

# Farklı su sıcaklıklarındaki pullu sazan (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758)' da polenin antioksidan etkisinin araştırılması

## Investigation of antioxidant effect of pollen in scaly carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) in different water temperature

Merve Taşkan<sup>1</sup> • Muhammet Enis Yonar<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, 23119, Elazığ, Türkiye

<https://orcid.org/0000-0002-5105-7010>

<sup>2</sup> Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, 23119, Elazığ, Türkiye

<https://orcid.org/0000-0001-9519-4247>

\*Corresponding author: [meyonar@gmail.com](mailto:meyonar@gmail.com)

Received date: 16.05.2022

Accepted date: 18.07.2022

### How to cite this paper:

Taşkan, M., & Yonar, E. M. (2023). Investigation of Antioxidant Effect of Pollen in Scaly Carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) in Different Water Temperature. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 40(1), 69-76. <https://doi.org/10.12714/egejfas.40.1.10>

**Öz:** Bu çalışmada farklı su sıcaklıklarında yemlerine polen ilave edilmiş pullu sazanda bazı immunolojik ve antioksidan parametrelerdeki değişimlerin araştırılması amaçlandı. Balıklar su sıcaklığı 18 °C, 23 °C ve 28 °C'ye ayarlanmış akvaryumlara stoklandı. Balıklara % 2,5 oranında polen içeren yemler 14 gün süreyle verildi. Balıklardan alınan kan ve doku örneklerinde immunolojik ve oksidan/antioksidan parametreler analiz edildi.

Kontrol grubu (23 °C) ile kıyaslandığında, 18 °C' deki grubun NBT aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir artış belirlendi. 28 °C' deki grubun NBT aktivitesinde belirlenen azalma istatistiksel olarak önemsiz bulundu. 18 °C' deki grubun total protein ve total immunoglobulin düzeyleri azalırken, 28 °C' deki grupta her iki parametre için belirlenen artış önemsiz bulundu. Kontrol grubu (23 °C)' na kıyasla 18 °C ve 28 °C sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan grupların NBT aktivitesi ile total protein ve total immunoglobulin düzeylerinin kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli herhangi bir farklılık göstermediği belirlendi. Kontrol grubu (23 °C)' na kıyasla, 18 °C ve 28 °C' deki grupların doku MDA düzeyleri arttı. Sıcaklıktaki değişimle eşzamanlı olarak polen uygulanan grupların MDA düzeyleri 18 °C ve 28 °C' deki gruplardan daha düşüktü. Kontrol grubu (23 °C) ile kıyaslandığında, 18 °C ve 28 °C' deki grupların doku GSH düzeyleri ve GST aktiviteleri azaldı. Sıcaklıktaki değişimle eşzamanlı olarak polen uygulanan gruplarda GSH düzeyleri ve GST aktiviteleri 18 °C ve 28 °C' deki gruplardan daha yüksekti. Sonuç olarak balıklarda sıcaklık farklılıklarından kaynaklanan stres polenle önenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidanlar, bağırsıklık, balık, oksidatif stres, sıcaklık

**Abstract:** In this study, it was aimed to investigate changes in some immunological and antioxidant parameters in scaly carp (*Cyprinus carpio*) added pollen to their feed in different water temperatures. Fish were stocked to glass aquariums adjusted to 18 °C, 23 °C and 28 °C water temperature. Fish were given diets containing % 2,5 pollen for 14 days. Blood and tissue samples were analysed to determine the immunological parameters and oxidant/antioxidant status.

When compared to the control group (23 °C), a statistically significant increase in the NBT activity of the groups at 18 °C was observed. Decrease in the NBT activity of the group at 28 °C was statistically insignificant. The total protein and total immunoglobulin levels of the group at 18 °C were decreased, while increase in both parameters at 28 °C was not significant. When compared to the control group (23 °C), the NBT activity, the total protein and total immunoglobulin levels in the groups that maintained at the same temperature with the control group (23 °C) and applied pollen did not show any statistically significant difference. The tissue MDA levels were increased in the groups at 18 °C and 28 °C when compared to the control group (23 °C). The tissue MDA levels of the groups treated pollen simultaneously with the change in temperature were lower than the groups at 18 °C and 28 °C. The tissue GSH levels and GST activities were decreased in the groups at 18 °C and 28 °C when compared to the control group (23 °C). The tissue GSH levels and GST activities of the groups treated pollen simultaneously with the change in temperature were higher than the groups at 18 °C and 28 °C. In conclusion, stress caused by temperature differences in fish may be prevented by pollen.

**Keywords:** Antioxidants, immunity, fish, oxidative stress, temperature

## GİRİŞ

Balık yetiştiriciliği, dünyada hızla gelişen ve önem kazanan bir endüstri kolu haline gelmiştir. Ancak dışarıdan alınan pestisitler, ağır metaller, sıcaklık değişimleri, diyet tipleri, oksijen miktarı, parazitler ve farklı çevresel koşullar gibi faktörler, balıkları fizyolojik açıdan olumsuz olarak etkilemekte dolayısıyla da ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu faktörler içerisinde en önemlilerden biri olan su sıcaklığı; balıkların yaşamını, büyümesini, beslenmesini ve diğer birçok fizyolojik fonksiyonlarını etkileyen en önemli faktörlerden biridir (Lou vd., 2011). Küresel ısınmanın bir sonucu olarak, kronik sıcaklık artışları ve aşırı sıcak hava dalgası gibi olaylar dünyada

balıkları da içine alan farklı hayvan popülasyonlarını etkilemektedir. Soğukkanlı canlılar olarak balıkların küresel ısınmaya karşı özellikle savunmasız olmaları kaçınılmaz bir sonuçtur. Kronik sıcaklık artışı, balıkların yaşamlarını tehlikeye atabilecek ek stres faktörleriyle başa çıkma yeteneklerini değiştirebilen fizyolojik bir yük oluşturmaktadır. Ayrıca hızlı sıcaklık artışlarının balıklarda akut stres cevabını indüklediği bilinmektedir. Soğukkanlı canlılar olarak balıklarda vücut sıcaklığı, fizyolojileri, metabolizmaları ve davranışları üzerinde derin etkileri olan yaşadıkları su sıcaklıklarına eşittir (Alfonso vd., 2020).

Balıklarda immun sistem çevresel faktörlerden oldukça fazla etkilenmektedir. Bu çevresel faktörlerin başında da su sıcaklığı gelmektedir (Buchtiková vd., 2011). Diğer taraftan yüksek sıcaklık (Parihar ve Dubey, 1995; Heise vd., 2006; Luschchak ve Bagnyukova, 2007) ve düşük sıcaklık (Malek vd., 2004; Martinez-Álvarez vd., 2005) balıklarda oksidatif strese yol açmaktadır. Yüksek sıcaklık oksijen ihtiyacını artırmakta bu artış da balıklarda oksidatif strese neden olmaktadır. Diğer taraftan düşük sıcaklık antioksidan sistemi zayıflatarak veya radikal oluşumuna yol açarak oksidatif stresi indüklemektedir (Lushchak, 2011).

Küçük hücrelerden oluşmuş, bitkinin kalıtsal özelliklerini taşıyan, bitkilerin çiçeklenme dönemleri boyunca görülen, çiçeklerde erkek üreme organlarının başçık bölümünde bulunan tozlara polen denilmektedir (Çankaya ve Korkmaz, 2008). Antibakteriyel, antifungal, antikarsinojenik, antioksidan ve immunomodulator özellikleri yapılan çalışmalarla kanıtlanan polene verilen önem, içerdiği besin maddelerinin zenginliği nedeniyle son zamanlarda daha fazla artmıştır (Yang vd., 2007; Eraslan vd., 2009; Xu vd., 2009; Abbass vd., 2012). Protein ve karbonhidrat polenin yapısında yüksek oranda bulunmakla birlikte yağ asitleri, vitaminler, mineral maddeler, enzimler ve aminoasitler yapılan analizler sonucunda belirlenen diğer maddelerdir. Bununla birlikte karotenoid, steroid ve flavonoidlerin polendeki varlığı da ispatlamıştır (Abbas vd., 2012).

Bu çalışmada farklı sıcaklıklarda tutularak ısı stresi oluşturulmuş pullu sazanda immunolojik ve antioksidan parametreler kullanılarak arı polenin koruyucu etkisini araştırmak, ayrıca immunostimulan ve antioksidan özellikteki arı polenin balıklarda kullanılabilirliğini belirlemek amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmada, DSİ 9. Bölge Müdürlüğü (Keban, Elazığ) den canlı olarak temin edilen ve yaklaşık ağırlığı  $40 \pm 5$  g olan 0+ yaş grubundaki pullu sazan (*Cyprinus carpio*) örnekleri kullanıldı. Çalışma 3 tekrarlı olarak yürütüldü. Her bir tekrar için 6 akvaryum ve 60 balık olmak üzere toplamda 18 akvaryum ve 180 balık kullanıldı (Her bir tekrar için 6 akvaryum olmak üzere toplamda 18 akvaryum ve her bir tekrar için 60 balık olmak üzere toplamda 180 balık). Balıklar  $33 \times 100 \times 60$  cm ebatlarında ve su sıcaklığı ayarlanabilir ısıtıcılarla  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ ' ye ayarlanmış 6 farklı cam akvaryuma her birine 10 adet olacak şekilde yerleştirildi. Eş zamanlı olarak her bir tekrar için 6 akvaryumda bu işlem yapıldı. Balıkların 15 gün süreyle bu ortama adaptasyonu sağlandı.

15 günlük adaptasyon süresinden sonra, yine eşzamanlı olarak her bir tekrar için balıkların yerleştirildiği akvaryumlardan 2' sinin sıcaklığı  $18 \text{ }^\circ\text{C}$ ' ye düşürülürken, diğer ikisinin ise  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ ' ye yükseltildi. Bu işlem her iki saatte bir sıcaklığın  $1 \text{ }^\circ\text{C}$  azaltılması/artırılması şeklinde yapıldı. 2 akvaryumun sıcaklığı ise  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ ' de sabit tutuldu. Böylece 18, 23 ve  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  su sıcaklığına sahip aşağıdaki gruplar oluşturularak polen içeren yemlerle balıklar beslendi.

**Grup 1 ( $18 \text{ }^\circ\text{C}$ ):**  $18 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanmayan grup,

**Grup 2 ( $23 \text{ }^\circ\text{C}$ -Kontrol Grubu):**  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanmayan grup,

**Grup 3 ( $28 \text{ }^\circ\text{C}$ ):**  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanmayan grup,

**Grup 4 ( $18 \text{ }^\circ\text{C} + \text{Po}$ ):**  $18 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklıkta tutulan ve % 2,5 oranında polen uygulanan grup,

**Grup 5 ( $23 \text{ }^\circ\text{C} + \text{Po}$ ):**  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklıkta tutulan ve % 2,5 oranında polen uygulanan grup,

**Grup 6 ( $28 \text{ }^\circ\text{C} + \text{Po}$ ):**  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklıkta tutulan ve % 2,5 oranında polen uygulanan grup.

Sazanlar için optimum su sıcaklığı  $22-24 \text{ }^\circ\text{C}$  olduğu için (Çelikkale, 1994),  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklıkta tutulan ve polen içermeyen yemlerle beslenen balıklar kontrol grubu olarak seçildi. Çalışma sırasında su sıcaklığının ayarlanan seviyelerde sabit kalarak süreklilik göstermesi için günde 4 defa ölçüm yapıldı. Çalışmanın 3., 7. ve 10. günlerinde akvaryum sularının 2/3' ü sifonlama yapılarak değiştirildi. Eksilen sular daha önceden sıcaklıkları 18, 23 ve  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ ' ye ayarlanmış sularla tamamlandı.

Polen örnekleri Yalova ilindeki arıcılardan temin edildi ve palinolojik olarak tanımlanarak edildi. Yapılan analiz sonucunda çalışmada kullanılan polenin miks polen (*Castanea sativa*, Fabaceae, Asteraceae, Trifolium spp) olduğu belirlendi. Polenin metanolik ekstrasyonunun analizi neticesinde total fenolik madde miktarı  $1719,20 \pm 45,74$  mg GAE/100 g (GAE: Gallic acid equivalents) ve antioksidan aktivite  $33,65 \pm 2,57$  mg AAE/g (AAE: Ascorbic acid equivalents) olarak belirlendi.

Polenin uygulanan dozu (% 2,5 w/w) El-Asely vd. (2014)' e göre belirlendi. Polen içeren yemlerin hazırlanması için önce polen örnekleri % 2,5 oranında tartılıp 1 L su içerisinde çözüldü. Daha sonra özel bir firmadan alınarak toz haline getirilmiş pelet yemler (Ecobio; % 45 ham protein, % 20 ham yağ, % 11 kül, % 3 lif, % 8,5 nem, % 12,5 azotsuz öz madde, 5124 kcal) polen içeren 1 L' lik su ile hamur haline getirildi. Bu karışım kıyma makinesinden geçirildi ve tekrar pelet haline dönüştürüldü. Hazırlanan peletler tepsilere yerleştirilip yem fırınına kurutuldu. Yemler, kullanılabilecek kadar oluşabilecek herhangi bir oksidasyonu önlemek için renkli cam şişelerde  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ' de muhafaza edildi (Harlioğlu vd., 2012; El-Asely vd., 2014; Mişe Yonar vd., 2020).

14 günlük uygulamadan sonra 15. günde kan örnekleri, benzocain (25 mg/L) ile anestezi edilen balıklardan kaval pedünkül bölgesinin kesilmesiyle EDTA'lı tüplere alındı. Kan örneklerinin alınmasından sonra klinik muayenesi yapılan balıklar otopsi edildi (Arda vd., 2017) ve karaciğer, böbrek ve solungaç örnekleri çıkarıldı. Doku örnekleri folyolara sarılarak  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ' deki derin dondurucuya bırakıldı (Mişe Yonar vd., 2011; Sakin vd., 2012).

EDTA' lı tüplere alınan kan örneklerinde plazmalar çıkarılmadan önce oksidatif radikal üretimi

(nitrobluetetrazolium-NBT aktivitesi) belirlendi (Siwicki vd., 1994). Daha sonra plazma elde etmek için kan örnekleri 3500 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Plazmada total protein (TP) ve total immunoglobulin (TI) düzeyleri Siwicki vd. (1994) tarafından açıklanan yöntemle ölçüldü.

Antioksidan parametrelerin belirlenmesi için homojenatlar hazırlandı. Karaciğer, böbrek ve solungaç örneklerinden homojenatların hazırlanması için Sakin vd. (2011) ve Mişe Yonar vd. (2017a)' in bildirdiği yöntemler kullanıldı. Homojenizasyon işleminin sonunda elde edilen süpernatantlarda lipid peroksidasyonun bir göstergesi olarak malondialdehit (MDA) düzeyi (Placer vd. 1966), antioksidan durumun belirlenmesi için ise redükte glutatyon (GSH) düzeyi (Ellman, 1959) ve glutatyon S-transferaz (GST) aktivitesi (Habig vd., 1974) ölçüldü.

GST spesifik enzim aktivitesi ile MDA ve GSH düzeylerini hesaplamak için ölçülen doku protein düzeyleri Lowry vd. (1951)' nin tarif ettiği yöntemle göre belirlendi.

Sonuçların istatistiksel analizleri SPSS 22.0 istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol ve deneysel grupların immunolojik ve antioksidan parametrelerinde oluşan değişimlerin belirlenmesi için tek yönlü varyans analizi (ONEWAY – ANOVA) kullanıldı. Gruplar arasındaki farklılıklar ise Least Significant Difference (LSD) test edildi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak gösterildi.

## BULGULAR

Çalışmaya başlamadan önceki 15 günlük adaptasyon sürecinde balıklarda herhangi bir ölüm olayına rastlanmadı. Adaptasyon ve deneme süresi boyunca balıkların yem alımlarında herhangi bir olumsuzluk yaşanmadı. Deneme süresi boyunca kontrol ve deneme grubu balıklarında ölüm gözlenmedi.

Kontrol ve deneme gruplarının NBT aktivitesi ile TP ve TI düzeylerindeki değişimler Tablo 1' de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Deneme gruplarının NBT aktivitesi (mg/mL) ile TP ve TI düzeyleri (mg/mL)

**Table 1.** NBT activity (mg/mL) and TP and TI (mg/mL) levels of the experimental groups

Gruplar	NBT	TP	TI
18 °C	1,72 $\pm$ 0,17 <sup>c</sup>	25,59 $\pm$ 4,13 <sup>a</sup>	10,41 $\pm$ 2,41 <sup>a</sup>
23 °C (Kontrol)	1,34 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	31,24 $\pm$ 3,15 <sup>b</sup>	13,11 $\pm$ 3,62 <sup>b</sup>
28 °C	1,30 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	32,08 $\pm$ 5,37 <sup>b</sup>	14,09 $\pm$ 4,06 <sup>b</sup>
18 °C + Po	1,32 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	30,86 $\pm$ 5,19 <sup>b</sup>	12,84 $\pm$ 2,33 <sup>b</sup>
23 °C + Po	1,61 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>	37,15 $\pm$ 6,11 <sup>c</sup>	19,71 $\pm$ 3,20 <sup>c</sup>
28 °C + Po	1,33 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	32,27 $\pm$ 4,32 <sup>b</sup>	13,40 $\pm$ 3,34 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c,d,e</sup> Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel farkı göstermektedir ( $p < 0,05$ ).

Kontrol grubu (23 °C) ile aynı sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan grubun (23 °C + Po) NBT aktivitesinde belirlenen artış istatistiksel olarak önemli bulundu ( $p < 0,05$ ). Kontrol grubuna (23 °C) göre, 18 °C sıcaklıkta tutulan fakat polen

uygulanmayan grubun (18 °C) NBT aktivitesinde belirlenen artış istatistiksel olarak önemli bulunurken ( $p < 0,05$ ), 28 °C sıcaklıkta tutulan fakat polen uygulanmayan grubun (28 °C) NBT aktivitesinde belirlenen azalma önemsiz bulundu ( $p > 0,05$ ). Ancak 18 °C sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan (18 °C + Po) grup ile 28 °C sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan (28 °C + Po) grubun NBT değerlerinin kontrol grubundan (23 °C) istatistiksel olarak önemli herhangi bir farklılık göstermediği saptandı ( $p > 0,05$ ).

Kontrol grubu (23 °C) ile aynı sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan grubun (23 °C + Po) TP ve TI düzeylerinin arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ( $p < 0,05$ ). Kontrol grubuna (23 °C) göre 18 °C sıcaklıkta tutulan fakat polen uygulanmayan grubun (18 °C) TP ve TI düzeylerinde belirlenen azalma istatistiksel olarak önemli bulunurken ( $p < 0,05$ ), 28 °C sıcaklıkta tutulan fakat polen uygulanmayan grubun (28 °C) TP ve TI düzeylerinde belirlenen artış önemsiz bulundu ( $p > 0,05$ ). Ancak 18 °C sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan grup (18 °C + Po) ile 28 °C sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan grubun (28 °C + Po) TP ve TI düzeylerinin kontrol grubuna (23 °C) kıyasla istatistiksel olarak önemli herhangi bir farklılık göstermediği saptandı ( $p > 0,05$ ).

Kontrol ve deneme gruplarının karaciğer, böbrek ve solungaç MDA düzeylerindeki değişimler Tablo 2' de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Deneme gruplarının doku MDA düzeyleri (nmol/g protein)

**Table 2.** Tissue MDA levels (nmol/g protein) of the experimental groups

Gruplar	Karaciğer	Böbrek	Solungaç
18 °C	2,91 $\pm$ 1,09 <sup>e</sup>	1,56 $\pm$ 0,76 <sup>c</sup>	2,52 $\pm$ 1,14 <sup>e</sup>
23 °C (Kontrol)	1,49 $\pm$ 0,71 <sup>b</sup>	1,50 $\pm$ 0,57 <sup>b,c</sup>	1,97 $\pm$ 0,89 <sup>b</sup>
28 °C	3,45 $\pm$ 1,25 <sup>f</sup>	2,67 $\pm$ 1,10 <sup>e</sup>	3,92 $\pm$ 0,99 <sup>f</sup>
18 °C + Po	1,69 $\pm$ 0,86 <sup>c</sup>	1,43 $\pm$ 0,57 <sup>b</sup>	2,19 $\pm$ 0,86 <sup>c</sup>
23 °C + Po	1,24 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>	1,35 $\pm$ 0,69 <sup>a</sup>	1,72 $\pm$ 0,65 <sup>a</sup>
28 °C + Po	2,33 $\pm$ 1,22 <sup>d</sup>	1,93 $\pm$ 0,67 <sup>d</sup>	2,37 $\pm$ 0,84 <sup>d</sup>

<sup>a,b,c,d,e</sup> Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel farkı göstermektedir ( $p < 0,05$ ).

Kontrol grubu (23 °C) ile kıyaslandığında, kontrol grubuyla aynı sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan grubun (23 °C + Po) karaciğer, böbrek ve solungaç MDA düzeylerinde belirlenen düşüş istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) bulundu.

Kontrol grubuna (23 °C) kıyasla, 18 °C sıcaklıkta tutulan fakat polen uygulanmayan grupta (18 °C) karaciğer ve solungaç MDA düzeylerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde yükseldiği ( $p < 0,05$ ) saptandı. Bu grubun böbrek MDA düzeyinde belirlenen artış ise istatistiksel olarak önemsiz bulundu ( $p > 0,05$ ). Yine kontrol grubuyla kıyaslandığında 28 °C sıcaklıkta tutulan fakat polen uygulanmayan grubun (28 °C) karaciğer, böbrek ve solungaç MDA düzeylerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı ( $p < 0,05$ ) belirlendi.

18 °C ve 28 °C sıcaklıkta tutulan fakat polen uygulanmayan

gruplarla kıyaslandığında 18 °C sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan grup (18 °C + Po) ile 28 °C sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan (28 °C + Po) grubun karaciğer, böbrek ve solungaç MDA düzeylerinin istatistiksel olarak düştüğü ( $p < 0,05$ ) tespit edildi. Fakat her iki grubun (18 °C + Po ve 28 °C + Po) karaciğer ve solungaç MDA düzeyleri düşmesine rağmen yine de kontrol grubundan yüksek bulunurken, 18 °C + Po grubunun böbrek MDA düzeyi kontrol grubundan düşük bulundu.

Kontrol ve deneme gruplarının karaciğer, böbrek ve solungaç GSH düzeylerindeki değişimler **Tablo 3'** de gösterilmiştir.

Kontrol grubu (23 °C) ile kıyaslandığında, kontrol grubuyla aynı sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan grubun (23 °C + Po) karaciğer, böbrek ve solungaç GSH düzeylerinde belirlenen artış istatistiksel olarak önemli ( $p < 0,05$ ) bulundu.

Kontrol grubuna (23 °C) kıyasla, 18 °C ve 28 °C sıcaklıkta tutulan fakat polen uygulanmayan gruplarda karaciğer, böbrek ve solungaç GSH düzeylerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığı ( $p < 0,05$ ) belirlendi.

18 °C ve 28 °C sıcaklıkta tutulan fakat polen uygulanmayan gruplarla kıyaslandığında 18 °C sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan grup (18 °C + Po) ile 28 °C sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan (28 °C + Po) grubun karaciğer, böbrek ve solungaç GSH düzeylerinin istatistiksel olarak arttığı ( $p < 0,05$ ) tespit edildi. Fakat her iki grubun (18 °C + Po ve 28 °C + Po) karaciğer ve böbrek GSH düzeyleri artmasına rağmen yine de kontrol grubundan düşük bulunurken, solungaç dokusunun GSH düzeyi kontrol grubundan yüksek bulundu.

**Tablo 3.** Deneme gruplarının doku GSH düzeyleri ( $\mu\text{mol/g}$  protein)

**Table 3.** Tissue GSH levels (nmol/g protein) of the experimental groups

Gruplar	Karaciğer	Böbrek	Solungaç
18 °C	29,95 ± 7,14 <sup>b</sup>	33,75 ± 7,01 <sup>b</sup>	11,98 ± 3,87 <sup>b</sup>
23 °C (Kontrol)	40,21 ± 8,91 <sup>d</sup>	45,85 ± 7,94 <sup>e</sup>	14,69 ± 2,21 <sup>c</sup>
28 °C	23,75 ± 7,31 <sup>a</sup>	26,94 ± 6,19 <sup>a</sup>	10,53 ± 3,41 <sup>a</sup>
18 °C + Po	38,81 ± 7,28 <sup>d</sup>	40,97 ± 7,55 <sup>d</sup>	19,04 ± 3,57 <sup>e</sup>
23 °C + Po	52,31 ± 9,71 <sup>e</sup>	54,96 ± 6,75 <sup>f</sup>	23,67 ± 3,61 <sup>f</sup>
28 °C + Po	35,59 ± 6,78 <sup>c</sup>	37,58 ± 7,89 <sup>c</sup>	17,53 ± 3,93 <sup>d</sup>

<sup>a,b,c,d,e</sup> Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel farkı göstermektedir ( $p < 0,05$ ).

Kontrol ve deneme gruplarının karaciğer, böbrek ve solungaç GST aktivitelelerindeki değişimler **Tablo 4'** de verilmiştir.

Kontrol grubu (23 °C) ile kıyaslandığında, kontrol grubuyla aynı sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan grupta (23 °C + Po) karaciğer, böbrek ve solungaç GST aktivitelelerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı ( $p < 0,05$ ) tespit edildi.

Kontrol grubuna (23 °C) kıyasla, 18 °C ve 28 °C sıcaklıkta tutulan fakat polen uygulanmayan gruplarda karaciğer, böbrek

ve solungaç GST aktivitelelerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığı ( $p < 0,05$ ) belirlendi.

18 °C ve 28 °C sıcaklıkta tutulan fakat polen uygulanmayan gruplarla kıyaslandığında, 18 °C sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan (18 °C + Po) grup ile 28 °C sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan (28 °C + Po) grubun karaciğer, böbrek ve solungaç GST aktivitelelerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı ( $p < 0,05$ ), fakat yine de kontrol grubundan düşük olduğu tespit edildi.

**Tablo 4.** Deneme gruplarının doku GST aktiviteleleri ( $\mu\text{mol/dakika/mg}$  protein)

**Table 4.** Tissue GST activities ( $\mu\text{mol/dakika/mg}$  protein) of the experimental groups

Gruplar	Karaciğer	Böbrek	Solungaç
18 °C	6,43 ± 19,62 <sup>a</sup>	8,71 ± 16,30 <sup>b</sup>	05,06 ± 15,92 <sup>b</sup>
23 °C (Kontrol)	25,61 ± 17,21 <sup>d</sup>	30,96 ± 18,91 <sup>d</sup>	19,81 ± 17,53 <sup>c</sup>
28 °C	3,78 ± 18,44 <sup>a</sup>	2,59 ± 15,02 <sup>a</sup>	9,53 ± 18,74 <sup>a</sup>
18 °C + Po	18,48 ± 18,11 <sup>c</sup>	18,58 ± 15,57 <sup>c</sup>	16,48 ± 11,43 <sup>c</sup>
23 °C + Po	37,29 ± 23,87 <sup>e</sup>	46,49 ± 20,10 <sup>e</sup>	32,69 ± 17,35 <sup>d</sup>
28 °C + Po	05,73 ± 17,64 <sup>b</sup>	02,47 ± 17,85 <sup>b</sup>	15,73 ± 16,74 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c,d,e</sup> Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel farkı göstermektedir ( $p < 0,05$ ).

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Balıklarda nonspesifik immün direncin en önemli basamağını oluşturan fagositoz kemotaksis, opsonizasyon, absorpsiyon, intraselüler yıkım ve sindirim gibi birçok safhada gerçekleşmektedir. Fagositozda birinci derecede görev alan makrofajlar ve polimorfnükleer lökositler (özellikle nötrofiller) respiratory burst (solunum patlaması) sırasında reaktif oksijen türleri üretirler. Nötrofillerin oksidatif radikal üretimi yani bir başka ifadeyle ürettikleri reaktif oksijen türlerinin miktarı, nötrofillerin fagositik aktivitesinin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Bunun için de en çok kullanılan yöntemlerin başında NBT testi gelmektedir (Siwicki ve Studnicka, 1987). Tilapia (*Oreochromis niloticus*) larda yapılmış bir çalışmada balıkların fagositik hücre (nötrofil ve monositler) sayısının polen uygulamasıyla arttığı belirlenmiştir. Benzer şekilde Mişe Yonar vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada, güçlü bir antioksidan ve immunostimulan olan ayrıca yapısındaki bileşiklerle polene benzerlik gösteren propolis uygulandığı sazanlarda NBT aktivitesinin yükseldiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada da kontrol grubu (23 °C) balıklarıyla kıyaslandığında kontrol grubuyla aynı sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan, diğer bir ifadeyle sıcaklık değişimlerinden bağımsız olarak yalnız polen uygulanan gruptaki (23 °C + Po) balıklarda, NBT aktivitesinin yükseldiği tespit edilmiş, elde edilen bu sonuç yukarıdaki çalışmalardan elde edilen sonuçlarla paralellik göstermiştir.

Diğer taraftan Ndong vd. (2007) 27 °C' ye adapte edilmiş tilapia (*Oreochromis mossambicus*) larda sıcaklığın 19 ve 23 °C' ye düşürülmesi ve yine sıcaklığın 31 ve 35 °C' ye

yükseltilmesi sonucunda spesifik ve nonspesifik bağışıklık parametrelerinde meydana gelen değişimleri araştırmışlardır. 12, 24, 48 ve 96 saat sonunda balıklardan alınan örneklerde, NBT testi kullanılarak belirlenen respiratory burst aktivitesinin 24, 48 ve 96 saatlerde, fagositik aktivitenin ise 12. saatten itibaren hem düşük hem de yüksek sıcaklıklarda tutulan balıklarda azaldığı belirlenmiştir. Yine bu çalışmada 48. saatten sonra düşük sıcaklıklarda tutulan balıkların fagositik aktivitesinin normal seviyeye geldiği fakat yüksek sıcaklıklarda tutulan balıklarda böyle bir sonucun gözlemlenmediği ifade edilmiştir. Bu araştırmacının (Ndong vd., 2007) elde ettiği bulguların aksine Nikoskelainen vd. (2004), gökkuşuğu alabalığında respiratory burst aktivitesinin sıcaklıkla arttığını, Dittmar vd. (2014) ise 13, 18 ve 24 °C' de stoklanmış *Gasterosteus aculeatus* türü balıklarda respiratory burst aktivitesinin ve lenfosit proliferasyonunun düşük sıcaklıkta arttığını, yüksek sıcaklıkta azaldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada 18 °C sıcaklıkta tutulan fakat polen uygulanmayan balıkların NBT aktivitesi istatistiksel olarak önemli düzeyde artmış, 28 °C sıcaklıkta tutulan fakat polen uygulanmayan balıklarda ise önemsiz bir şekilde azalmıştır. Diğer çalışmalardan elde edilen bulgularla bu çalışmadan elde edilen bulgular arasındaki farklılığın nedeni balığın türü, sıcaklık değişimindeki farklılık ve sıcaklığın uygulanma süresi olabilir.

Toplam plazma proteini nonspesifik immün sistemin (Jeney vd., 1997), immunoglobulinler ise spesifik bağışıklığın en önemli humoral unsuru olarak kabul edilmektedir (Siwicki vd., 1994). Memelilerde beş farklı immunoglobulin sınıfı bulunurken (Diker, 1998), balıklarda bunlardan sadece IgM' nin varlığı kesin olarak belirlenmiştir (Darson, 1981). Bu çalışmada kontrol grubuyla aynı sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan balıklarda, TP ve TI düzeylerinin yükseldiği gözlemlenmiştir. Benzer sonuçlar başka bir araştırmacı tarafından da ifade edilmiş, farklı oranlarda polen içeren yemlerin uygulandığı tilapia (*Oreochromis niloticus*) ların total plazma protein düzeyinde belirlenen artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (El-Asely vd., 2014).

Ayrıca bu çalışmada 18 °C sıcaklıkta tutulan fakat polen uygulanmayan balıkların TP ve TI düzeyleri istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmış, 28 °C sıcaklıkta tutulan fakat polen uygulanmayan balıklarda ise önemsiz bir şekilde artmıştır. Balıklarda bağışıklığın humoral faktörlerinin yüksek sıcaklıkla arttığı belirtilmiştir (Ndong vd., 2007). Langston vd. (2002), Nikoskelainen vd. (2004) ve Holland vd. (2002) lizozim, C-raktif protein ve komplement aktivitesi gibi humoral faktörlerin balıklarda artan sıcaklıkla yükseldiğini ifade ederken, buna karşılık olarak lizozim aktivitesinin düşük sıcaklığa transfer edilen çipuralarda azaldığı belirtilmiştir (Tort vd., 1998; Tort vd., 2004). Genel bir fenomen olarak poikloterm bir canlı olan balıklarda su sıcaklığı ve antikor düzeyi arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır. Bu fenomen *Dicentrarchus labrax*, *Oreochromis aureus*, *Paralichthys olivaceus*, *Hippoglossus hippoglossus*, *Pecoglossus altivelis*, *Oreochromis niloticus*, *Gadus morhua* ve *Scophthalmus maximus* türlerini de içeren birçok balık türünde kanıtlanmıştır (Makrinos ve Bowden,

2016). Bununla birlikte balıklarda nonspesifik bağışıklık düşük sıcaklıkta daha fazla aktivite gösterirken, spesifik bağışıklık ise yüksek sıcaklıkta daha fazla aktive olmaktadır (Makrinos ve Bowden, 2016). Yukarıda ifade edilen çalışmalarla uyumlu bir şekilde bu çalışmada da düşük sıcaklıkla TP ve TI düzeyi azalmıştır. Fakat yüksek sıcaklığın bu parametrelere istatistiksel olarak herhangi bir etkisi belirlenmemiştir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara bakılarak, sazanlarda etkili bir immün fonksiyon için sıcaklığın optimal sınırlar içinde olması gerektiği ve bu sıcaklığın 23 °C olduğu, düşük ve yüksek sıcaklığın Makrinos ve Bowden (2016) tarafından bildirilen çalışmayla uyumlu olarak immün parametrelerde dalgalanmalara yol açtığı görülmektedir. Bununla birlikte düşük ve yüksek sıcaklıklarla birlikte polen uygulanan 18 °C + Po ve 23 °C + Po grubu balıklarda, polen uygulamasının bir sonucu olarak sıcaklık farklılıklarının yol açtığı immün parametrelerdeki dalgalanmalar engellenebilir. Diğer taraftan kontrol grubu (23 °C) balıklarıyla kıyaslandığında kontrol grubuyla aynı sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan, diğer bir ifadeyle sıcaklık değişimlerinden bağımsız olarak yalnız polen uygulanan gruptaki (23 °C + Po) balıklarda incelenen tüm immün parametreler yükseldiği için polenin sazanlarda bir immunostimulan olarak kullanılabileceği söylenebilir.

Oksijenden tek elektron indirgenmesi sonucu oluşan serbest radikaller proteinlerin, lipitlerin, karbohidratların ve nükleik asitlerin yıkımına sebep olabilirler. Bununla birlikte DNA' ya zarar verme, enzimlerin aktivasyonunu ve membran geçirgenliğini bozarma diğer olumsuz etkileridir. Doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımıyla meydana gelen lipid peroksidasyon sonucu açığa çıkan aldehitlerden biri olan MDA, hücrelerde oluşan oksidatif zararın en önemli göstergelerinden birisidir (Bragadottir, 2001; Morales vd., 2004; Mişe Yonar 2017b). Bu çalışmada da karaciğer, böbrek ve solungaç dokusunda, farklı su sıcaklıkları uygulamasıyla meydana gelen oksidatif stresin belirlenmesi için MDA düzeyindeki değişimler araştırılmıştır.

Dastan vd. (2017) 96 saat süreyle 0,5, 2,5, 5, 10, 20 ve 30 ppm konsantrasyonlarındaki polenin, alabalıklarda karaciğer MDA düzeyini tüm deneysel gruplarda, dalak ve kalp MDA düzeyini ise 0,5 ppm grubu dışındaki tüm deneysel gruplarda düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Bu araştırmacıların (Dastan vd., 2017) elde ettiği sonucun aksine Ferreira vd. (2012) bir fungusit olan tebukonazolün etkisindeki *Rhamdia quelen* türü balıklarda, yalnız polenin uygulandığı grubun karaciğer, böbrek ve beyin MDA düzeylerinde istatistiksel herhangi bir farklılık belirlememişlerdir. Bu çalışmada da Dastan vd. (2017) tarafından elde edilen sonuçlara paralel olarak, kontrol grubuyla aynı sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan gruptaki (23 °C + Po) balıkların karaciğer, böbrek ve solungaç MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir.

Su sıcaklığının balıklarda oluşturduğu stres konusunda bazı çalışmalar yapılmıştır. Örneğin; Kontrol (24 °C) grubuna göre 20 °C ve 28 °C' lik sıcaklıkların uygulandığı pullu sazanın karaciğer ve böbrek dokusundaki MDA düzeyinin önemli

düzeyde arttığı ifade edilmiştir (Mişve Yonar vd., 2013). Benzer şekilde Vinagre vd. (2012), 16 °C' ye adapte ettikleri deniz levrekleri (*Dicentrarchus labrax*)' nde su sıcaklığının 18, 24 ve 28 °C' ye yükseltilmesiyle kas MDA düzeyinin yükseldiğini bildirmişlerdir. Roche ve Bogé (1996) aynı balık türünde oksidatif stres üzerine sıcaklığın etkisini araştırdıkları çalışmalarında, lipit peroksidasyon ve katalaz aktivitesinin termal stresle arttığını bulmuşlardır. Hwang ve Lin (2002) tarafından yapılan bir çalışmada da 25 °C ve 35 °C' de 10 hafta için ayrı ayrı kültür edilen sazanlarda hepatopankreas ve kas dokusundaki TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) düzeyinin 35 °C' de tutulan balıklarda 25 °C' de tutulanlara kıyasla arttığı, bu balıklara vitamin C uygulamasıyla bu olumsuzluğun giderildiği belirlenmiştir. Diğer taraftan düşük sıcaklığın balıklarda oluşturduğu oksidatif stres de araştırılmıştır. Örneğin 11 °C' den 8 °C' ye sıcaklığın düşürülmesiyle strese sokulmuş salmonların karaciğer, böbrek ve beyin dokularındaki lipid peroksidasyon düzeyleri araştırılmış, 48. saatten itibaren MDA düzeyindeki artış en yüksek böbrekte en az karaciğerde belirlenmiştir. Bunun nedeni de karaciğerde vitamin E düzeyinin yüksek, böbrekte ise düşük olmasına bağlanmıştır (Welker ve Congleton, 2004). Bu çalışmada da kontrol grubu (23 °C)' na kıyasla düşük (18 °C) ve yüksek (28 °C) sıcaklıkta tutulan fakat polen uygulanmayan gruplarda MDA düzeyi istatistiksel olarak artmış ve yukarıdaki araştırmacıların bulgularıyla paralel bulunmuştur. Fakat düşük (18 °C) ve yüksek (23 °C) sıcaklıklarda tutulan balıklara kıyasla, düşük ve yüksek sıcaklıklarda tutulan ve polen uygulanan (18 °C + Po ve 28 °C + Po) balıklarda MDA düzeyinin azaldığı belirlenmiştir. Polenin bu etkisi onun güçlü radikal temizleyici fonksiyonuyla (Eraslan vd., 2009) ve yapısında bulunan fenolik maddelerle (Leja vd., 2007) açıklanabilir.

Balıklarda antioksidanlar diğer yüksek omurgalılarda olduğu gibi enzimatik ve non-enzimatik olarak sınıflandırılırlar. Balıklarda bulunan antioksidan enzimler, süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ni temizleyen süperoksit dismutaz (SOD), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i temizleyen katalaz (CAT), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve lipid hidroperoksitleri yok eden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ile glutatyonu bağlı diğer enzimlerdir (Belló vd., 2000; Mourente vd., 2002; Puangkaew vd., 2005).

Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif stresten koruyan tripeptit karakterdeki GSH, çok önemli bir antioksidan olup non-enzimatik ve endojen özelliktedir. Protein yapısındaki sülfhidril gruplarını indirgenmiş halde tutan GSH böylece çoğu protein ve enzimin inaktive olmasını önler (Hayes ve McLellan 1999). Diğer taraftan GSH ile elektrofilik gruplar arasındaki konjugasyonu katalizleyen GST, ksenobiyotik ve endojen bileşiklerin detoksifikasyonu ve biyotransformasyonunda görevli faz II enzim ailesinin bir üyesidir (Hamed vd., 2003).

Bu çalışmada kontrol grubuyla aynı sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan balıklarda (23 °C + Po), GSH düzeyinin ve GST aktivitesinin kontrol grubuna (23 °C) göre arttığı belirlenmiştir. Aynı gruptaki balıkların MDA düzeyindeki

düşüşle de ilişkili olarak antioksidan parametrelerde belirlenen bu artış polenin güçlü bir antioksidan olduğunu ve antioksidan kapasiteyi arttırdığını göstermektedir (Eraslan vd., 2009). Dastan vd. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, alabalıkların karaciğer, dalak ve kalp dokusundaki total serbest sülfirid grup düzeylerinin polenin uygulamasıyla arttığı, polenin toplam antioksidan kapasiteyi (TAS) artırarak total oksidan kapasiteyi (TOS) düşürdüğü belirlenmiştir. Ferreira vd. (2012) ise *Rhamdia quelen* türü balıklarda, polen uygulamasıyla karaciğer GST aktivitesinin arttığı, böbrek GST aktivitesinin düştüğü, beyin dokusundaki GST aktivitesinin ise etkilenmediğini ifade etmişlerdir. Yukarıda adı geçen araştırmacıların elde ettiği sonuçlar bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla uyumlu bulunmuştur.

Diğer taraftan bu çalışmada düşük (18 °C) ve yüksek (28 °C) sıcaklıklarda tutulan fakat polen uygulanmayan balıkların karaciğer, böbrek ve solungacındaki GSH düzeyi, kontrol grubu (23 °C)' na göre düşük bulunmuştur. Hwang ve Lin (2002) 25 °C su sıcaklığında tutulan sazanlara kıyasla 35 °C' de tutulanların hepatopankreas ve kas dokusundaki GSH düzeylerinin azaldığını ifade etmişlerdir. Kısa süreli yüksek sıcaklık uygulanan *Heteropneustes fossilis* türü balıklarda solungaç GSH-Px aktivitesi ve GSH düzeyi azalmıştır (Parihar vd., 1997). Benzer şekilde yine düşük (18 °C) ve yüksek (28 °C) sıcaklıklarda tutulan ancak polen uygulanmayan grupların karaciğer, böbrek ve solungacındaki GST aktivitesinin bu çalışmada azaldığı belirlenmiştir. *Paralichthys olivaceus* türü balıkların karaciğerindeki süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktivitesinin kontrol grubuna (25 °C) göre 28, 30 ve 32 °C' deki deneme gruplarında uygulamanın 13. ve 19. günlerinde düştüğü belirlenmiştir (Lou vd., 2011). Kaur vd. (2005) 3 saat için sıcaklığın 12 °C artırılmasıyla 32 °C' de strese sokulmuş *Channa punctata* türü balıklarda karaciğer, böbrek ve solungaç GST enzim aktivitesinin kontrol grubu (20 °C)' na göre azaldığını göstermişlerdir. Fakat bu çalışmada düşük ve yüksek sıcaklıklarda tutulan ancak polen uygulanan balıkların (18 °C + Po ve 28 °C + Po) karaciğer, böbrek ve solungacındaki GSH düzeyi ve GST aktivitesinin polen uygulanmayanlara (18 °C ve 28 °C) kıyasla arttığı bulunmuştur. Bunun nedeni kontrol grubuyla aynı sıcaklıkta tutulan ve polen uygulanan grupta da (23 °C + Po) gösterildiği gibi polenin serbest radikalleri temizlemesi ve antioksidan kapasiteyi arttırmasının bir sonucu olabilir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, balıkların özellikle optimum aralıklar dışındaki çevresel sıcaklığa oldukça duyarlı olduğu, immun sistem fonksiyonlarının ve antioksidanların etkilerinin su sıcaklığıyla değiştiği söylenebilir. Polenin su sıcaklığının neden olduğu immun ve antioksidan parametreler üzerindeki olumsuz etkileri önleyebileceği, polenin balıklarda bir immunostimulan ve antioksidan olarak kullanılabileceği sonucuna varılabilir. Fakat farklı balık türlerinde, farklı sıcaklıklarda, farklı doz ve sürelerde polen uygulamalarının sonuçlarına ihtiyaç olduğu görülmektedir.

## TEŞEKKÜR VE MADDİ DESTEK

Bu çalışma; Yüksek Mühendis Merve TAŞKAN'ın yüksek lisans tezinden özetlenmiş ve Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Yönetim Birimi tarafından SÜF.16.07. nolu proje olarak desteklenmiştir. Polen örneklerinin palinolojik olarak identifikasyonu için Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi'nden Prof. Dr. Sibel SİLİCİ'ye teşekkür ederiz.

## YAZARLIK KATKISI

Merve TAŞKAN: Tasarım, denemenin yürütülmesi, örneklerin laboratuvarında analizi, yazma. M. Enis YONAR: Tasarım, gözden geçirme, düzenleme.

## REFERENCES

- Abbass, A.A., El-Asely, A.M., & Kandiel, M.M.M. (2012). Effects of dietary propolis and pollen on growth performance, fecundity and some hematological parameters of *Oreochromis niloticus*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12, 851-859. [https://doi.org/10.4194/1303-2712-v12\\_4\\_13](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v12_4_13)
- Alfonso, S., Gesto, M., & Sadoul, B. (2020). Temperature increase and its effects on fish stress physiology in the context of global warming. *Journal of Fish Biology*, 98, 1496-1508. <https://doi.org/10.1111/jfb.14599>
- Arda, M., Seçer, S., & Sarıyüpeoğlu, M. (2017). *Fish Diseases. (Balık Hastalıkları)*. Ankara: Medisan Yayınevi (in Turkish).
- Belló, A.R.R., Fortes, E., Belló-Klein, A., Belló, A.A., Llesuy, S.F., Robaldo, R.B., & Bianchini, A. (2000). Lipid Peroxidation induced by *Clinostomum detrunctum* in muscle of the freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 42, 233-236. <https://doi.org/10.3354/dao042233>
- Bragadottir, M. 2001. Endogenous antioxidants in fish. The Degree of Master of Science in food science, Department of Food Science, University of Iceland.
- Buchtíková, S., Šimková, A., Rohlenová, K., Flajšhans, M., Lojek, A., Lilius, E.M., & Hyřil, P. (2011). The seasonal changes in innate immunity of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 318, 169-175. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.013>
- Çankaya, N., & Korkmaz, A. (2008). *Pollen. (Polen)*. Samsun: Samsun İl Tarım Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayın Şubesi Yayını (in Turkish)
- Çelikkale, M.S. (1994). *Freshwater Fish Culture. (İç Su Balıkları Yetiştiriciliği)*. Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi Yayınları, (in Turkish).
- Darson, M. (1981). Role and characterization of fish antibody. *Developmental Biological Standardisation*, 49, 307-319.
- Dastan, S.D., Gulhan, M.F., Selamoglu, Z., & Dastan, T. (2017). The determination of different effective concentration of ethanolic extract of bee pollen on biochemical analysis in liver, spleen and heart tissues of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 16(1), 326-340.
- Diker, S. (1998). *Immunology. (İmmunoloji)*. Ankara: Medisan Yayınevi.
- Dittmar, J., Janssen, H., Kuske, A., Kurtz, J., & Scharsack, J.P. (2014). Heat and immunity: an experimental heat wave alters immune functions in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Journal of Animal Ecology*, 83, 744-757. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12175>
- El-Asely, A.M., Abbass, A.A., & Austin, B. (2014). Honey bee pollen improves growth, immunity and protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 40, 500-506. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.07.017>
- Ellman, G.L. (1959). Tissue sulphhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70-77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- Eraslan, G., Kanbur, M., & Silici, S. (2009). Effect of carbaryl on some biochemical changes in rats: The ameliorative effect of bee pollen, *Food and Chemical Toxicology*, 47, 86-91. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.10.013>

## ÇIKAR/REKABET ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması ve/veya rekabet eden çıkarlar olmadığını beyan eder.

## ETİK ONAY

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından onaylanmıştır. (Protokol No: 2015/112, Karar No: 203).

## VERİ KULLANILABİLİRLİĞİ

Çalışma sırasında oluşturulan ve/veya analiz edilen veri setleri, editör veya hakemler tarafından talep edildiği takdirde ilgili yazar tarafından sağlanacaktır.

- Ferreira, D., Unfer, T.C., Rocha, H.C., Kreutz, L.C., Gessi Koakoski, G., & Barcellos, L.J.G. (2012). Antioxidant activity of bee products added to water in tebuconazole-exposed fish. *Neotropical Ichthyology*, 10(1), 215-220. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252012000100021>
- Habig, W.H., Pabst, M.J., & Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249 (22), 7130-7139.
- Hamed, R.R., Farid, N.M., Elowa, S.H.E., & Abdalla, A.M. (2003). Glutathione related enzyme levels of freshwater fish as bioindicators of pollution. *The Environmentalist*, 23, 313-322. <https://doi.org/10.1023/B:ENVR.0000031409.09024.cc>
- Harlioğlu, M.M., Çakmak, M.N., Köprücü, K., Aksu, Ö., Harlioğlu, A.G., Mişe Yonar, S., Çakmak Duran, T., Özcan, S., & Gündoğdu, H. (2012). The effect of dietary n-3 series fatty acids on the number of pleopodal egg and stage 1 juvenile in freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus* Eschscholtz. *Aquaculture Research*, 44, 860-868. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03090.x>
- Hayes, J.D., & McLellan, L.I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*, 31, 273-300. <https://doi.org/10.1080/10715769900300851>
- Heise, K., Puntarulo, S., Nikinmaa, M., Abele, D., & Pörtner, H.O. (2006). Oxidative stress during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus* L.. *Journal of Experimental Biology*, 209, 353-363. <https://doi.org/10.1242/jeb.01977>
- Holland, M.C.H., & Lambris, J.D. (2002). The complement system in teleosts. *Fish and Shellfish Immunology*, 12, 399-420. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0408>
- Hwang, D.F., & Lin, T.K. (2002). Effect of temperature on dietary vitamin C requirement and lipid in common carp. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 131(1), 1-7. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(01\)00449-3](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(01)00449-3)
- Jeney, G., Galeotti, M., Volpatti, D., Jeney, Z., & Anderson, D. P., 1997. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, 154, 1-15. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00042-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00042-2)
- Kaur, M., Atif, F., Ali, M., Rehman, H., & Raisuddin, S. (2005). Heat stress-induced alterations of antioxidants in the freshwater fish *Channa punctata* Bloch. *Journal of Fish Biology*, 67, 1653-1665. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2005.00872.x>
- Langston, A.L., Hoare, R., Stefansson, M., Fitzgerald, R., Wergeland, H., & Mulcahy, M. (2002). The effect of temperature on non-specific defence parameters of three strains of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 12, 61-76. <https://doi.org/10.1006/fsim.2001.0354>
- Leja, M., Mareczek, A., Wyzgolik, G., Klepac-Baniak, J., & Czekońska, K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species, *Food Chemistry*, 100(1), 237-240. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.047>

- Lou, B., Xu, D., Xu, H., Zhan, W., Mao, G., & Shi, H. (2011). Effect of high water temperature on growth, survival and antioxidant enzyme activities in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *African Journal of Agricultural Research*, 6(12), 2875-2882.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randal, R.J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biochemistry*, 193, 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Lushchak, V.I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13-30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Lushchak, V.I., & Bagnyukova, T.V., (2007). Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Perccottus glenii*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 148(4), 390-397. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.07.007>
- Makrinos, D.L., & Bowden, T.J. (2016). Natural environmental impacts on teleost immune function. *Fish and Shellfish Immunology*, 53, 50-57. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.008>
- Malek, R.L., Sajadi, H., Abraham, J., Grundy, M.A., & Gerhard, G.S. (2004). The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 138(3), 363-373. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.08.014>
- Martinez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., & Sanz, A. (2005). Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Fish Biology and Fisheries*, 15, 75-88.
- Mişe Yonar, S., Sakin, F., Yonar, M.E., İspir, U., & Kirici, M. (2011). Oxidative Stress Biomarkers of Exposure to Deltamethrin in Rainbow Trout Fry (*Oncorhynchus mykiss*). *Fresenius Environmental Bulletin*, 20(8), 1931-1935.
- Mişe Yonar, S., Ural, M.Ş., Silici, S., & Yonar, M.E. (2014). Malathion-induced changes in the haematological profile, the immune response, and the oxidative/antioxidant status of *Cyprinus carpio carpio*: Protective role of propolis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 102, 202-209. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.007>
- Mişe Yonar, S., Yonar, M.E., Sağlam, N., & S. Silici, S. (2013). Farklı su sıcaklıklarında tutulmuş pullu sazan (*Cyprinus carpio carpio* Linnaeus, 1758)'nin karaciğer ve böbreğindeki bazı antioksidan parametreleri üzerine propolisin etkisi. *Menba, Kastomunu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 1, 11-16.
- Mişe Yonar, S., Yonar, M.E., & Ural, M.Ş. (2017a). Antioxidant effect of curcumin against exposure to malathion in *Cyprinus carpio*. *Cellular and Molecular Biology*, 63(3), 68-72. <https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.3.13>
- Mişe Yonar, S., Köprücü, K., Yonar, M.E., & Silici, S. (2017b). Effects of dietary propolis on the number and size of pleopodal egg, oxidative stress and antioxidant status of freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz). *Animal Reproduction Science*, 184, 149-159. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.07.010>
- Mişe Yonar, S., Yonar, M.E., Pala, A., Sağlam, N., & Sakin, F. (2020). Effect of trichlorfon on some haematological and biochemical changes in *Cyprinus carpio*: The ameliorative effect of lycopene. *Aquaculture Reports*, 16, 100246. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100246>
- Morales, A.E., Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M.C., Abellán, E., & Gabriel C.G. (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 139(1-3), 153-161. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.10.008>
- Mourente, G., Diaz-Salvago, E., Bell, J.G., & Tocher, D.R. (2002). Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: attenuation by dietary vitamin E. *Aquaculture*, 214, 343-361. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00064-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00064-9)
- Ndong, D., Chen, Y., Lin, Y., Vaseeharan, B., & Chen, J. (2007). The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. *Fish and Shellfish Immunology*, 22, 686-694. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.08.015>
- Nikoskelainen, S., Bylund, G., & Lilius, E.M. (2004). Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. *Development and Comparative Immunology*, 28, 581-592. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2003.10.003>
- Parihar, M.S., & Dubey, A.K. (1995). Lipid peroxidation and ascorbic acid status in respiratory organs of male and female freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to temperature increase. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 112(3), 309-313. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(95\)02025-x](https://doi.org/10.1016/0742-8413(95)02025-x)
- Parihar, M.S. Javeri, T., Hemnani, T., Dubey, A.K., & Prakash, P. (1997). Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the fresh water catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. *Journal of Thermal Biology*, 22, 151-156. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(97\)00006-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(97)00006-5)
- Placer, Z.A. Cushman, L., & Johnson, B.C. (1966). Estimation of products of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 16, 359-364. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(66\)90167-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(66)90167-9)
- Puangkaew, J., Kiron, V., Satoh, S., & Watanabe, T. (2005). Antioxidant defense of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to dietary n-3 highly unsaturated fatty acids and vitamin E contents. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 140, 187-196. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.01.016>
- Roche, H., & Boge, G. (1996). Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Marine Environmental Research*, 41, 27-43. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(95\)00015-1](https://doi.org/10.1016/0141-1136(95)00015-1)
- Sakin, F., İspir, Ü., Mişe Yonar, S., Yonar, M.E., & Taysi, R. (2011). Effect of short-term cypermethrin exposure on oxidant-antioxidant balance in the whole body of rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*). *Fresenius Environmental Bulletin*, 20(10a), 2806-2809.
- Sakin, F., Mişe Yonar, S., Yonar, M.E., & Sağlam, N. (2012). Changes in selected immunological parameters and oxidative stress responses in different organs of *Oncorhynchus mykiss* exposed to ivermectin. *Revista de Chimie*, 63(10), 989-995.
- Siwicki, A., & Studnicka, M. (1987). The phagocytic ability of neutrophils and serum lysozyme activity in experimentally infected carp *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Biology*, 31(A), 57-60. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1987.tb05293.x>
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., & Rumsey, G.L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41, 125-139. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(94\)90062-0](https://doi.org/10.1016/0165-2427(94)90062-0)
- Tort, L., Rotllant, J., & Roviva, L. (1998). Immunological suppression in gilthead sea bream *Sparus aurata* of the north-west Mediterranean at low temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 120, 175-179. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10027-2](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10027-2)
- Tort, L., Rotllant, J., Liarte, C., Acerete, L., Hernández, A., Ceulemans, S., Coutteau, P., & Padros, F. (2004). Effect of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus aurata* fed with an experimental diet. *Aquaculture*, 229, 55-65. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00403-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00403-4)
- Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., & Diniz, M. (2012). Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological Indicators*, 23, 274-279. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.04.009>
- Welker, T.L., & Congleton, J.L. (2004). Oxidative stress in juvenile chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 35, 881-887. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01080.x>
- Xu, X., Sun, L., Dong, J., & Zhang, H. (2009). Breaking the cells of rape bee pollen and consecutive extraction of functional oil with superficial carbon oxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 42-46. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.08.004>
- Yang, X., Guo, D., Zhang, J., & Wu, M. (2007). Characterization and anti-tumor activity of pollen polysaccharide. *International Immunopharmacology*, 7(3), 401-408. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2006.11.001>