.3.4.1. IL-1β 21
4.3.4.2. IL-8 23
4.3.4.3. IL-10 24
4.3.4.4. IL-6 26
4.3.5. Sindirim Enzimleri 28
4.3.5.1. *Tripsin* 28
4.3.5.2. *Pepsin* 29
4.3.5.3. *Amilaz* 30
4.3.6. Kontrol testi sonuçları 31
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 33
KAYNAKLAR 37
ÖZGEÇMİŞ 45

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

O_2	Oksijen
^{o}	Derece
%	Yüzde

Kısaltmalar

C	Santigrat
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleikasit
EDTA	Etilen-diamin-tetra-asetat
FAO	Food and Agriculture Organization
g	Gram
kg	Kilogram
l	Litre
LYS	Lizozim
mg	Miligram
ml	Mililitre
MPO	Myeloperoksidaz
NBT	Nitroblue Tetrazolium
OH^-	Hidroksit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
TOS	Toplam Oksidan Durum
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu
U	Unite
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Çalışmada kullanılan kenevir tohumu…… 4

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa

Grafik 4.1. Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarında oksidatif radikal üretimlerinde meydana gelen değişimler 18
Grafik 4.2. Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarında lizozim aktivitelerinde meydana gelen değişimler..... 18
Grafik 4.3. Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarında myeloperoksidaz aktivitelerinde meydana gelen değişimler 19
Grafik 4.4. Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarının böbreklerinde IL-1β gen sunumlarında meydana gelen değişimler 21
Grafik 4.5. Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarında IL-1β gen sunumlarında meydana gelen değişimler. 22
Grafik 4.6. Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarının böbreklerinde IL-8 gen sunumlarında meydana gelen değişimler .. 23
Grafik 4.7. Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarında IL-8 gen sunumlarında meydana gelen değişimler. 24
Grafik 4.8. Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarının böbreklerinde IL-10 gen sunumlarında meydana gelen değişimler. 25
Grafik 4.9. Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarında IL-10 gen sunumlarında meydana gelen değişimler 26
Grafik 4.10.Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarının böbreklerinde IL-6 gen sunumlarında meydana gelen değişimler... 27
Grafik 4.11.Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarında IL-6 gen sunumlarında meydana gelen değişimler. 28
Grafik 4.12.60 gün boyunca farklı oranlarda kenevir tohumu yağı içeren yemlerle beslenen gökkuşağı alabalıklarının tripsin aktivitelerinde meydana gelen değişimler (U/mg protein)..... 29
Grafik 4.13.60 gün boyunca farklı oranlarda kenevir tohumu yağı içeren yemlerle beslenen gökkuşağı alabalıklarının pepsin aktivitelerinde meydana gelen değişimler (U/mg protein)..... 30
Grafik 4.14.60 gün boyunca farklı oranlarda kenevir tohumu yağı içeren yemlerle beslenen gökkuşağı alabalıklarının amilaz aktivitelerinde meydana gelen değişimler (U/mg protein)..... 31
Grafik 4.15.*Aeromonas hydrophila* enfeksiyonu ile intraperitonal olarak enfekte edilen deneme gruplarının yaşama oranları (%). 32

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan primerler.....	12
Tablo 4.1. Kenevir uçucu yağ asitleri	16
Tablo 4.2. Çalışma sonunda elde edilen büyüme performansı verileri.....	17

1. GİRİŞ

1.1. Su Ürünleri Yetiştiriciliği

Su ürünleri sektörü dünyada en hızlı gelişen sektörler arasında yer almakta, gıda sektörlerinde ise en başı çekmektedir. Bu hızlı büyümenin nedeni deniz ürünlerinin dünya çapında yüksek talep görmesinden kaynaklı olduğu bilinmektedir (Ragnar ve Mohammad, 2012). Büyüme yıllık olarak % 7.7 üzerinde gerçekleşmekte ve lokomotifi de Asya oluşturmaktadır (Trygve, Nick ve Morten, 2012). FAO istatistiklerine bakıldığında 2030 yılında akuakültür toplam üretiminin 187 milyon tona ulaşacağı öngörülmektedir (Msangi vd., 2013). Yine Akuakültür sektörü benzer bir büyüme ivmesi gösterdiği taktirde, üretim miktarının 2020 yılı dahilinde 132 milyon ton balık ve kabuklu deniz hayvanları ve 43 milyon ton su yosunu olacağı düşünülmektedir (Trygve vd., 2012).

Su ürünlerinin, artan nüfus ve ekonomik büyümeye bağlı artan talebi karşılayabilmesi, uygulama alanları, ihracat fırsatlarında yarattığı avantajlar ile doğrudan tüketilebilen geleneksel gıdalara göre pek çok avantajı mevcuttur.

Doğa ve canlı ile direk ilişkili olan su ürünleri sektöründe bakteri, virüs ve parazitlere bağlı hastalıklar handikap olarak karşımıza çıkabilmektedir bu durum balık üretimini kısmen veya tamamen sınırlayıcı olabilmektedir. Ayrıca stok yoğunluğu, ani sıcaklık değişimi, kötü su kalitesi ve yetersiz besleme gibi fakörlere bağlı olarak balıklar üzerinde stres yaratıcı ve balıkların bağışıklık sistemlerini olumsuz yönde etkileyici durumlar söz konusu olabilmekte, dolayısıyla hastalıklara bağlı ani kayıplar meydana gelebilmektedir (Kocabaş vd., 2013). Ekonomik kayıplara yol açabilecek bu durumun önüne geçebilmek için farklı veteriner ilaçları, antimikrobiyal ilaçlar yerinde ve zamanında kullanılarak tedavi edici özelliklerinden faydalanılmakta, hatta katkı maddesi olarakda kullanılarak koruyucu önlemler alınmasını sağlamaktadır (Reverter, Bontemps, Lecchini ve Banaigs, 2014).

Bunun yanında kimyasal immünostimulantlara artan direnç ile birlikte rezidü problemleri ortaya çıkmakta olup en son çalışmalarda balık hastalıklarının tedavisi ve bağışıklık sistemlerini güçlendirmek için bitkilerden elde edilen ürünlerin kullanımı çok etkili olmaktadır. Bitkisel immünostimulantlar yan etkisizdir ve son zamanlarda organik tarımda tercih edilmektedir.

1.2. Yağ Asitlerinin Bağışıklık Sistemindeki Önemi

Bağışıklık sistemi, temel olarak yabancı patojenlere ve hücrelerin kendi içlerinde meydana getirdiği saldırılara karşı vücudun kendini savunma mekanizmasıdır (Schley ve Field, 2002). Temelde tüm balıkların bağışıklık sistemi yüksek organizmalara benzerlik göstermektedir (Uribe, Folch, Enriquez ve Moran, 2011). Bağışıklık sistemin temelinde hücreler ve buna bağlı olarak humoral etkenler bulunmakta ve bu durum kazanılmış ve doğuştan gelen olarak iki farklı alanda değerlendirilmektedir (Hoar, Randall, Iwama ve Nakanishi 1997 1995). Temelde bağışıklık yanıtlar hücrelerin fagozite edilmesi veya antimikrobiyal moleküllerin salınması ile oluşmaktadır. Bu bağlamda sistem antibakteriyal peptitler ve tanımlayıcı reseptörleri içermektedir (Kimbrell ve Beutler 2001; Werling ve Jungi 2003).

Genel olarak beslenme ile ilgili balıkların bağışıklık sistemi değerlendirildiğinde birçok araştırmanın ve bulgunun E ve C vitamini ve minarelerin etkileri üzerinde yoğunlaştığını göstermektedir (Pulsford, Crampe, Langston ve Glynn 1995). E vitamini balıklarda bağışıklık sistemini düzenleyici önemli bir rol oynamakta, serbest radikallerin yıkılarak proteinlerin, yağ ve hücre membranlarınn okidatif hasardan korunmasında önemli bir etki gösterdiği bilinmektedir (Tocher et al., 2002). C vitamini antikor üretimini, serum lizozim seviyesini ve makrofaj fonksiyonunu arttırmada önemli olup aynı zamanda stresin iyileştirilmesinde önemli role sahip olduğu bilinmektedir (Hardie ve ark., 1991; Li ve Lovell, 1985; Fletcher, 1997)

Tüm bunlara rağmen özellikle balıkların bağışıklık yanıtının gelişmesinde yağ asitlerinin de çok önemli etkileri bulunmaktadır ve bu çok etmenlidir (Kiron, Fukuda, Takeuchi ve Watanabe 1995). Örneğin araşidonik asitin yüksek organizmalarda lenfosit aktivasyonunu tetiklediği bilinmektedir (Gershwin et al., 1985). Balıkların

esansiyel yağ asidi ihtiyaçları türlere göre farklılık göstermekle birlikte, kesin sonuçlar elde edilememiştir.

Balık hastalıklarını kontrol edebilecek antibiyotik, aşı ve immunostimülant kullanımı gibi bazı yöntemlerin olmasına karşın, antibiyotiklerin kullanımı toksisite, maliyet ve bazı kısıtlamaların vuku bulması gibi çeşitli sorunlar meydana getirebilmektedir. Özellikle gıda olarak tüketilen su ürünlerinde antibiyotik kalıntısı insan sağlığı için tehlikeli seviyelerde birikim gösterebilmektedir (Manoppo, Tumbol ve Manurung, 2015).

Aşılara ve kemoterapötik maddelere ek olarak immunostimülantların kullanılması su ürünleri yetiştiriciliğinde yaygın bir şekilde kabul görmekte olup, doğal ve adaptif savunma mekanizmalarını arttıran immunostimulantların (Rao, das,, Jyotyrmayee ve Chakrabarti, 2006) henüz bütün enfeksiyon hastalıklarına karşı savunma yeteneği olup olmadığı hala tam olarak bilinmemektedir (Sakai, 1999).

Bakteriyel sentez, hayvan ve bitki bileşimi gibi çeşitli maddelerin akuakültürde immunostimülant olarak kullanılabileceğini bildiren pek çok çalışma bulunmakta olup, birçok geleneksel tıbbi bitki akuakültürdeki farklı hastalıklardan sakınabilmek için ve tedavi edebilmek için kullanılmaktadır (Ghareghanipoor vd., 2014).

Doğal bitkiler bağışıklığın arttırılması ve uyarılması, enfeksiyonların engellenmesi gibi durumların oluşmasına yardımcı olmasının yanı sıra su ürünlerinde büyüme artışı ve antistres özelliği gösterebilmesini teşvik etmektedir (Pandey vd., 2012). Doğal tıbbi bitkiler içerebildikleri alkaloid, fenolik, terpenoit, steroit ve önemli yağlar gibi içeriklerinden dolayı karides yetiştiriciliğinde antimikrobik özellik gösterebilmektedirler (Citarasu, 2010).

1.3. Kenevir'in *(Cannabis sativa*) Genel Özellikleri

Isırganlar familyasından olan *Cannabidae* familyası üyesi bir bitki türü olan 1-4 m uzunluğa erişebilen kenevir (*Canabis sativa*) içeriğinde bulunan ^3'lük tetrahidrokanabinol ile uyuşturucu olarak kullanılan türlerden farklılık gösterir. Üretimleri sırasında böcek ilacı kullanımını gerekli kılmayan kenevir toprağın

havalandırılmasına yardımcı olmasının yanında ayrıca soya ve mısıra göre daha ekonomik olması özelliğiyle ekilebilirliğini cazip hale getirmektedir.



Şekil. 1.1. Çalışmada kullanlan kenevir tohumu

1.4. Çalışmanın Amacı

Günümüzde su ürünleri üretimi alanında balıkların hastalıklardan kaynaklanan kayıplarının giderilmesinde özellikle immunostimulant, probiyotik ve prebiyotik türevleri kullanılarak çözüm üretilmeye çalışılmaktadır. Bu bakış açısı özellikle yağ asitlerinin balık bağışıklığındaki önemli etkilerinin belirlenmesi ile beslenmede tıbbi amaçlı kullanılan yağlardan kenevirin soğuk sıkım yağının gökkuşağı alabalıklarında bağışlık yanıtları ve büyüme performansı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlama farklı oranlarda kenevir yağı içeren yemlerle beslenen alabalıkların ilgili değerleri tespit edilmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

Su ürünlerinde balık üretiminde kullanılan birçok katkı maddesi yer almaktadır. Bu katkıların bir kısmı balıkların mineral dengelerinin sağlanmasında kullanıldığı gibi yemlerin oksidasyona maruz kalarak küflenmesini engellemek için de kullanılmaktadır (Bilen ve Bilen, 2012). Buna ek olarak yeni çalışmalarda tıbbi bitkilerin katkı maddesi olarak kullanıldığı çalışmalara rastlanmakta ve ayrıca balık yemlerinde kullanılan farklı yağ içeriklerine ait çalışmalar bulunmaktadır. Bu bağlamda kullanılan bitki yağları ve literatür özeti aşağıda özetlenmiştir.

Bilen ve ark., (2014) ısırgan otunun (*Urtica dioica*) metanolik özütünü japon balıklarının (*Carassius auratus*) bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmada 0,1 ve 0,5 g/kg yem olacak şekilde özütün iki farklı konsantrasyonunu japon balığı yemi içerisine katarak denemişlerdir. 30 gün boyunca söz konusu yemlerle beslenen balıkların tüm bağışıklık yanıtları kontrol grubuna göre kayda değer artış göstermiştir. Söz konusu çalışmada en yüksek bağışıklık yanıt % 0,5 ısırgan otu içeren grupta meydana geldiğini belirten ($P<0.05$) Bilen ve ark., (2014), ısırgan otu özütünün japon balıkları için etkili bir bağışıklık uyarıcı olduğu sonucuna varmışlardır.

Isırgan otu (*Urtica dioica*), ökse otu (*Viscum album*), ve zencefil (*Zingiber officinale*) sulu ekstraktlarının, alabalık bağışıklığı üzerinde etkilerini araştıran Düğenci ve ark., (2003), ilgili ekstraktları % 0,1 ve % 1 oranında yemlere katarak 21 gün boyunca balıkların beslenmesinde denedikleri çalışmalarında zencefil ile beslenen balıkların bağışıklık sisteminde kayda değer bir değişiklik olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca 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 da eklemişlerdir.

Tetra (*Cotinus coggygria*) metanolik özütünü koi balıklarında (*Cyprinus carpio*) kontrol, 0,5, 1, 1,5 g kg^{-1} 3 farklı dozda deneyen Bilen ve ark., (2013), söz konusu ekstrakt dozlarının *Vibrio anguillarum* enfeksiyonuna karşı etkinliğini incelemişlerdir. Bilen ve ark., (2013), çalışma sonucunda 1,5 g kg^{-1} tetra grubundaki NBT değerlerini en yüksek bulmuşlardır. Bilen ve ark., (2013), tetra grubundaki

balıklarda lizozim ve myeloperoksidaz aktivitelerini kontrol grubuna göre kayda değer oranda yüksek buldukları çalışmada (P<0,05) 1 g/kg tetra grubunda hemoglobin ve akyuvar konsantrasyonlarını yüksek bulmuşlardır (P<0,05).

Kapari otunu *(Capparis spinosa)* gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) deneyerek spesifik olmayan immun aktivitesine ve büyüme performansına etkisini araştıran Bilen ve ark. (2016), gebre otu metanolik özütünü 0,1 ve 0,5 g/kg dozlarında yeme ekleyerek serumda fagozitik, lizozim ve myeloperoksidaz aktivitelerini incelemişlerdir. Bilen ve ark. (2016), iki deneme grubunun kontrol grubuna göre fagozitik aktiviteyi arttırdığı ve deneme gruplarının arasında ise önemli bir farklılık olmadığını; lizozim ve myeloperoksidaz aktivitelerine en yüksek 0,1 g/kg grubunda rastlandığını belirtmişlerdir.

Sazan balıklarındaki (*Cyprinus carpio*) bağışıklık çalışmalarıyla Watanuki ve ark. (2006), yeme 1, 10 ve 25 mg/kg olacak şekilde *Spirulina platensis* katmışlar ve spirulinanın immunostimülant etkisini araştırmışlardır. 1, 3 ve 5. günlerde yaptıkları bağışıklık testleri neticesinde, *S. platensis*'in tüm gruplarda fagozitik aktiviteyi ve böbrekteki fagozitik hücrelerin süperoksid üretimini arttırdığını tespit etmişlerdir. Watanuki ve ark. (2006), sazan balıklarında *S. platensis* 'in bağışıklık sistemini uyarıcı etkileri olduğu sonucuna varmışlardır.

Bilen ve ark. (2015) istiridye mantarını (*Pleurotus ostreatus*) ve ısırgan otunu (*Urtica dioica*) gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) deneyerek *Aeromonas hydrophila'ya* karşı immun sistemi güçlendirici özelliği araştırdıkları çalışmalarında, kavak mantarı ve ısırgan otu özütlerini 0,1 ve 0,5 g/kg olacak şekilde yeme ilave etmişlerdir. Fagozitik aktivitenin tüm deneme gruplarında arttığı çalışmada, NBT (oksidatif radikal salınımları) verilerinin tüm deneme gruplarında kontrol grubuna göre artış gösterdiği 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^{-1} lık grupta rastlamışlardır.

Altunoğlu ve ark. (2017), bağışıklığı destekleyici özelliği olduğunu düşündükleri çörek otunu (*Nigella sativa*) gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) 0,1 ve 0,5 g/kg olacak şekilde 30 gün boyunca denemişler, 0,5 g/kg lık grupta NBT değerinin en yüksek olduğuna rastlamışlardır. Altunoğlu ve ark. (2017), lizozim ve

myeloperoksidaz aktivitelerini ise deneme gruplarında kontrol grubuna göre önemli derecede yükseliş gösterdiğini belirtmişlerdir.

Ekici ve ark. (2010), melisa (*Melissa oleum*), kekik (*Origanum vulgaris*), biberiye (*Rosmarinus officinalis*), karabaş (*Lavandulae romanae oleum*) ve zencefil (*Zingiber officinale*) gibi bitkisel uçucu yağları, *Vibrio alginolyticus, Aeromonas hydrophila, Vibrio anguillarum, Yersinia ruckeri, Lactococcus garvieae* ve *Flavobacterium psychrophilum* gibi çeşitli bakteriyel patojenler üzerinde deneyerek in vitro ortamda antibakteriyel etkinliğini araştırmışlardır. Sonuç olarak melisa ve kekik uçucu yağlarının diğer bitkisel yağlara oranla daha güçlü bir antimikrobiyal etki gösterdiğini ve kekik yağının etki spektrumunun geniş olduğunu bulmuşlardır.

%0,5 ve %1 dozlarında Akdeniz defnesini (*Laurus nobilis*) gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) deneyen Bilen ve Bulut (2010), çalışmalarının etkinliğini spesifik olmayan bağışıklık sistemi parametrelerinden oksidatif radikal salınımı, lizozim aktivitesi ve toplam plazma protein seviyelerini araştırarak incelemişlerdir. Sonuç olarak söz konusu parametreler için kontrol grubuna göre herhangi bir değişiklik olmadığını ($P>0,05$) fakat fagositik aktivitenin her iki deneme grubu içinde kontrol grubuna göre önemli derece arttığını tespit etmişlerdir ($P<0.05$).

Gültepe ve ark. (2014) çemen otunu (*Trigonella foenum graecum*), biberiye (*Rosmarinus officinalis*) ve bahçe kekiği (*Thymus vulgaris*) %1 seviyesinde 45 gün boyunca tilapia (*Oreochromis mossambicus*) balıklarında denemişlerdir. Deneme gruplarında hematokrit, fagozitik aktivite, nötrofil, monosit, beyaz kan hücresi ve kırmızı kan hücresi seviyelerinde önemli artış gözlemlemişlerdir ($P<0.05$). 45. gün sonunda *Streptococcus iniae* ile kontrol testine tabi tutulan balıklarda gruplara göre sırasıyla bahçe kekiği, biberiye ve çemen otu için kümülatif ölüm oranları %22, %27 ve %31 şeklinde iken kontrol grubunda %61 olarak bulmuşlardır.

Bilen ve ark. (2014), koi sazanlarında (*Cyprinus carpio*) denedikleri Tetra (*Cotinus coggygria*) özütünün *Aeromonas hydrophila* bakterisine karşı immun yanıtını ve direncine olan etkisini araştırdıkları çalışmalarında, tetra içeren yem gruplarını 0,5, 1 ve 1,5 g/kg olacak şekilde dizayn etmişlerdir. Bilen ve ark. (2014), NBT değerlerini tüm deneme gruplarında kontrol grubuna göre yüksek oranda bulunmuşken, sırasıyla deneme gruplarında 1,5, 0,5 ve 1,0 g/kg için bu değerin artış gösterdiğini tespit

etmişlerdir. Lizozim ve myeloperoksidaz değerleri yine kontrol grubuna göre önemli derecede artış göstermişken bu değer için sıralamanın 1,5, 1,0 ve 0,5 şeklinde olduğunu sonucuna varmışlardır.

Pelin otunun (*Artemisia vulgaris*) gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) bağışıklık yanıta ve *Vibrio anguillarum*'a karşı direnç sağlayan uygun dozlarını araştıran Diler ve ark. (2017), %0, %0,1, %0,5, %1, %2 oranında pelin otunu balıkların yemlerine toz ve 250 ve 1000 mg/kg etanol ekstraktı olarak ilave edip immünolojik yanıtı değerlendirmişlerdir. Lizozim, oksidatif radikal salınımı ve fagositik aktivitenin kontrol grubuna göre arttığını tespit ederek yemlere ilave edilmesinin balık immun sistemini olumlu yönde etkileyerek ve *V. anguillarum*'a karşı direnci arttırdığını, böylece immünostimülant olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Bilen ve ark. (2011), gökkuşağı alabalıklarında bağışıklığı destekleyici etkisini araştırdıkları tetranın (*Cotinus coggyria*) 0,5 ve 1 mg/kg dozlarında hücre içi ve hücre dışı oksidatif radikal salınımını, lizozim ve fagositik aktivitelerini, toplam plazma protein seviyelerini her iki deneme grubu için kontrol grubuna göre önemli derecede arttırdığı sonucuna varmışlardır ($P<0,05$). Spesifik olmayan bağışıklık sistemi parametrelerine en yüksek %0,1 olan grupta rastlamışlardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Balık Materyali

Çalışmada kullanılan balıklar, 2018 yılında Germeçtepe İç Su ve Deniz Balıkları Üretim, Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde üretimi yapılan gökkuşağı alabalıklarından temin edilmiştir. Çalışmada başlangıç ağırlığı ortalama 17,23±0,39 gr olan gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792) Su Ürünleri Fakültesi Kapalı Devre Sisteminde yer alan herbiri 500 L olan 12 farklı dairesel tanka rastgele 40' adet olacak şekile stoklanmıştır.

3.1.2. Deneme Alanı

Deneme, Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Kapalı Devre Sisteminde 60 gün boyunca yürütülmüş ve örneklemelerden elde edilen veriler Su Ürünleri Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda deney prosedürlerine tabi tutulmuştur.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kenevir Tohumu Yağının Çıkarılması

Tıbbi aromatik özelliği olan kenevir tohumu (*Cannabis sativa*) yağı soğuk sıkım elde edilmiştir. Bunun için öncelikle 40 ºC'den düşük sıcaklıkta kenevir tohumları kurutulmuş ve sonrasında öğütülmüştür. Öğütme işleminin ardından hiçbir ısıya maruz kalmadan preslenerek yağlar, yağ toplama oluklarında toplanmıştır. Yağ sıkımından sonra posalar atılmış, toplanan yağlar ise 2 ile 7 gün arasında dinlenmeye bırakılmıştır. Dinlenen yağdaki katı tabaka hareket ettirilmeden, kağıt veya bez filtrelere gönderilir. Bu aşamada süzülen yağlar berraklığına kavuşur.

3.2.2. Kenevir Tohumu Yağ Asidi Analizi

Analizimizde Rtx-5MS kapiler kolon (30m·0.25 mm; kaplama kalınlığı 0.25 μm) ile donatılmış GC-MS QP2010 Ultra (Shimadzu) kullanılmıştır. Numuneler, cihazda mevcut olan otomatik enjektör ile kolona verilmiştir.

3.2.3. Büyüme Performansı Verileri

Balıkların denemenin başlangıcından sonra 15., 30., 45. ve 60. günlerdeki ağırlıkları kayda alınarak büyüme performansları izlenmiştir. Yemin ete dönüşüm oranı (FCR), spesifik büyüme oranı (SGR) ve ağırlık artışları (WG) hesaplarak deneme gruplarının büyüme performansları kontrol grubuna göre karşılaştırılmıştır.

3.2.4. Bağışıklık Yanıtların Belirlenmesi

Çalışmada bağışıklık yanıtların belirlenmesi için balıklardan kan örnekleri alınmış ve bu kan örneklerinden humoral yanıtlar belirlenmiştir. Sitokin genlerin, gen sunumlarının belirlenmesi için ise böbrek ve bağırsak örnekleri alınmıştır. Bu örneklemeler her 30 ve 60. günde yapılmıştır. Kan örneklerinin alındığı esnada 0°C'de tutulmuş ve kandan NBT tespitine müteakip serumlar alınarak lizozim ve myeloperoksidaz aktivite sonuçları belirlenmiştir. Gen sunumları için alınan örnekler dokuların bozulmaması için hemen 100 µl RNA later solüsyonu içine alınmış ve +4°C'de bekletildikten sonra -80°C'de gene ekspresyonu çalışmasının yapılacağı güne kadar saklanmıştır.

3.2.4.1. NBT Yöntemi

NBT indirgenmesi yöntemi kullanılarak (Siwicki ve Anderson, 1993) oksidatif radikal salınımları tespit edilmiştir. Bunun için 0,1 ml kan örnekleri alınarak, % 0,2 NBT içeren 0,1 ml solüsyon ile karıştırılmıştır. 24 ºC'de 30 dk bekletilen bu karışımın aktivasyonu durdurabilmek için cam tüplere aktadıktan sonra 1 ml N,N-dimethilformamid eklenmiştir. 4000 rpm de 5 dk santrifüj edilerek partiküller süspansiyondan ayrılmıştır. Bu karışım spektrofotometrede 540 nm optik densititede N,N-dimethil formamid kör örneğine karşı okunmuştur.

3.2.4.2. Lizozim Analizi

Serum lizozim aktivitesi, 1 tablet fosfat tamponlu tuz (PBS) ve 0.02 g *Micrococcus lysodeicteus* bakterisinin 100 ml saf su da çözülmesiyle elde edilen karışım ve 40 µl serum eklenmiş ve 530 nm'de 0. ve 4. dakikalarda okutmaları yapılmıştır (Ellis, 1990).

LİZOZİM = [(ilk okuma-son okuma)*1000] / serum miktarı= U/µl

3.2.4.3. Myeloperoksidaz (MPO) Tayini

Plazmadaki toplam MPO içeriği Quade ve Roth (1997) ve Cuesta vd. (2002) yöntemlerin modifiye edilmesiyle yapılmıştır. İlk olarak 1 tablet fosfat sitrat 100 ml saf suda çözülerek bir çözelti hazırlanmıştır. Sonrasında 1 tablet tetramethilbenzidin dihidroklorür ilk hazırlanan çözeltiden 10 ml alınarak çözülmüştür. Daha sonra 370 µl Hank's Balanced Solüsyonu (HBSS) 30 µl serum ile karıştırılmış ve okutmandan hemen önce karışım çözeltiden 100 µl üzerine eklenmiştir. 0. ve 4. dakikalarda 450 nm'de okutmaları gerçekleştirilerek aşağıdaki formüle göre hesaplamaları yapılmıştır.

MPO = Absorbans farkı * 1906,4 = U/ µl

3.2.4.4. Gen Sunumlarının Belirlenmesi

Çalışmada her 30 ve 60. günlerinde balıkların bağırsak ve ön böbrek dokuları alınarak bu dokulardan önce Total RNA ve daha sonra cDNA sentezlenmiş ve ölçümleri yapılmıştır. Uygun primerler ile gökkuşağı alabalıklarının gen sunumları tespit edilmiştir.

3.2.4.4.1. Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu BIOLINE kit (ISOLATE II RNA Mini Kit) kullanılarak üretici firma protokollerine göre yapılmıştır. Kısaca, RNA izolasyonu için yaklaşık 30 mg bağırsak ve böbrek örneği alınmıştır. Örnekler 500 µl Trizol içerisinde homojenizatör kullanılarak süspanse edilmiştir. Bu örneklerden üretici protokolüne göre santrifüj adımları uygulanarak Total RNA elde edilmiş, saflığı ve konsantrasyonu Multiscan GO (Thermo Scientific, USA) kullanılarak tayin edilmiştir. Miktarı tayin edilen

örnekler 15 ng/µl olacak şekilde seyreltilmiş ve cDNA hazırlamada kullanılmıştır. Örnekler kullanılmadıkları esnada -80°C'de saklanmıştır.

3.2.4.4.2. Komplementer DNA (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 TM cDNA Synthesis Kit) kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. Bu işlemde 1 µg seyreltimiş 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 içeremeyen 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.

3.2.4.4.3. Quantitave 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-1β	F5'ACCGAGTTCAAGGACAAGGA 3' R5' CATTCATCAGGACCCAGCAC 3'	181	Awad ve ark. 2011
IL-8	F5'CACAGACAGAGAAGGAAGGAAAG3' R5'TGCTCATCTTGGGGTTACAGA 3'	162	Awad ve ark. 2011

Tablo 3.1 'ın devamı

IL- 6	F5'CAAGGATGCTTGTCTACGAAGG R5'GCTCTTTGATCAGGATGTTGCT	137	Awad ve ark. 2011
IL-10	F5' CGACTTTAAATCTCCCATCGAC 3' R5'GCATTGGACGATCTCTTTCTTC 3'	70	Raida ve Buchmann 2008

qRT-PCR karışımı 12.5 µL of 2× SYBR Green Master Mix, 0.1 µg of şablon DNA, 0.4 µM spesifik genlerin ileri ve geri primerleri (IL-1β, IL-8, IL-6, IL-10, ve referans olarak β-aktin) ve 20 µL nükleaz içermeyen su ile tamamlanarak hazırlanmıştır. qRT-PCR adımları sırasıyla: 95 °C'de 5 saniye denaturasyon sonrasında tavlama ve uzatma safhalarını içeren 60 °C'de 10 saniye tutulmuş ve bu işlem 45 döngü olarak yapılmıştır. Bunun akabinde örnekler 95 °C denatüre edilmiş ve 65 °C'de tutulmuştur. Floresan sinyaller 530 nm dalga boyunda 60 °C'den 95 °C'ye her 1 saniyede 0.5 °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. ΔC_T ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir.

ΔC_T = C_T hedef gen - C_T referans gen

$\Delta\Delta C_T$ = ΔC_T Uygulama yapılmış örnek - ΔC_T kontrol örneği

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

3.2.5. Sindirim Enzimleri

3.2.5.1. Tripsin

Tripsin aktivitesi, substrat olarak N-a-benzoil-dlarginin-p-nitroanilid (BAPNA) ile ölçülmüştür. BAPNA (50 mM Tris-HCl içinde 1 mM, pH 8.2, 20 mM kalsiyum klorür, $CaCl_2$) 37 °C'de enzim özütü (bağırsak homojenatı) ile inkübe edilmiş ve absorbans 0 dk ve 10 dk'da 410 nm'de kaydedilmiştir (Erlanger, Kokowsky ve Cohen, 1961). Absorbans sonucu = son sonuç – ilk sonuç / 10 dk

Tripsin aktivitesi (U/mg protein) = (absorbans sonucu X 113.6363) / (2 X mg protein)

3.2.5.2. Amilaz

Amilaz aktivitesi, substrat olarak %2 nişasta (Sigma Aldrich) kullanılarak Worthington (1991) ve Wang, Guo, Bureau ve Cui (2006)'ya göre değerlendirilmiştir. Nişasta substratı pH 6.9, 0.02 M sodyum dihidrojen fosfat, NaH2P04, 0.006 M sodyum klorür ve NaCl içeren bir tamponda seyreltilmiştir. Substrat (250 ul), 25 °C'de 3-4 dakika süreyle bağırsak homojenatı (50 ul) ve tampon çözeltisi (250 ul) ile inkübe edilmiştir. Daha sonra 0.5 ml %1 dinitrosalisilik asit (DNS) çözeltisi ilave edilmiş ve 5 dakika kaynatılmıştır. Kaynama işleminden sonra, karışıma 5 ml damıtılmış su eklenmiş ve soğutulmuş çözeltinin absorbansı 540 nm'de kaydedilmiştir. Referanslar aynı şekilde hazırlanmış ancak ham enzim özleri ilave edilmemiştir.

Amilaz aktivitesi (U/mg protein) = {[(A numune – A blank)^2 X 7.712] – [1.082 X (A numune – A blank)] + 0.082} / mg protein

3.2.5.3. Pepsin

Midede homojen olarak ölçülen pepsin aktivitesi, substrat olarak 0.06 N hidroklorik asit (HCl) içindeki% 2'lik hemoglobin (Sigma-Aldrich) kullanılarak Worthington (1993)'e göre yapılmıştır. Bunun için, 0.01 N HCI içinde 100 ul enzim özütü (homojenat) ve 500 ul substrat, 10 dakika boyunca 37 ° C'de inkübe edilmiştir. Reaksiyon, 1 ml% 5 trikloroasetik asit (TCA; Sigma-Aldrich) ilavesiyle durdurulmuş ve 5 dakika süreyle 12000 rpm'de santrifüj işleminden önce 5 dakika için bekletilmiştir. Absorbans değerleri (A) 280 nm'de ölçülmüştür. Referans (blank) olarak enzim ekstraktı eklenmeden önce substrat olarak TCA eklenmiştir. Spesifik aktivite (U) ifadesi:

Pepsin aktivitesi (U/mg protein) = [(A numune - A blank) X 1000] / (10 dk X mg protein)

3.2.6. Deneyin Düzenlemesi

Çalışmanın süresi göz önüne alındığında yaşanabilecek doğal kayıplardan dolayı her tanka 40 adet balık konulacaktır. 1 adet kontrol grubu ve 3 adet deneme grubu olmak üzere 3 tekerrürlü deney düzeneği kurulacak ve dolayısıyla 12 adet tankta toplam 480 balık kullanılacaktır. Çalışmanın her 30 gününde tanklardan 5'er adet balık alınarak yüksek dozda karanfil yağı ile bayıltılacaktır. Kan parametrelerini incelemek amacıyla bayıltılan balıkların kaudal venalarından enjektör yardımıyla kan örnekleri alınacak ve doku örnekleri almak amacıyla ötanazi uygulanacaktır. Sindirim enzimi aktiviteleri ve uzun süreli bağışıklık yanıt değişikliklerini gözlemlemek için ötanazi uygulanan balıklardan mide, bağırsak, karaciğer ve ön böbrek dokuları alınacaktır. Ayrıca büyüme performanslarının değerlendirilmesi için çalışma süresince her 15 günde bir balıklar karanfil yağı ile bayıltılacak, ağırlıkları ölçülüp tanklara geri koyulacaktır.

3.2.7. İstatistiksel Analizler

Microsoft Office Excel programı ile denemede elde edilen bütün verilerin ortalama ve standart hata (±SE) değerleri hesaplamıştır. 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. Yağ Asidi Profili

Çalışma sonunda elde edilen ve çalışmada yemlere farklı oranlarda katılan kenevir yağının yağ asidi profili Tablo 4.1. de verilmiştir.

Tablo 4.1. *Kenevir uçucu yağ asitleri*

% Oran	İsim
0,64	Tridecane
0,46	Phthalate <diethyl->
0,89	9-Octadecyne
0,46	2,5-Methano-1H-inden-7(4H)-one, hexahydro- (CAS)
0,43	2,4-Decadien-1-ol, (E,E)- (CAS)
1,99	2,4-Dodecadiene, (E,Z)-
6,13	2,4-Dodecadiene, (E,Z)-
4,04	2,4-Dodecadiene, (E,Z)-
2,47	2,4-Dodecadiene, (E,Z)-
0,29	Tetradecanal
0,43	Spiro[2.4]heptane, 1,5-dimethyl-6-methylene-
1,41	Neophytadiene
1,04	Hexadecanoic acid, methyl ester
1,57	9,17-Octadecadienal, (Z)-
1,22	cis,cis,cis-7,10,13-Hexadecatrienal
0,69	(Z)6,(Z)9-Pentadecadien-1-ol
1,00	(Z)6,(Z)9-Pentadecadien-1-ol
4,16	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester
3,02	9,12-Octadecadienoyl chloride, (Z,Z)-
0,46	2-Nonadecanone
1,59	1H-Purin-6-amine, [(2-fluorophenyl)methyl]- (CAS)
0,47	1,E-8,Z-10-Hexadecatriene
2,05	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-
2,33	Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-, cis- (CAS)
0,44	Palmitoyl chloride
0,90	Citrate <tributyl-> acetate
0,64	13-Octadecenal, (Z)-
48,65	Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1,3-propanediyl ester (CAS)
8,52	Eicosanoic acid, 2-ethyl-2-methyl-, methyl ester
0,30	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester (CAS)
0,70	6-Nitro-cylohexadecane-1,3-dione
0,33	(R)-(-)-14-Methyl-8-hexadecyn-1-ol
0,29	Octadecanoic acid, 2-hydroxy-1,3-propanediyl ester
100,00	

4.2. Büyüme Performansı Verileri

Çalışma sonunda elde edilen büyüme performansı verileri Tablo 4.2. de özetlenmiştir.

Tablo 4.2. *Çalışma sonunda elde edilen büyüme performansı verileri*

	BOA	BiOA	TY	KTA	YDO	SBO	AK(%)
Kontrol	17,01±0,1	62,57±0,2 [b]	1645±3,5	1697,26±2,36	0,97±0,1 [a]	2,17±1,1	267,84±3,24
K0,5	16,70±0,1	67±1,03[a]	1681,54±2,69	1810,89±2,54	0,93±0,01 [b]	2,32±0,87 [a]	301,19±4,25 [a]
K1	17,71±0,1	65,13±1,01 [b]	1707,26±4,12	1766,59±4,12	0,97±0,09 [a]	2,17±0,9	267,84±1,87
K2	17,50±0,1	62,74±0,9 [b]	1604,98±5,73	1621,52±1,57	0,99±0,1 [a]	2,13±0,5	258,54±4,17

BOA: Başlangıç Ortalama Ağırlık, BiOA: Bitiş Ortalam Ağırlık, TY: Tüketilen yem, KTA: Kazannılan Toplam Ağırlık, YDO: Yem Değerlendirme Oranı, SBO: Spesifik Büyüme Oranı, AK: Ağırlık Kazanımı.

60 günlük deneme sonunda başlangıç ağırlıkları ortalama 17 gr olan gökkuşağı alabalıklarının çalışma sonunda ortalama ağırlıkları K0,5 grubunda 67±1,03, K1 grubunda 65,13±1,01, K2 grubunda 62,74±0,9 ve en düşük olarak da kontrol grubunda 62,57±0,2 olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonunda en düşük ağırlık kontrol grubunda elde edilmiş olmakla birlikte, en yüksek değer K0,5 grubunda gözlenmiştir. K0,5 grubu diğer tüm gruplar kıyaslandığında son ağırlık değeri önemli derece farklı bulunmuştur ($P<0,05$). Bununla birlikte diğer gruplar arasında bir farklılık gözlenmemiştir ($P>0,05$).

Yem Değerlendirme Oranı (YDO), en düşük olarak K0,5 grubunda gözlenmiştir (0,93±0,01). Bu elde edilen değer diğer gruplarla kıyaslandığında kayda değer derecede önemli bulunmuştur ($P<0,05$). Bundan farklı olarak diğer tüm grupların YDO değerleri benzerlik göstermiştir ($P>0,05$). Spesifik Büyüme Oranı (SBO), K0,5 gruplarında diğer gruplara oranla önemli derecede yüksek bulunmuştur ($P<0,05$). Bununla birlikte diğer gruplar arasında önemli bir farklılık tespit edilememiştir ($P>0,05$). Benzer sonuçlar Ağırlık kazanımı içinde geçerlidir. K0,5 grubunun ağırlık kazanımı diğer tüm gruplara kıyasla önemli derecede artış göstermiştir ($P>0,05$).

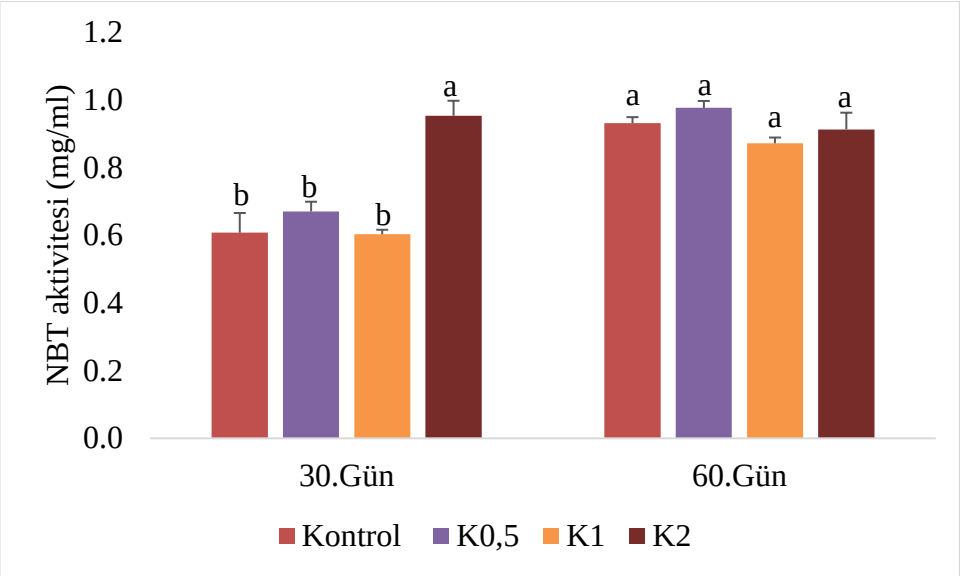
4.3. İmmun Yanıtlarda Meydan gelen Değişimler

Yapılan denemenin her 30 ve 60. günlerinde balıklardan kan örnekleri alınarak humoral yanıtlar ve buna ek olarak böbrek, bağırsak ve dalak örnekleri alınarak da hücresel yanıtlar tespit edilmiştir.

4.3.1. NBT yöntemi

Denemenin 30 ve 60. günlerine balıkların oksidatif radikal salınımları NBT yöntemi ile tespit edilmiştir. Bu bağlamda sonuçlar Grafik 4.1.'de verilmiştir.

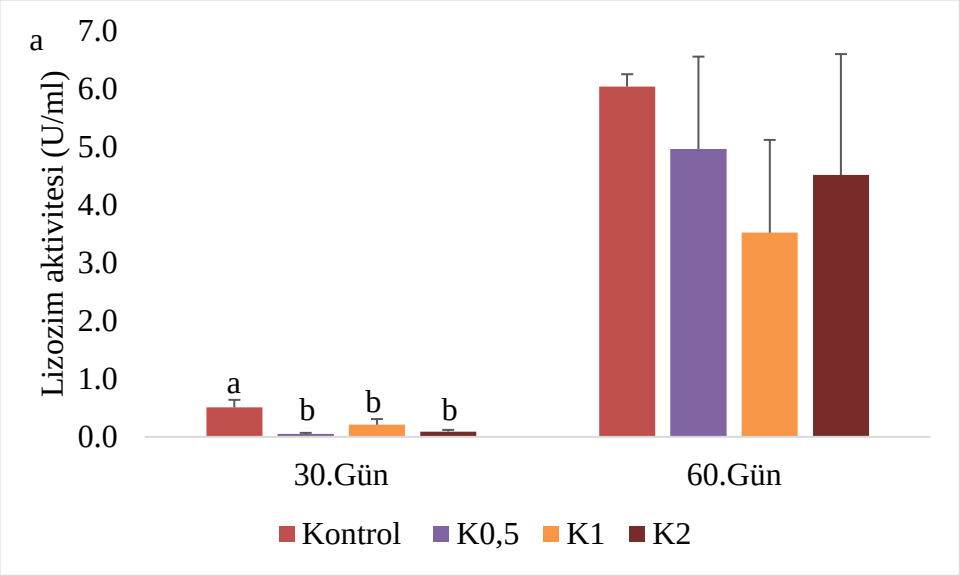
Çalışmanın 30. gününde balıkların oksidatif radikal salınımları kontrol grubun da 0,61±0,05 mg/ml, K0,5 grubunda 0,67±0,02 mg/ml ve K1 0,60±0,01 mg/ml olarak tespit edilmiş olup bu gruplar arasında bir farklılık tespit edilememiştir. Bundan farklı olarak K2 grubunun NBT değeri 0,95±0,04 mg/ml olarak tespit edilmiş olup diğer tüm gruplar kayda değer oranda yüksek olmuştur. Çalışmanın 60. gününde tüm grupların oksidatif radikal salınımları benzerlik göstermiş ve gruplar arasında bir farklılık tespit edilememiştir (P>0,05).



Grafik 4.1. Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarında oksidatif radikal üretimlerinde meydana gelen değişimler (mg/ml) Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme dönemi kendi aralarındaki farklılığı ifade eder. (n=4)

4.3.2. Lizozim Aktivitesi

Denemenin 30 ve 60. günlerine balıkların lizozim aktivitesinde meydana gelen değişimler Grafik 4.2.'de verilmiştir.

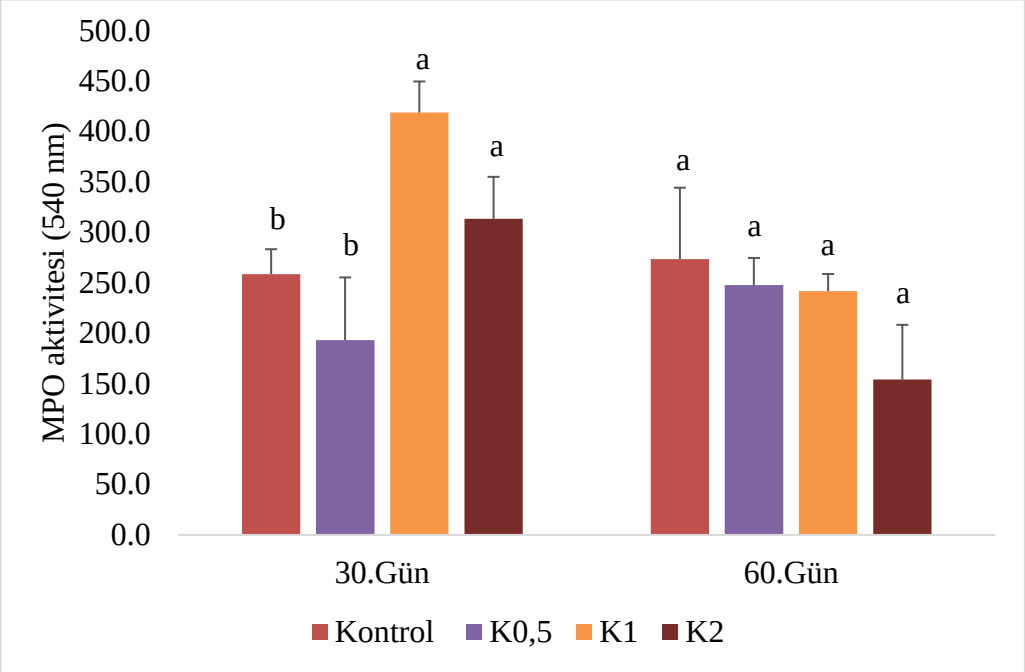


Grafik 4.2. Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarında lizozim aktivitelerinde meydana gelen değişimler (U/ml). Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.(n=4)

Bu sonuçlara göre çalışmanın 30.gününde lizozim aktiviteleri kıyaslandığında tüm deneme grupların lizozim aktiviteleri (K0,5, K1 ve K2 sırasıyla 0,0485±0,02, 0,209±0,09, 0,0915±0,02) kontrol grubuna (0,5±0,12) kıyasla önemli bir azalma göstermiştir ($P<0,05$). Çalışmanın 60. Gününde ise gruplar arasında lizozim miktarı kontrol grubunda 6,037±0,21, K0,5 grubunda 4,961±1,58, K1 grubunda 3,518±1,59 ve K2 grubunda 4,5115± 2,08 olarak tespit esilmiş olmakla birlikte gruplar arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir ($P>0,05$).

4.3.3. Myeloperoksidaz aktivitesi

Çalışma sonunda elde edilen myeloperoksidaz aktivitesi sonuçları Grafik 4.3'te verilmiştir.



Grafik 4.3. Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarında myeloperoksidaz aktivitelerinde meydana gelen değişimler (540 nm). Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

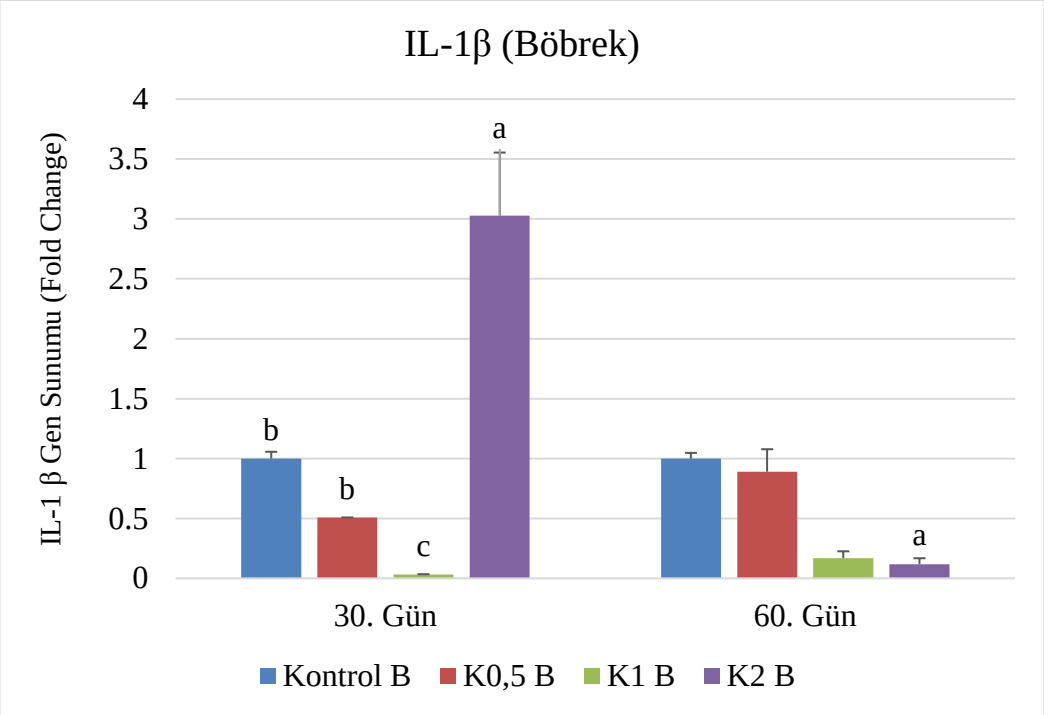
Çalışmanın 30. gününde K1 ve K2 gruplarının myeloperoksidaz (MPO) aktiviteleri kontrol ve K0,5 grubunun MPO aktivitesine kıyasla kayda değer derecede artış göstermiştir ($P<0,05$). Bununla birlikte bu iki grup arasında farklılık tespit edilememiştir. Çalışmanın 60. gününde ise en yüksek MPO aktivitesi sırasıyla kontrol (258,6±70,87), K0,5 (247,59±27,01), K1 (241,68±17,06), ve K2 (154,04±54,26) gruplarında gözlenmiştir bu farklılıklara rağmen gruplar arasındaki söz konusu değişkenlik istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($P>0,05$).

4.3.4. Gen Sunumları

Çalışmanın 30 ve 60. günlerinde balıkların böbrek ve bağırsak dokuları alınmış ve bu dokulardan önce Total RNA izole edilmiştir. Total RNA 'lardan cDNA sentezi yapılmıştır. Son olarak bu cDNA örneklerinden IL-1β, IL-8, IL-10 ve IL-6 genleri belirlenmiştir.

4.3.4.1. IL-1β

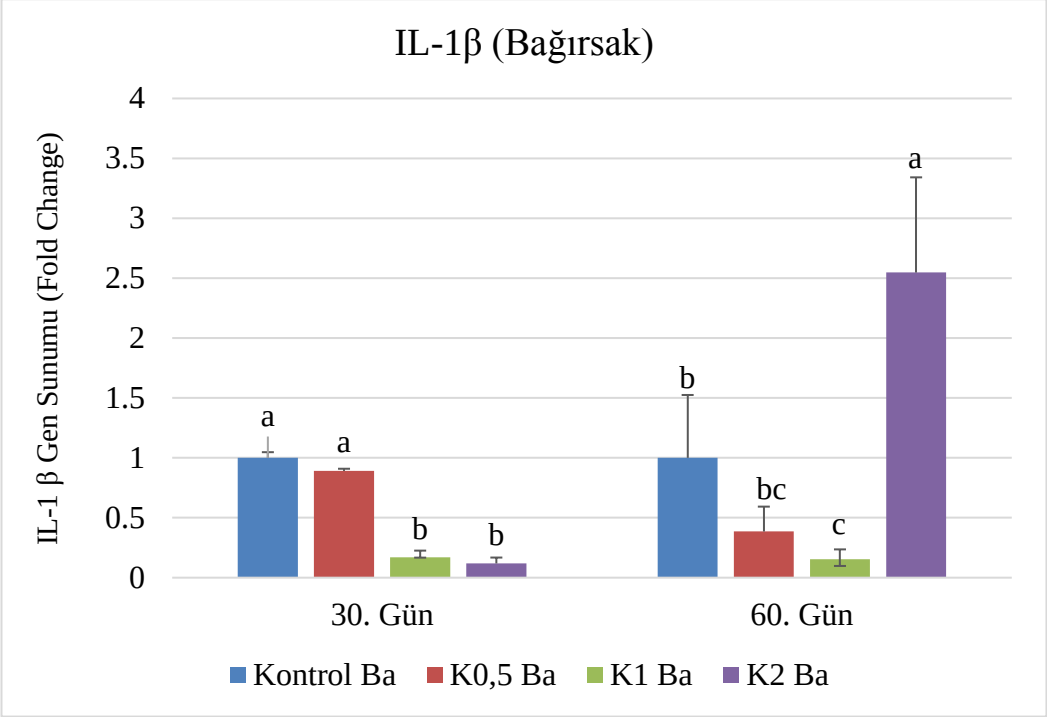
Denemenin 30 ve 60. günlerinde balıkların böbrek ve bağırsaklarında alınan doku örneklerinde IL-1β gen sunumları tespit edilmiştir. Böbrek örneklerinde yapılan test sonuçları Grafik 4.4.'te verilmiştir.



Grafik 4.4. Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarının böbreklerinde IL-1β gen sunumlarında meydana gelen değişimler (Katlama Değişimi). Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

Bu sonuçlara göre IL-1β gen sunumu, böbreklerde kontrol, K0,5 ve K1 grupları arasında farklılık göstermezken (P>0,05), bunlardan farklı olarak K2 grubunun IL-1β gen sunumu kayda değer şekilde artmıştır. Çalışmanın 60. ününde benzer sonuçalr elde edilmiştir.

Çalışmanın 30 ve 60. günlerinde bağırsaklarda meydan gelen IL-1β aktivitesi Grafik 4.5'te verilmiştir.

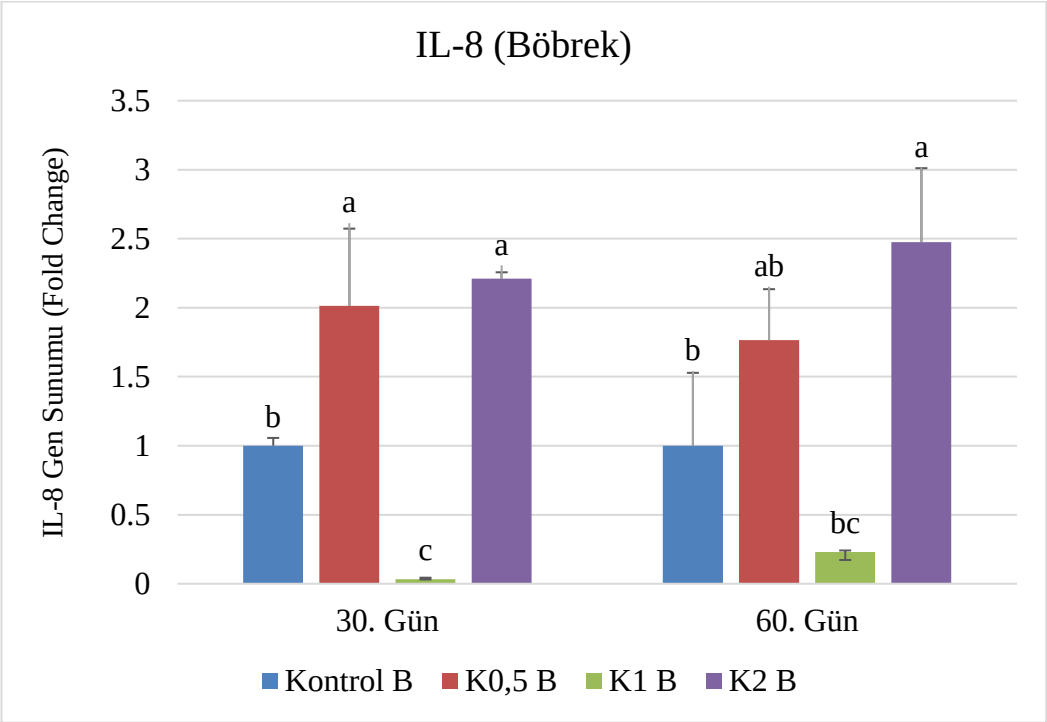


Grafik 4.5. Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarında IL-1β gen sunumlarında meydana gelen değişimler (Katlama Değişimi). Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

Çalışmanın 30. gününde bağırsaklarındaki IL-1β gen sunumları kontrol ve K0,5 grubu arasında farklılık göstermezken bunlardan farklı olarak K1 ve K2 gruplarında önemli derecede azalmıştır (P<0,05). Çalışmanın 60. gününde ise K2 grununda önemli deredece artmıştır.

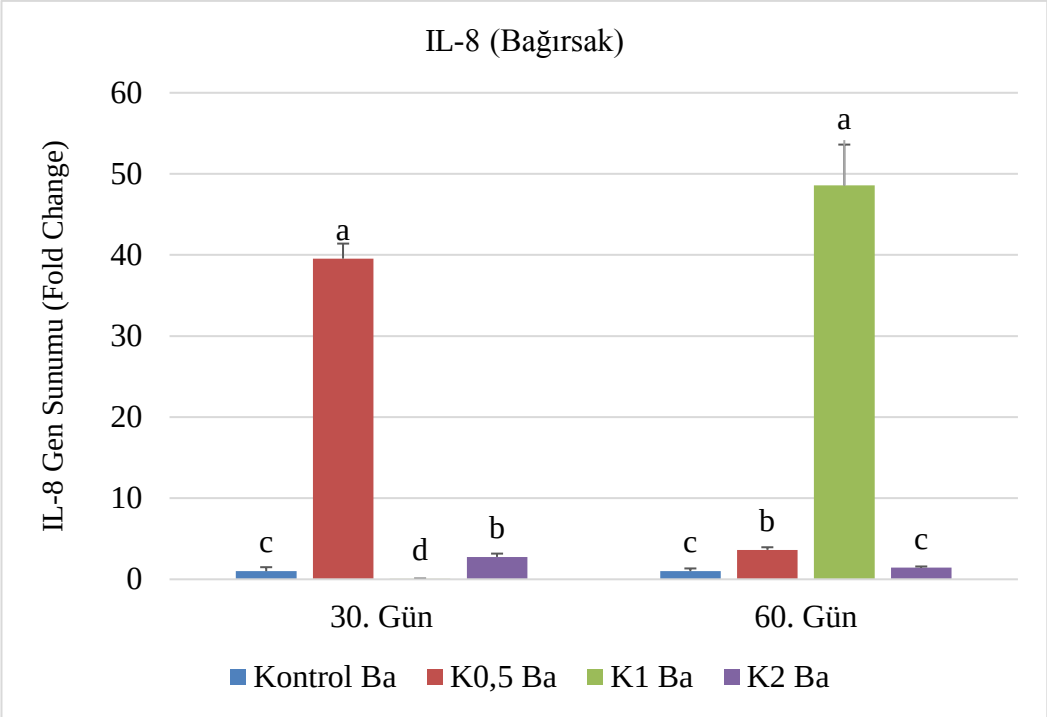
4.3.4.2. IL-8

Çalışmanın 30 ve 60. günlerinde gökkuşağı alabalıklarının böbrek ve bağırsaklarından elde edilen IL-8 gen sunumları Grafik 4.6 ve 4.7.'de verilmiştir. Çalışma sonunçlarına göre K0,5 ve K2 grubunun IL-8 aktivitesi diğer deneme gruplarına kıyasla artış göstermiştir (P<0,05). Bununla birlikte bu gruplar arasında bir farklılık tespit edilememiştir. Çalışmanın 60. gününde benzer sonuçlar elde edilmiştir.



Grafik 4.6. Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarının böbreklerinde IL-8 gen sunumlarında meydana gelen değişimler (Katlama Değişimi). Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

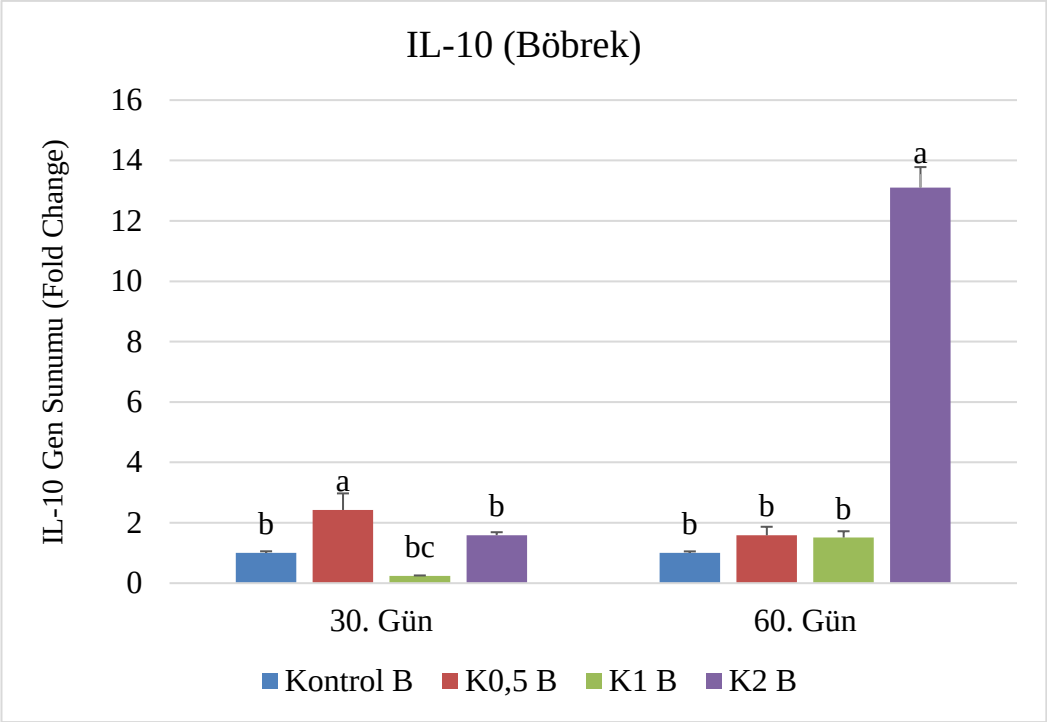
Bağırsak dokularında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, çalışmanın K0,5 grubunda en yüksek değerine ulaşmıştır. K2 grubunun IL-8 sunumu kontrol grubuna kıyasla artış göstermiştir. Çalışmanın 60. gününde IL-8 gen sunumu K0,5 ve K1 grubunda önemli derecede artış göstermiştir (P<0,05).



Grafik 4.7. Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarında IL-8 gen sunumlarında meydana gelen değişimler (Katlama Değişimi). Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

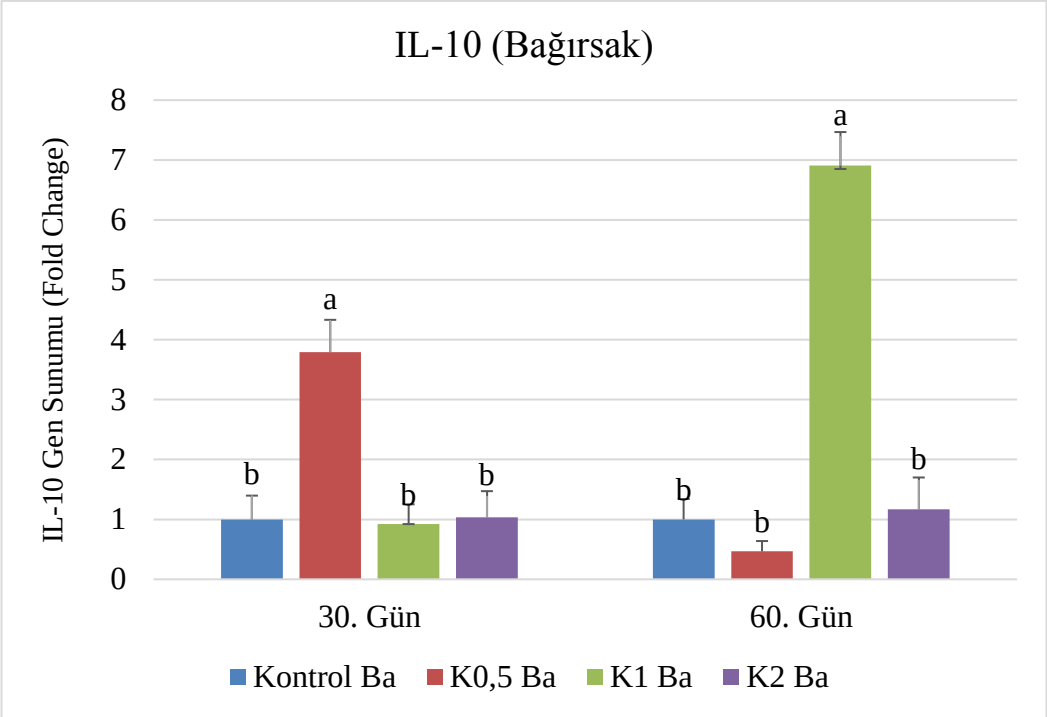
4.3.4.3. IL-10

Çalışmada elde edilen IL-10 gen sunumları Grafik 4.8 ve Grafik 4.9. da verilmiştir. Bu sonuçlara göre böbrek dokularında da IL-8 gen sunumlarında olduğu gibi K0,5 grubunun IL-10 gen sunumu kayda değer artış göstermiştir. K2 grubu IL-10 gen sunumu kontrol grubunda yükek tespit edilmiş olmakla birlikte bu fark önemsizdir ($P>0,05$). Çalışmanın 60. gününde ise K2 grubunun gen sunumu kontrol grubuna kıyasla önemli derecede artış gösterirken ($P<0,05$), bundan farklı olarak K0,5 ve K1 grubu farklılık göstermemiştir.



Grafik 4.8. Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarının böbreklerinde IL-10 gen sunumlarında meydana gelen değişimler (Katlama Değişimi). Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

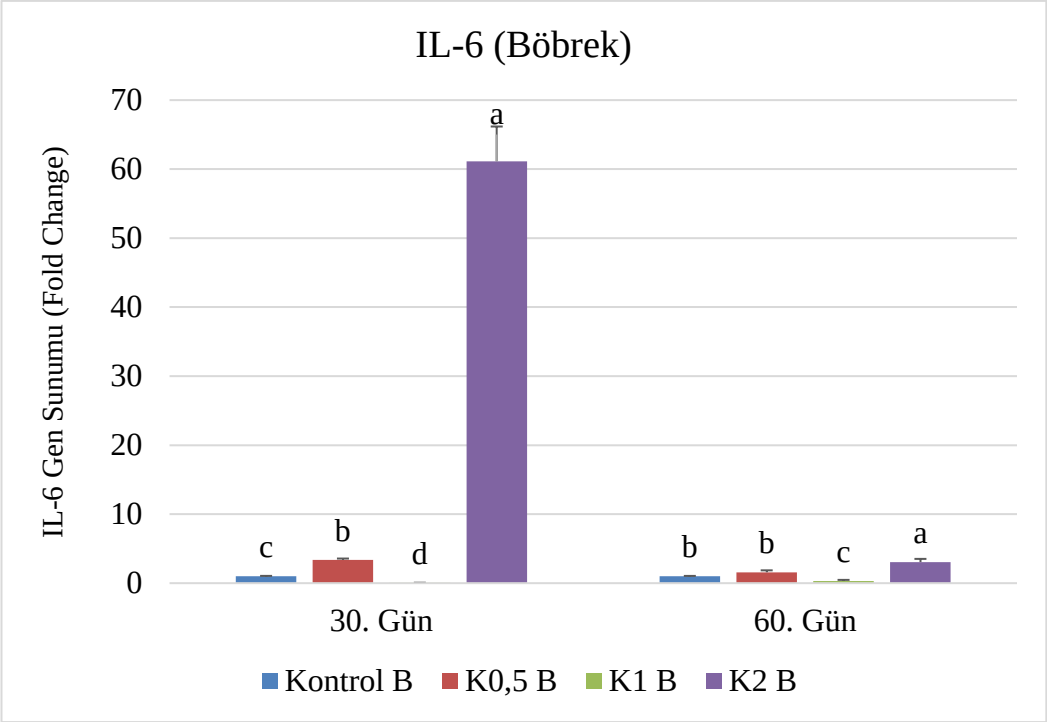
Bağırsaklardan elde edilen veriler değerlendirildiğinde böbreklerden elde edilen verilere benzer sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre en yüksek IL-10 aktivitesi K0,5 grubunda gözlenmiştir ($P<0,05$). Çalışmanın 60. Gününde ise en yüksek IL-10 gen sunumu K1 grubunda gözlenmiştir.



Grafik 4.9. Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarında IL-10 gen sunumlarında meydana gelen değişimler (Katlama Değişimi). Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

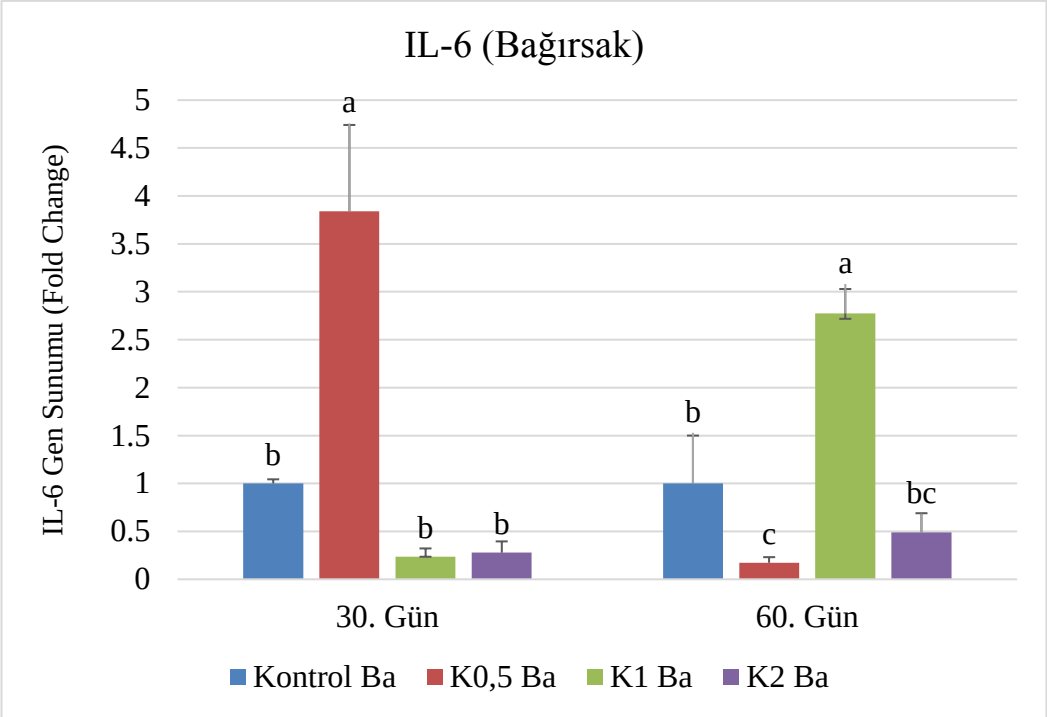
4.3.4.4. IL-6

Çalışmada elde edilen IL-6 değerleri Grafik 4.10 ve 4.11'de verilmiştir. Bu bağlamda entersan şekile tüm deneme gruplarından elde edilen verilere IL-6 gen sunumları ile benzerlik göstermektedir. K1 grubunun en düşük gen sunumu yanıtını verdiği 30. gün sonunda en yüksek IL-6 değerinin K2 grubunda elde edildiği gözlenmektedir ($P<0,05$). Bununla birlikte böbrek dokularından elde edilen IL-6 gen sunumu K0,5 grubunda en yüksek ikinci değerine ulaşmıştır. Çalışmanın 60. gününde en yüksek değer K2 grubunda gözlenmiştir.



Grafik 4.10. Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarının böbreklerinde IL-6 gen sunumlarında meydana gelen değişimler (Katlama Değişimi). Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

Bağırsaktan elde edilen verilere göre, 30. gün örneklemesinde en yüksek değer K0,5 grubunda gözlenmiştir. K1 ve K2 grubunun gen sunumları kontrol grubuna kıyasla daha düşük olarak tespit edilse de bu durum istatistiksel açıdan faklılık oluşturmamıştır.

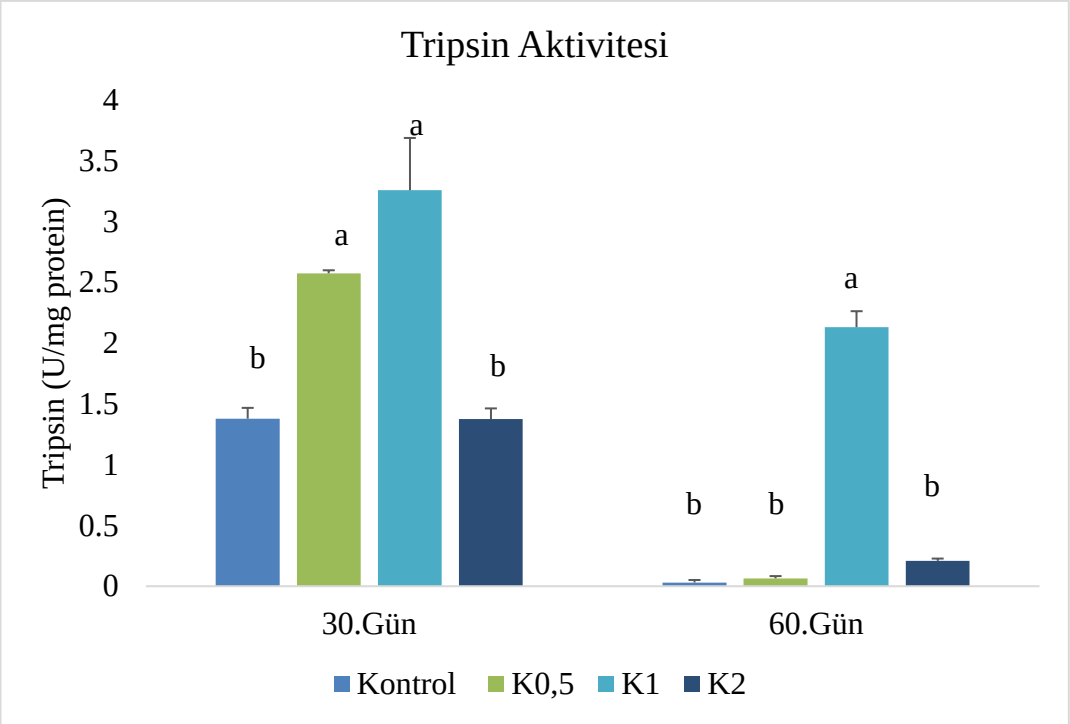


Grafik 4.11. Kenevir yağı ile 60 gün boyunca beslenen gökkuşağı alabalıklarının bağırsaklarında IL-6 gen sunumlarında meydana gelen değişimler (Katlama Değişimi). Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

4.3.5. Sindirim Enzimleri

4.3.5.1. Tripsin

Tripsin aktivitesi çalışma boyunca 30 ve 60. günlerde kontrol edilmiştir. Çalışma verileri Grafik 4.12.'de özetlenmiştir. Çalışmanın 30. gününde tripsin aktivitesinin K0,5 ve K1 grupların kontrol ve K2 grubuna kıyasla önemli derecede arttığı gözlenmektedir ($P<0,05$). Bununla birlikte kontrol ve K2 grupları ile K0,5 ve K2 grupları kendi içlerine değerlendirildiğinde gruplar arasında bir farklılık gözlenmemiştir ($P>0,05$).

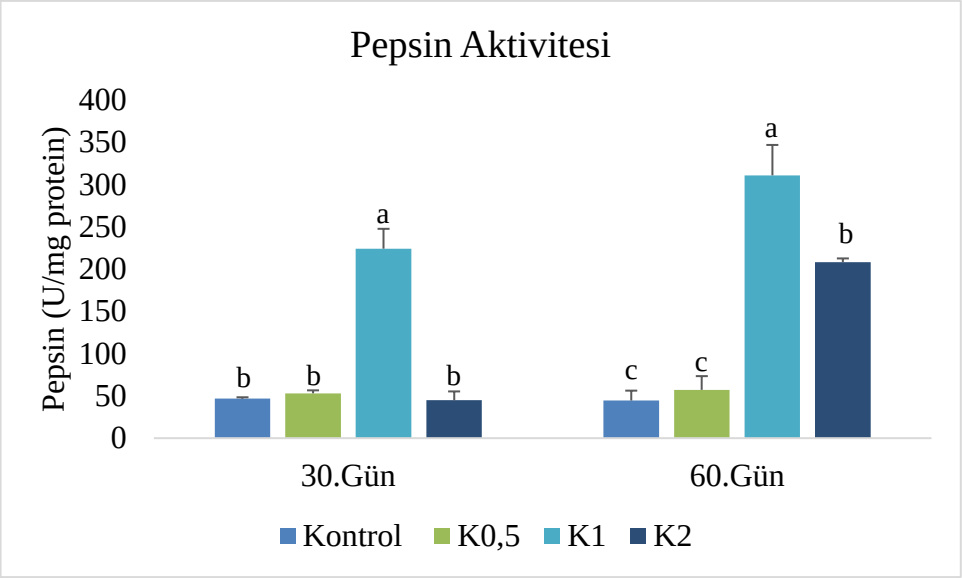


Grafik 4.12. 60 gün boyunca farklı oranlarda kenevir tohumu yağı içeren yemlerle beslenen gökkuşağı alabalıklarının tripsin aktivitelerinde meydana gelen değişimler (U/mg protein). Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

Denemenin 60. gününde en yüksek tripsin aktivitesi K1 grubunda gözlenmiştir. Bundan farklı olarak kontrol, K0,5 ve K2 gruplarında tripsin aktivitesi son derece azalırken bu grupların kendi aralarında bir farklılık oluşturmadığı ($P>0,05$) tespit edilmiştir.

4.3.5.2. Pepsin

Çalışmada elde edilen pepsin aktivitesi sonuçları Grafik 4.13.'te verilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre 30. günde K1 grubunun pepsin aktivitesi diğer gruplarınkine (Kontrol, K0,5 ve K2) oranla önemli derecede artış göstermiştir ($P<0,05$). Bununla birlikte Kontrol, K0,5 ve K2 grupları arasında bir farklılık tespit edilememiştir.

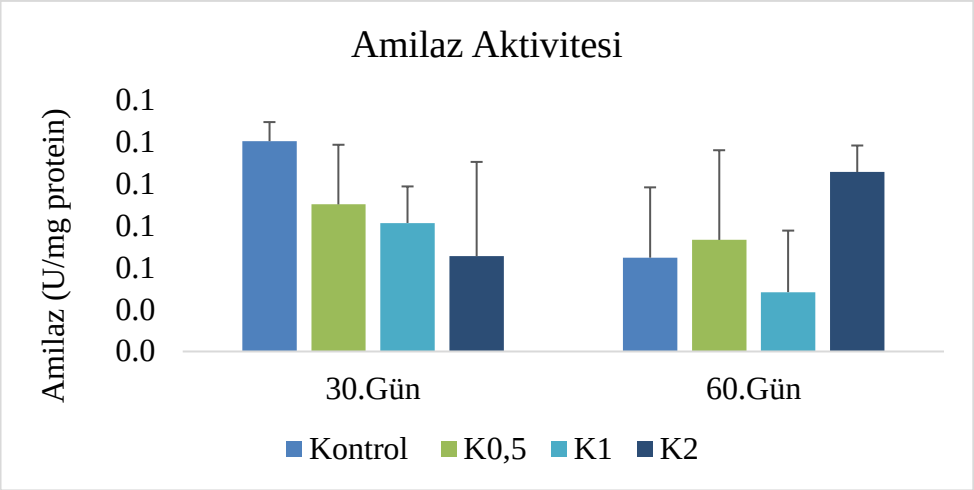


Grafik 4.13. 60 gün boyunca farklı oranlarda kenevir tohumu yağı içeren yemlerle beslenen gökkuşağı alabalıklarının pepsin aktivitelerinde meydana gelen değişimler (U/mg protein). Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

Deneme sonunda elde edilen pepsin aktiviteleri değerlendirildiğinde benzer olarak en yüksek değer K1 grubunda gözlenmiştir ($P<0,05$). K2 grubu pepsin aktivitesi K1 grubunda düşük olarak tespit edilmişken bundan farklı olarak kontrol ve K0,5 gruplarından kayda değer derecede artış göstermiştir. Bununla birlikte en düşük pepsin aktiviteleri kontrol ve K0,5 gruplarında gözlenirken bu iki grup arasında bir farklılık tespit edilememiştir ($P<0,05$).

4.3.5.3. Amilaz

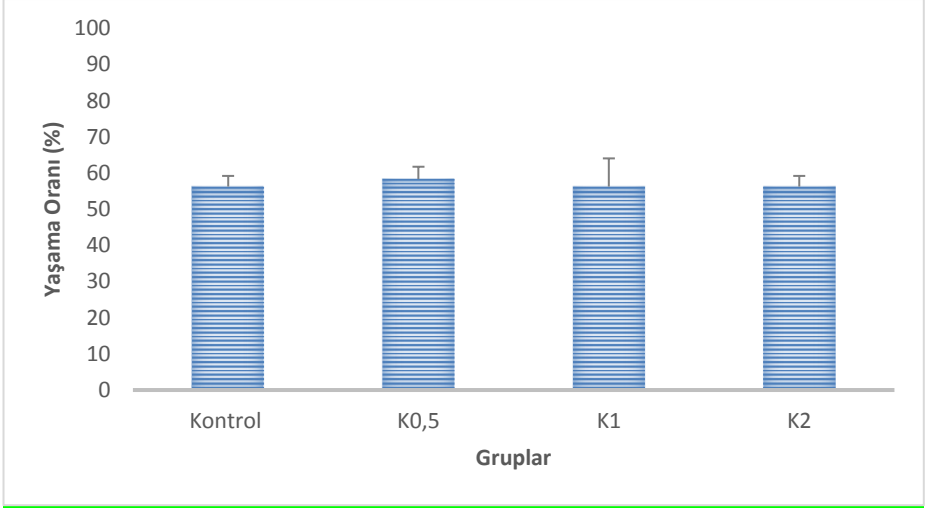
Deneme sonunda elde edilen amilaz aktivitesi verileri Grafik 4.14 te özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre amilaz aktivitesi en yüksek değerine kontrol grubunda ulaşmıştır (0,11±0,03). En düşük amilaz aktivitesi ise 0,06±0,01 değeri ile K2 grubunda belirlenmiştir. Gruplar arasında amilaz aktivitesi değişkenlik göstermekle birlikte bu farklılık istatistiksel açıdan önem arz etmemektedir ($P>0,05$).



Grafik 4.14. 60 gün boyunca farklı oranlarda kenevir tohumu yağı içeren yemlerle beslenen gökkuşağı alabalıklarının amilaz aktivitelerinde meydana gelen değişimler (U/mg protein). Küçük üstel ifadeler grupların aynı örnekleme günü kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

4.3.6. Kontrol Testi Sonuçları

Çalışma sonunda balıklar daha önceden LD50 dozu belirlenmiş olan *Aeromonas hydrophila* ($1x10^8$ CFU/100 µl) ile enfekte edilmişlerdir. Yaşama oranları Grafik 4.15 de verilmiştir.



Grafik 4.15. *Aeromonas hydrophila* enfeksiyonu ile intraperitonal olarak enfekte edilen deneme gruplarının yaşama oranları (%). Üstel simgeler grupların kendi aralarındaki farklılığı ifade eder.

Çalışma sonunda elde edilen verilere göre en yüksek yaşama oranı K0,5 grubunda (%58,3±3,4) tespit edilmiştir. K1 ve K2 gruplarında ise yaşama oranı sırasıyla %56,25±7,79 ve %56,25±2,94 olarak tespit edilmiştir. Buna ek olarak kontrol grubunun yaşama oranı ise 56,25±2,94 olarak tespit edilmiştir. En yüksek yaşama oranı K0,5 grubunda gözlenmiş olmakla birlikte gruplar arasında herhangi bir farklılık tespit edilememiştir ($P>0,05$).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu denemede kenevir yağını farklı oranlarda içeren deneme yemleri ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının büyüme performansı, bağışıklık yanıtları ve sindirim enzimleri üzerinde meydana getirdiği değişiklikler incelenmiştir. Çalışma verilerine göre K0,5 ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının büyüme performanslarında özellikle ağırlık kazanımı ve spesifik büyüme oranı gibi verilerde kayda değer artış ve buna ek olarak YDO'nında önemli bir azalma tespit edilmiştir. Oksidatif radikal salınımlarında K2 daha iyi performans gösterirken lizozim aktivitelerinde çalışma sonunda genel olarak bir değişim gözlenmemiştir. MPO aktivitesi K1 ve K2 grubunda önemli bir artışa neden olmuşken gen yanıtlarına özellikle 30. Günde K0,5 grubunda hem böbrek dokularında hem de bağırsak dokularında önemli bir sitokin gen sunumu artışı olmuştur. Sindirim enzimlerinde kenevir yağı kullanımının etkisi gözlenirken *Aeromonas hydrophila* enfeksiyonuna karşı yapılan kontrol testlerinde ise farklılık tespit edilememiştir.

Çalışma sonunda K0,5 grubu ile beslenen balıkların büyüme performansı diğer gruplara kıyasla yüksek tespit edilmiş. Ayrıca balıkların YDO'nın düştüğü belirlenmiştir. Çalışmamıza benzer olarak Sönmez ve ark 2015 adaçayı ve kekik yağı ile besledikleri gökkuşağı alabalıklarının büyüme performanslarında artış tespit etmişlerdir. Nane yağı ile beslenen gökkuşağı alabalıklarında ise büyüme performasında azalma tespit edilmiştir. Volpatti ve ark 2012 karvakrol uygulamasının levrek balıklarına büyüme perfromansı üzerinde bir değişiklik arz etmediklerini tespit etmişlerdir. Karvakrol ile beslenen kedi balıklarında (Zheng ve ark 2009) ve tilapialarda (Rattanachaikunsopon ve Phumkhachorn 2010) büyüme perfrommansında bir değişiklik gözlenmemiştir.

Oksidatif radikaller (OH^-, O_2^-), özellikle nötrofiller olmak üzere bağışıklık hücreleri tarafından fagozitik aktivitede meydana getirilen savunma mekanizmasının ürünüdür (Anderson, Maoritomo, de Grooth, 1992). Çalışmada, K2 grubunda 30. gün örneklemesinde artış gözlenirken 60. günde gruplar arasında farklılık gözlenmemiştir. Volpatti et al 2012 karvakrol uygaladıkları levrek balıklarında (*Dicentrarchus labrax*)

çalışmamıza benzer olarak oksidatif radikal salınımlarında bir azalma tespit etmişlerdir. Acar ve ark 2015, *Citrus sinensis* esansiyel yağları ile besledikleri tilapialarda büyümeyi olumlu yönde teşvik ettiğini belirlemişlerdir. Perez-Sanchez ve ark 2015, esansisyel yağ türvi olan ticari ürün NEXT ENHANCE 150 ile besledikleri çipura balıklarında oksidatif radikal salınımlarının değişmediğini tespit etmişlerdir.

Lizozim opsosnin görevi gören pettit ya da bir bileşiktir (Magnadottir, 2006). Bağışıklık yanıtta temel vazifesi özellikle bakterilerin hücre duvarlarını parçalayarak koloni oluşturmalarını ve kümeleşmelerini engellemektedir (Alexander ve Ingram, 1992). 60 gün boyunca farklı oranlarda kenevir tohumu yağı ile beslenen gökkuşağı alabalıklarında lizozoim aktivitesi gruplarda bir değişkenlik göstermemiş ya da ilk örneklemede kontrol grubunda yükseliş göstermiştir. Bu bağlamda kenevir yağı içerisinde yer alan yağ asitlerinin vücut içerisinde lizozim salgılanması baskıladığı düşünülebilir. Palmitik asit grubunun bunun nedeni olduğu düşünülmektedir. Sun ve ark 2011, kolza yağı ile besledikleri siyah sazanlarda (*Mylopharyngodon piceus*) çalışmamıza benzer olarak lizozim aktivitesinde herhangi bir değişim gözlememişlerdir. Çalışmamızdan farklı olarak Soltani ve ark 2010, *Zataria multiflora* esansiyel yağları ile beslenen sazan balıklarında (*Cyprinus carpio*) serum lizozim aktivitelerinde artış gözlemlemişlerdir. Volpatti ve ark 2012 levrek balıklarında karvakrol uygulamasının çalışmamızdan farklı olarak lizozim aktivitesinde düşüşlere neden olduğunu tespit etmişlerdir. *Citrus sinensis* ile beslenen tilapialarda lizozim aktivitelerinde bir artış gözlenmiştir (Acar ve ark 2015)

Bu çalışmada MPO aktivitesi çalışmanın 30. gününde K2 ve K2 gruplarında artış gösterirken 60. günde gruplar arasında farklılık gözlenmemiştir. Burada net olarak doza bağımlı bir MPO aktivitesinde söz etmek mümkündür. Myeloperoksidaz makrofajları (Grattendick et al., 2002) ve nötrofilleri uyaran (Lau et al., 2005) bir enzimdir. Uyarım sonunda hücrelerden H_2O_2 salınımını hızlandırmada görev almaktadır. Bu bağlamda K1 ve K2 gruplarındaki ilgili dozlarda MPO aktivitesinin arttırılması nötrofil ve makrofajların uyarıldığını göstermektedir. Bu çalışma sonuçları benzer olarak Acar ve ark 2015, *Citrus sinensis* ile besledikleri tilapialarda benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Awad ve ark 2013, çörek otu yağı ile besledikleri gökkuşağı alabalıklarında MPO aktivitelerinde önemli bir artış tespit etmişlerdir.

IL-1β, en önemli sitokinlerden ve en çok çalışılmış sitokinlerden olup savunma sisteminde düzenleyici görev almakta, diğer sitokinlerin salınımlarını tetiklemektedir (Low, Wadsworth, Burrells, Secombes, 2003). Bu çalışamanın her iki örnekleme döneminde IL-1β, K2 grubunda böbrekte arttığı gözlenmektedir. Bağırsakta ise bir değişim gözlenmemiştir. Kenevir yağı gökkuşağı alabalıklarının böbrek hücrelerinde pro inflamatri özellik göstererek bu durum bağırsaklarda gözlenmemiştir. Çalışamamıza benzer olarak çipura balıklarında ticari ürün kullanımının IL-1β gen sunumu üzerinde baskılayıcı etkileri olduğunu göstermiştir (Perez-Sanchez ve ark 2015). Monteero ve ark (2010), keten tohumu yağı ile besledikleri çipura balıklarının IL-1β gen sunularında artış oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

IL-8 aynı zamanda CXCL-8 olarak da adlandırılmakta ve kemokin olarak, nötrofil ve T lenfositlerin ve basofillerin etkinliğini arttırmaktadır. Temel olarak pro-inflamatori sitokin olarak görev yapmaktadır. Deneme sonuçlarına göre, çalışmamın 30. ve 60. gününde K0,5 ve K2 gruplarında IL-8 gen sunumlarında artış gözlenmiştir. B durum bağırsaklarda farklılık göstermiş K0,5 ve K2 ye ek olarak çalışmanın 60. Gününde K1 grubunda da artış göstermiştir. Bağırsaklarda oluşan önemli bir enflamasyondan söz edilebilir. Çalışmamızdan farklı olarak çipuralarda azalan bir IL-8 aktivitesi gözlenmiştir (Perez-Sanchez ve ark 2015).

IL-10, hücrelerde meydan gelen bağışıklık yanıtların kontrolünde peptit zincirlerine bağlanarak bağışıklık yanıtı düzenleyen sitokinlerdendir. Bu çalışmada K0,5 gruplarına hem böbrek hemde bağırsaklarda çalışmanın 30. gününde kontrol grubuna kıyasal bir artıştan söz etmek mümkündür. Çalışmanın 60.gününde ise böbreklerde K2 grubunda bağırsakta ise K1 grubunda bir artış gözlenmiştir. Bu bağlamda kenevir yağının doku spesifik bağışıklık yanıta neden olduğu söylenebilir.

IL-6 hematopoiesiste önemli rol oynayan hem anti hemde pro-inflamatör sitokin özelliği gösteren sitokin alt familyası üyesidir (Fujiki ve ark 2003). IL-6 aynı zamanda makrofajlar ve B hücreleri üzerinde de etkileri vardır (Costa ve ark 2011). Alabalıklarda, makrofaj büyümesini teşvik etmekte, IFN ve SOCS1-3'ün geçici gen sunumlarına neden olmakta, ama antimikrobiyal peptit genlerinin makroflarda sunumlarının artmasını devam ettirmektedir (Costa ve ark 2011). Bu çalışmada ise

genel 30 günde K0,5 ve K2 gruplarında 60. Gün ise sadece K2 grubunda öenmli bir IL-6'şı gözlenmektedir. Bununla birlikte bağırsak dokularında bu durum 30. Günde K0,5 grubunda gözlenmektedir. Bu sonuçlar kenevir yağı kullanımının gökkuşağı alabalıklarında böbrek hücrelerinde IL-6 gen sunumu tetiklediğini göstermektedir.

Yaşama oranları değerlendirildiğinde en düşük yaşama oranı kontrol grubunda gözleniş olmakla beraber, gruplar arasında kayda değer bir farklılık gözlenmemiştir. Çalışmamızdan farklı olarak, karvakrol ile beslenen levrek balıklarında *Vibrio anguillarum* hastalığına karşı yaşama oranlarında artış tespit edilmiştir (Volpatti ve ark 2012).

Sonuç olarak kenevir tohumu yağı ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının bağışıklık yanıtları üzerinde özellikle gen sunuları üzerinde önemli etkileri gözlenmiştir. Özellikle K0,5 grubunun hem böbrek hem de bağırsaklarında çalışmanın 30 gün uygulanması sonucu elde edilen gen sunumlarındaki düzen dikkat çekmektedir. Bu bağlamda balıkların azalan YDO değerleri ve artan büyüme performansları ile 30 günlük K0,5 uygulamasının balık üretiminde kullanılabilir bir yöntem olduğu kanaati hasıl olmuştur.

KAYNAKLAR

Acar, Ü., Kesbiç, O. S., Yılmaz, S., Gültepe, N., & Türker, A. (2015). Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against Streptococcus iniae. Aquaculture, 437, 282-286.

Ahmad S. (1995) Preface. In: Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. Chapman & Hall, NY.

Aikens, J., Dix, T.A. (1991). Perhydroxyl radical ($HOO^{\cdot}$) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *The Journal of Biolocigal Chemistry*, 69(B), 893-896.

Altunoglu, 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.

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.

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.

Anwar, F., Hussain, A., Ashraf, I. M., Jamil, A., & Iqbal, S. (2006). Effect of salinity on yield and quality of Moringa oleifera seed oil. Grasas Y Aceites, 57, 394–401.

Arya Vazirzadeh, Fatemeh Dehghan, Roya Kazemeini 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.

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.

Awad, E., Austin, D., & Lyndon, A. R. (2013). Effect of black cumin seed oil (Nigella sativa) and nettle extract (Quercetin) on enhancement of immunity in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). Aquaculture, 388, 193-197.

Baytop, T. (1999). Therapy with medicinal plants in Turkey (Past and Present). No. 3255 (2nd ed.), Publications of the Istanbul University, Istanbul, 271 sayfa.

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 coggygria) ve Defne (Laurus nobilis) Bitkilerinin Alabalıklarda (Oncorhynchus mykiss) Büyümeyi Teşvik Edici Etkileri. Alınteri, Zirai Bilimler Dergisi, 22(B): 26-33.

Bilen, S., S. Yılmaz, and A. M. Bilen. 2013. Influence of Tetra (Cotinus coggygria) 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., 2014. Effects of dietary incorporation of tetra (Cotinus coggygria) extract on immune response and resistance to Aeromonas hydrophila in koi Carp (Cyprinus carpio). Isr. J. Aquacult. Bamidgeh 66, 1–6.

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., 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., (2016). 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 90e94.

Clare, B.A., Conroy, R.S., Spelman, K. (2009). The diuretic effect in human subjects of an extract of Taraxacum officinale folium over a single day. *J Altern Complement Med.* 15(8), 929-934.

Costa M.M., Maehr T., Diaz-Rosales P., Secombes C.J., Wang T. Bioactivity studies of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) interleukin-6: Effects on macrophage growth and antimicrobial peptide gene expression. Mol. Immunol. 2011;48:1903–1916. doi: 10.1016/j.molimm.2011.05.027.

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.

Diler, Ö., Görmez, Pelin Otunun (Artemisia vulgaris L) Gökkuşağı Alabalıklarında (Oncorhynchus mykiss, Walbaum) Hastalıklara Karşı Direnç Ve Spesifik Olmayan Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkisi.

Dügenci 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. 2011. Balıklardan İzole Edilen Bakteriyel Patojenlere Karşı Bazı Bitkisel Uçucu Yağlarının Antibakteriyal Aktivitesi. Kafkas Univ. Vet. Fak. Dergisi, 17(A): 47– 54.

Elgaml, S. A., Khalil, R., Hashish, E. A., El-Murr, A. (2015). Protective effects of selenium and Alpha-tocopherol against lead-induced hepatic and renal toxicity in oreochromis niloticus. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 6(1), 1.

Elbeshti, H.T. (2016). Gökkuşağı alabalıklarında (*Onchorhynchus mykiss*) *Aeromonas hydrophila* enfeksiyonuna karşı *Cotinus coggygria* bitki özütünün in vivo tedavi edici etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Kastamonu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

FAO, (2017). The state of World fisheries and aquaculture. Roma. ISBN 978-92-5-109185-2.

Fujiki K., Nakao M., Dixon B. Molecular cloning and characterisation of a carp (Cyprinus carpio) cytokine-like cDNA that shares sequence similarity withIL-6 subfamily cytokines CNTF, OSM and LIF. Dev. Comp. Immunol. 2003;27:127–136. doi: 10.1016/S0145-305X(02)00074-5.

Gershwin M. E.. Beach R. S. and Hurley L. S. (1985) Nutririon und Immunitv. pp. 259 283. Academic Press. New York.

Giannenasa, I., Triantafilloub, E., Stavrakakisa, S., Margaronic, M., Mavridisd, 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.

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.

Gülçin, İ., Beydemir, Ş., Hisar, O., Köksal, E., Reiter, R. J. (2009). Melatonin administration increases antioxidant enzymes activities and reduces lipid peroxidation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) erythrocytes. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 33(3), 241-245.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine (3rd ed.) Clarendon Press, Oxford.

Hardig, J., Hoglund, L.B. (1983). Seasonal and ontogenetic effects on methaemoglobin and reduced glutathione content in the blood of reared baltic salmon. *Comp. Biochem. Physiol.* 75(A), 27–34.

Hoar, W. S., Randall, D. J., Iwama, G., & Nakanishi, T. (1997). The fish immune system: organism, pathogen, and environment (Vol. 15). Academic Press.

Imlay, J.A., Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicology. *Science*, 240, 1302-1309.

J.B. Alexander, G.A. Ingram. 1992. Non-cellular and non-specific defense mechanisms of fish Annu. Rev. Fish Dis., 2, 249-280.

Keleştemur, G. T., & Özdemir, Y. (2013). Effects of dietary viamin A and E on growth performance and antioxidant status in blood of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W. 1792) exposed to flow rate stress. *JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences*, 23(3), 821-827.

Kızak, M. K., Çelik, H. T. (2012). The effects of different dosage of kefir with different durations on growth performances and antioxidant system in the blood and liver tissues of Çoruh trout (*Salmo coruhensis*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12, 1-2.

Kimbrell DA, Beutler B. The evolution and genetics of innate immunity. Nature Rev Genet 2001; 2: 256-267.

Kiron, V., Fukuda, H., Takeuchi, T., & Watanabe, T. (1995). Essential fatty acid nutrition and defence mechanisms in rainbow trout Oncorhynchus mykiss. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 111(3), 361-367.

Kocabaş, M., Başçınar, N., Kutluyer, F., & Önder, A. (2013). HES'ler ve Balıklar. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, (1), 128-131.

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.

Lawrey, J.D. (1986). Biological role of lichen substances. *Byrologist*, 86;89, 111–122. doi: 10.2307/3242751.

Lewis, S.M., Bain, B.J., Bates, I. (2006). Dacie and Lewis Practical Haematology, ed: Lewis SM., Bain BJ., Bates I., Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia.

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.

Li, Z. H., Li, P., Randak, T. (2010). Effect of a human pharmaceutical carbamazepine on antioxidant responses in brain of a model teleost in vitro: an efficient approach to biomonitoring. *Journal of Applied Toxicology*, 30(7), 644-648.

Low, C., Wadsworth, S., Burrells, C., Secombes ,C.J., (2003). Expression of immune genes in turbot (Scophthalmus maximus) fed a nucleotide-supplemented diet Aquaculture, 221, pp. 23-40

Madamombe, I.T., Afolayan, A.J. (2003). Evaluation of antimicrobial activity of extracts from South African *Usnea barbata*. *Pharmaceutical Biology*, 41(3), 199-202.

Martinez-Alvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A. (2005). Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15, 75–88.

Magnadottir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). Fish & Shellfish Immunology. 20, 137-151.

Montero, D., Mathlouthi, F., Tort, L., Afonso, J. M., Torrecillas, S., Fernández-Vaquero, A., ... & Izquierdo, M. S. (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.

Modaresi, M., Resalatpour, N. (2012). The Effect of Taraxacum officinale Hydroalcoholic Extract on Blood Cells in Mice. *Advances in Hematology*, 2012, Article ID 653412, 4.

Özlüer-Hunt, A., Özkan-Yılmaz, F., Berköz, M., Engin, K., Gündüz, S. G., & Yalın, S. (2016). Effects of dietary nucleotide yeast on immune responses and antioxidant enzyme activities of rainbow trout juveniles (*Oncorhynchus mykiss*). *Israeli Journal Of Aquaculture-Bamidgeh*, 68.

Pérez-Sánchez, J., Benedito-Palos, L., Estensoro, I., Petropoulos, Y., Calduch-Giner, J. A., Browdy, C. L., & Sitjà-Bobadilla, A. (2015). Effects of dietary NEXT ENHANCE® 150 on growth performance and expression of immune and intestinal integrity related genes in gilthead sea bream (Sparus aurata L.). Fish & shellfish immunology, 44(1), 117-128.

Pulsford, A. L., Crampe, M., Langston, A., & Glynn, P. J. (1995). Modulatory effects of disease, stress, copper, TBT and vitamin E on the immune system of flatfish. Fish & Shellfish Immunology, 5(8), 631-643.

Quade, M.J., Roth, J.A. (1997). A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Veterinary Immunolgy and Immunopathology*, 19;58(3-4), 239-48.

Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2010). Assessment of synergistic efficacy of carvacrol and cymene against Edwardsiella tarda in vitro and in Tilapia (Oreochromis niloticus). African Journal of Microbiology Research, 4(5), 420-425.

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.

Reiter, R.J., Melchiorri, D, Sewerynek, E, Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., Ortiz, G.G., Acuña-Castroviejo, D.J. (1995). A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Pineal Res.*, 18(1),1-11.

Rocha-e-Silva, T.A.A., Rossa, M.M., Rantin, F.T., Matsumura- Tundisi, T., Tundisi, J.G., Degterev, I.A. (2004). Comparison of liver mixed-function oxygenase and antioxidant enzymes in vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol*. 137(C), 155–165.

Sarı, A.O., Oğuz, B., Bilgiç, A., Tort, N., Güvensen, A., Şenol, S.G. (2010). Ege ve Güney Marmara bölgelerinde halk ilacı olarak kullanılan bitkiler. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 20(2), 1-21.

Schütz, K., Carle, R., Schieber, A. (2006). Taraxacum— A review on its phytochemical and pharmacological profile. J*ournal of Ethnopharmacology*, 107 (3), 313–323.

Shrestha G., St. Clair L.L. Lichens: A promising source of antibiotic and anticancer drugs. Phytochem. Rev. 2013;12:229–244. doi: 10.1007/s11101-013-9283-7.

Sies, H. (1986) Biochemistry of oxidative stress. Ang. Chem.-Int., 25, 1058–1071.

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 furuncluosis. *Veterinary Immunolgy and Immunopathology*, 41,125-139.

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.

Soltani, M., Sheikhzadeh, N., Ebrahimzadeh-Mousavi, H. A., & Zargar, A. (2010). Effects of Zataria multiflora essential oil on innate immune responses of common carp (Cyprinus carpio). Journal of Fisheries and Aquatic Science, 5(3), 191-199.

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*. 41:165–175. DOI :10.1007/s10695-014-0014-9.

Sun, S., Ye, J., Chen, J., Wang, Y., & Chen, L. (2011). Effect of dietary fish oil replacement by rapeseed oil on the growth, fatty acid composition and serum non- specific immunity response of fingerling black carp, Mylopharyngodon piceus. Aquaculture Nutrition, 17(4), 441-450.

Şahan, A., Duman, S., Çolak, S.Ö., Çinar, 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.

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.

Şahan, A., Özütok, S., Kurutaş, E. B. (2016). Determination of some hematological parameters and antioxidant capacity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) fed ginger (*Zingiber Officinale* Roscoe) to *Aeromonas hydrophila. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sicences,* 16(1), 197-204.

Thirunavukkarasu, P., Ramkumar, L., Ramanathan, T. ve Silambarasan D. (2010). Anti Oxidant activity of selected coastal medicinal plants. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 2(2), 134-137.

Volpatti, D., Chiara, B., Francesca, T., & Marco, G. (2013). Growth parameters, innate immune response and resistance to L istonella (V ibrio) anguillarum of D icentrarchus labrax fed carvacrol supplemented diets. Aquaculture Research, 45(1), 31-44.

Werling D, Jungi TW. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. Vet Immunol Immunopathol 2003; 91: 1-12

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.

Yagi, K. 1984. Assay for plasma lipid peroxidase. *Methods in Enzymology*, 109, 328-331. doi: 10.1016/S0076- 6879(84)05042-4.

Yonar, M. E., Yonar, S. M., Pala, A., Silici, S., & Saglam, N. (2015). Trichlorfon-induced haematological and biochemical changes in Cyprinus carpio: ameliorative effect of propolis. Diseases of aquatic organisms, 114(3), 209-216.

Zhang, C. X., Huang, F., Li, J., Wang, L., Song, K., & Mai, K. S. (2015). Interactive effects of dietary magnesium and vitamin E on growth performance, body composition, blood parameters and antioxidant status in Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) fed oxidized oil. *Aquaculture Nutrition*. 22(3), 708-722.

Zhao, Y., Jiang, X., Kong, X., Di, G., Nie, G., & Li, X. (2017). Effects of hypoxia on lysozyme activity and antioxidant defences in the kidney and spleen of *Carassius auratus*. *Aquaculture Research*. 48(1), 223-235.

Zheng, Z. L., Tan, J. Y., Liu, H. Y., Zhou, X. H., Xiang, X., & Wang, K. Y. (2009). Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against Aeromonas hydrophila in channel catfish (Ictalurus punctatus). Aquaculture, 292(3-4), 214-218.

ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı : Mohamed Elsayed A SALEH

Doğum Yeri ve Yılı : Libya – Tripoli – 1976

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce, Türkçe

E-posta : gaidain008@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : 2nd Mars Lisesi

Lisans : Tripoli Üniversitesi (önceki adı Al-Fateh)2000-2001

Mesleki Deneyim

İş Yeri :Tripoli Üniversitesi