

## **Bazı Hematolojik ve İmmünolojik Parametreler Kullanılarak Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nda Oksitetrasiklinle İndüklenen Toksikiteye Karşı Polenin Koruyuculuğunun Araştırılması**

**Abdullah Emre SAFİ<sup>1</sup>**  
**Serpil MİŞE YONAR<sup>2</sup>**

**Özet:** Bu çalışmada, gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nda oksitetrasikline karşı polenin koruyuculuğunun araştırılması amacıyla bazı hematolojik ve immünolojik parametreler kullanıldı. Balıklara 60 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklin tek doz olarak enjekte edildi. Oksitetrasiklin enjekte edilen balıklara 30 ppm polen eş zamanlı olarak uygulandı. Deneme 96 saat sürdü ve bu sürenin sonunda balıklardan kan örnekleri alındı. Kan örneklerinde hematolojik (eritrosit sayısı, hemoglobin ve hematokrit düzeyleri) ve immünolojik (lökosit sayısı, oksidatif radikal üretimi (nitrobluetetrazolium-NBT aktivitesi), total protein ve total immüoglobulin düzeyleri) parametreler analiz edildi. Oksitetrasiklin enjekte edilen grubun hematolojik ve immünolojik değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük bulundu. Oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grupta hematolojik ve immünolojik değerlerin yalnız oksitetrasiklin uygulanan gruba göre daha yüksek olduğu belirlendi.

**Anahtar kelimeler:** bağışıklık, balık, hematoloji, kan, oksitetrasiklin

## **Investigation of Protectiveness of Pollen Against Oxytetracycline- Induced Toxicity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Using Some Hematological and Immunological Parameters**

**Abstract:** In this study, some hematological and immunological parameters were used to investigate the protection of pollen against oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The fish were injected with a single dose of oxytetracycline at a dose of 60 mg / kg fish. 30 ppm pollen was simultaneously applied to oxytetracycline injected fish. The experiment lasted 96 hours and blood samples were taken from the fish at the end of this period. In blood samples, hematological (erythrocyte count, hemoglobin, and hematocrit levels) and immunological (leukocyte count, oxidative radical production (nitrobluetetrazolium-NBT activity), total protein and total immunoglobulin levels) parameters were analyzed. Hematological and immunological values of the oxytetracycline injected group were found to be statistically lower than the control group. Hematological and immunological values were determined to be higher in the group that was applied pollen simultaneously with oxytetracycline when compared to the group treated with oxytetracycline alone.

**Keywords:** immunity, fish, haematology, blood, oxytetracycline

<sup>1</sup> Meteoroloji 13. Bölge Müdürlüğü, 23119, Elazığ, Türkiye, [0000-0002-5500-6333](mailto:0000-0002-5500-6333)

<sup>2</sup> Corresponding author, Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, 23119, Elazığ, Türkiye, [serpilmise@gmail.com](mailto:serpilmise@gmail.com),

[0000-0003-2736-5731](mailto:0000-0003-2736-5731)

## GİRİŞ

Balıklarda görülen hastalıklar su ürünleri üretiminin artışı olumsuz yönde etkilemektedir. Hastalıkların yol açtığı ekonomik kayıplar su ürünleri yetiştiriciliğinde önemli bir sorun oluşturmaktadır ve işletmelerde meydana gelen ekonomik kayıpların neredeyse yarısı hastalıklardan kaynaklanmaktadır. Büyük ekonomik kayıplara yol açan bu salgın hastalıklara karşı çoğu zaman tedavi edici veya hastalıkların çıkmasını önleyecek koruyucu önlemler alınmamaktadır. Ayrıca balıklarda görülen hastalıklarının çoğu için halen etkin bir tedavi geliştirilememesi, diğer taraftan mevcut tedavi metotlarının balıklar için ekstra bir stres kaynağı olması bu konuda çalışan araştırmacıları balık sağlığını arttırmaya yönelik araştırmalara sevk etmiştir. Ayrıca kemoterapötik maddelerin balıkların böbrek, bağırsak, karaciğer ve diğer iç organlara zarar vermesi, kasta birikerek gıda yoluyla insanlara ulaşması, mikroorganizmaların bu kemoterapötiklere direnç geliştirmesi, sedimentte birikmesi, bağışıklık sistemini baskılaması, kısa süreli etkili olması, oksidatif strese oluşturarak antioksidan mekanizmayı baskılaması, tüm enfeksiyonlara karşı uygulanamaması bu ilaçların kullanımını kısıtlamaktadır (Arda vd., 2017; Sağlam ve Yonar, 2009).

Balıklarda hem önemli ekonomik kayıplara yol açan enfeksiyonların tedavisinde hem de koruyucu amaçla tetrasiklinler uzun zamandan beri kullanılmaktadır (Michel vd., 1990; Uno vd., 1993; Sakai, 1999). Tetrasiklinler içerisinde oksitetrasiklinler en önemli yeri tutmakta (Kayaalp, 1984) ve bakteriyel balık hastalıklarının tedavisinde en etkin şekilde başvurulan ilaç durumundadır (Rijkers vd., 1980; Wishkovsky vd., 1987). Ancak bazı organlarda oluşturduğu dejenerasyon, kaslarda birikerek insanlar ulaşabilmesi ve bakterilerin bu ilaçlara direnç kazanması gibi önemli yan etkilerinden dolayı bu ilaçların kullanımı sınırlanmaktadır. Oksitetrasiklinin diğer önemli yan etkileri arasında balıklardaki immünoşüpresif etkisi sayılmaktadır (Grondel vd., 1987; Björklund vd., 1991; Inglis vd., 1996; Sağlam ve Yonar, 2009; Yonar vd., 2011; Yonar, 2012).

Bitkinin kalıtsal özelliklerinin tamamını taşıyan, tohum oluşumundan hemen önce açan çiçeklerin orta kısmındaki erkek üreme organının başçık bölgesinde bulunan, küçük hücrelerden oluşan tozlara polen denilmektedir. Çiçek tozu olarak da adlandırılan polen, bitkilerin çiçeklenme dönemleri boyunca görülürler (Çankaya ve Korkmaz, 2008). İmmünomodulator, antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahip polen ihtiva ettiği besinler açısından zengin olması nedeniyle son zamanlarda dikkatleri üzerinde toplamaktadır (Yang vd., 2007; Eraslan vd., 2009; Xu vd., 2009; Abbass vd., 2012).

Bu çalışmada, balık hastalıklarının tedavisinde oldukça fazla başvurulan oksitetrasiklinin gökkuşağı alabalığındaki olumsuz yan etkilerine karşı polenin koruyuculuğunun immünolojik parametreler kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu' nun 04/11/2020 tarih ve 2020/13 sayılı izni ile gerçekleştirildi. Çalışmada daha önce Yöntürk (2017), tarafından identifiye edilen ve kimyasal analizi yapılan kestane poleni kullanıldı.

Çalışmada 33 x 100 x 60 cm boyutlarındaki 15 farklı cam akvaryum (3 tekrar ve her bir tekrar için 5, toplamda 15 akvaryum) kullanıldı. Çalışmaya başlamadan önce akvaryumlar dezenfekte edildi. Çalışma başladıktan sonra ise üzerleri balıkların atlamalarını engellemek için balık ağıyla kapatıldı. Balıklar akvaryumlara 15 gün süreyle adapte edildi. Çalışmada ortalama ağırlığı yaklaşık 50 ± 5 g olan 150 adet (her bir tekrar için 50 toplamda 150 balık) gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Elazığ ili

Keban ilçesindeki yerel bir işletmeden canlı olarak temin edilerek Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi' ne getirildi.

Balıklar 15 farklı cam akvaryuma, her birinde 10 adet olacak şekilde bırakıldı ve aşağıdaki gibi beş grubu ayrıldı.

K: Kontrol grubu;

PBS: Phosphat buffer saline (PBS) enjekte edilen grup;

P: 30 ppm konsantrasyonundaki polenin 96 saat banyo yoluyla uygulandığı grup;

OTC: 60 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklin enjekte edilen grup;

OTC + P: 60 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklin enjekte edilen ve 30 ppm konsantrasyonunda polenin 96 saat banyo yoluyla eş zamanlı uygulandığı grup.

Deneme 96 saat sürdü. Bu sürenin sonunda benzokain (25 mg/l) yardımıyla anestezi edilen balıkların kaval pedünkül bölgesi ensize edildi. Ensize edilen balıkların kanları etilendiamintetraasetik asit (EDTA)'li tüplere alındı. Kan örnekleri alındığı gün işlendi.

EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinde eritrosit ve lökosit sayısı (Konuk, 1981; İmren ve Turan, 1985), hemoglobin (Drabkin, 1946) ve hematokrit düzeyi (Konuk, 1981) ve oksidatif radikal üretimi (nitrobluetetrazolium-NBT aktivitesi) (Siwicki vd., 1994) belirlendikten sonra plazmaları çıkarıldı. Bunun için kan örnekleri 3500 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Plazmada total protein (Siwicki vd., 1994) ve total immunoglobulin (Siwicki vd., 1994) düzeyleri ölçüldü.

Sonuçların istatistiksel analizleri için SPSS 21.0 istatistik programı kullanıldı. Kontrol ve deneme gruplarının incelenen parametrelerinde oluşan değişimler  $p < 0,05$  düzeyinde tek yönlü varyans analizi ile (ONEWAY – ANOVA) test edildi. Gruplar arasındaki farklılıklar ise Least Significant Difference (LSD) ile test edildi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi.

## BULGULAR

Çalışmaya başlamadan önceki adaptasyon sürecinde ve yine 96 saatlik deneme süresince kontrol ve deneme grubundaki balıklarda ölüm olayı görülmedi. Kontrol ve deneme gruplarının hematolojik, immünolojik ve antioksidan parametrelerine ait değerler arasında önemli farklılıklar tespit edildi.

Kontrol grubu ile deneme gruplarının eritrosit (RBC) sayıları, hemoglobin (Hb) ve hematokrit (Ht) düzeylerindeki değişimler Tablo 1'de sunulmuştur.

**Tablo 1.** Kontrol ve deneme gruplarının hematolojik parametreleri.

Gruplar	Hematolojik Parametreler		
	RBC ( $\times 10^6$ )	Hb (g/dL)	Ht (%)
K	1,29 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	6,87 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	29,76 $\pm$ 1,44 <sup>b</sup>
PBS	1,29 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	6,85 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	30,01 $\pm$ 1,28 <sup>b</sup>
P	1,44 $\pm$ 0,12 <sup>c</sup>	8,20 $\pm$ 0,48 <sup>c</sup>	36,03 $\pm$ 1,91 <sup>c</sup>
OTC	1,18 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	5,56 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	23,17 $\pm$ 1,32 <sup>a</sup>
OTC + P	1,27 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	6,60 $\pm$ 0,41 <sup>b</sup>	28,33 $\pm$ 1,80 <sup>b</sup>

K: Kontrol grubu; PBS: Phosphat buffer saline (PBS) enjekte edilen grup; P: 30 ppm konsantrasyonundaki polenin 96 saat banyo yoluyla uygulandığı grup; OTC: 60 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklin enjekte edilen grup; OTC + P: 60 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklin enjekte edilen ve 30 ppm konsantrasyonunda polenin 96 saat banyo yoluyla eş zamanlı uygulandığı grup. RBC: Eritrosit sayısı; Hb: Hemoglobin düzeyi; Ht: Hematokrit düzeyi. <sup>a,b,c</sup> Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ( $p < 0,05$ ).

Kontrol grubu ile PBS enjekte edilen grubun eritrosit sayıları arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık tespit edilmedi ( $p > 0,05$ ). Polen uygulanan grubun eritrosit sayısının kontrol grubu ve PBS

enjekte edilen gruba kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı belirlendi ( $p < 0,05$ ). Kontrol grubuna göre oksitetrasiklin enjekte edilen grubun eritrosit sayısının istatistiksel olarak daha düşük olduğu görüldü ( $p < 0,05$ ). Oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grupta eritrosit sayısının yalnız oksitetrasiklin uygulanan gruba göre arttığı ( $p < 0,05$ ), oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grubun eritrosit sayısının kontrol grubuna yakın olduğu ve kontrol grubundan istatistiksel herhangi bir farklılık göstermediği saptandı ( $p > 0,05$ ).

PBS enjekte edilen grubun hemoglobin düzeyinin kontrol grubundan istatistiksel olarak herhangi bir farklılık göstermediği saptandı ( $p > 0,05$ ). Kontrol grubu ve PBS enjekte edilen gruba kıyasla, polen uygulanan grubun hemoglobin düzeyinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı gözlemlendi ( $p < 0,05$ ). Oksitetrasiklin enjekte edilen grubun hemoglobin düzeyinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu belirlendi ( $p < 0,05$ ). Yalnız oksitetrasiklin uygulanan gruba kıyasla oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grubun hemoglobin düzeyinin arttığı ( $p < 0,05$ ), oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grubun hemoglobin düzeyinin kontrol grubuna yakın olduğu ve kontrol grubundan istatistiksel herhangi bir farklılık göstermediği tespit edildi ( $p > 0,05$ ).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PBS enjekte edilen grubun hematokrit düzeyinde istatistiksel olarak herhangi bir farklılık tespit edilmedi ( $p > 0,05$ ). Polen uygulanan grubun hematokrit düzeyinin kontrol grubu ve PBS enjekte edilen gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görüldü ( $p < 0,05$ ). Kontrol grubuna göre oksitetrasiklin enjekte edilen grubun hematokrit düzeyinin istatistiksel olarak azaldığı tespit edildi ( $p < 0,05$ ). Oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grupta hematokrit düzeyinin yalnız oksitetrasiklin uygulanan gruba göre yükseldiği ( $p < 0,05$ ), oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grubun hematokrit düzeyinin kontrol grubuna yakın olduğu ve kontrol grubundan istatistiksel herhangi bir farklılık göstermediği belirlendi ( $p > 0,05$ ).

Kontrol grubu ile deneme gruplarının lökosit (RBC) sayıları, oksidatif radikal üretimi (NBT aktivitesi), total protein (TP) ve total immünoglobülin (TI) düzeylerindeki değişimler Tablo 2'de sunulmuştur.

**Tablo 2.** Kontrol ve deneme gruplarının immünolojik parametreleri.

Gruplar	İmmünolojik Parametreler			
	WBC ( $\times 10^3$ )	NBT (mg/ml)	TP (mg/ml)	TI (mg/ml)
K	33,14 $\pm$ 1,03 <sup>b</sup>	1,11 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	24,01 $\pm$ 2,78 <sup>b</sup>	11,97 $\pm$ 1,85 <sup>b</sup>
PBS	33,18 $\pm$ 1,12 <sup>b</sup>	1,10 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	24,58 $\pm$ 3,03 <sup>b</sup>	12,02 $\pm$ 1,76 <sup>b</sup>
P	38,93 $\pm$ 1,71 <sup>c</sup>	1,26 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>	30,96 $\pm$ 3,74 <sup>c</sup>	16,73 $\pm$ 1,33 <sup>c</sup>
OTC	27,88 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup>	0,92 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	18,29 $\pm$ 2,45 <sup>a</sup>	8,77 $\pm$ 1,90 <sup>a</sup>
OTC + P	32,79 $\pm$ 1,23 <sup>b</sup>	1,09 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	23,33 $\pm$ 3,16 <sup>b</sup>	11,56 $\pm$ 1,28 <sup>b</sup>

K: Kontrol grubu; PBS: Phosphat buffer saline (PBS) enjekte edilen grup; P: 30 ppm konsantrasyonundaki polenin 96 saat banyo yoluyla uygulandığı grup; OTC: 60 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklin enjekte edilen grup; OTC + P: 60 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklin enjekte edilen ve 30 ppm konsantrasyonunda polenin 96 saat banyo yoluyla eş zamanlı uygulandığı grup. WBC: Lökosit sayısı; NBT: Oksidatif radikal üretimi; TP: Total protein düzeyi; TI: Total immünoglobülin düzeyi. <sup>a,b,c</sup> Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ( $p < 0,05$ ).

Kontrol grubu ile PBS enjekte edilen grubun lökosit sayıları arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık tespit edilmedi ( $p > 0,05$ ). Polen uygulanan grubun lökosit sayısının kontrol grubu ve PBS enjekte edilen gruba kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı belirlendi ( $p < 0,05$ ). Kontrol grubuna göre oksitetrasiklin enjekte edilen grubun lökosit sayısının istatistiksel olarak daha düşük olduğu görüldü ( $p < 0,05$ ). Oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grupta lökosit sayısının yalnız oksitetrasiklin uygulanan gruba göre arttığı ( $p < 0,05$ ), oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grubun lökosit sayısının kontrol grubuna yakın olduğu ve kontrol grubundan istatistiksel herhangi bir farklılık göstermediği saptandı ( $p > 0,05$ ).

PBS enjekte edilen grubun NBT aktivitesinin kontrol grubundan istatistiksel olarak herhangi bir farklılık göstermediği saptandı ( $p>0,05$ ). Kontrol grubu ve PBS enjekte edilen gruba kıyasla, polen uygulanan grubun NBT aktivitesinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı gözlemlendi ( $p<0,05$ ). Oksitetrasiklin enjekte edilen grubun NBT aktivitesinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu belirlendi ( $p<0,05$ ). Yalnız oksitetrasiklin uygulanan gruba kıyasla oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grubun NBT aktivitesinin arttığı ( $p<0,05$ ), oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grubun NBT aktivitesinin kontrol grubuna yakın olduğu ve kontrol grubundan istatistiksel herhangi bir farklılık göstermediği tespit edildi ( $p>0,05$ ).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PBS enjekte edilen grubun total protein düzeyinde istatistiksel olarak herhangi bir farklılık tespit edilmedi ( $p>0,05$ ). Polen uygulanan grubun total protein düzeyinin kontrol grubu ve PBS enjekte edilen gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görüldü ( $p<0,05$ ). Kontrol grubuna göre oksitetrasiklin enjekte edilen grubun total protein düzeyinin istatistiksel olarak azaldığı tespit edildi ( $p<0,05$ ). Oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grupta total protein düzeyinin yalnız oksitetrasiklin uygulanan gruba göre yükseldiği ( $p<0,05$ ), oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grubun total protein düzeyinin kontrol grubuna yakın olduğu ve kontrol grubundan istatistiksel herhangi bir farklılık göstermediği belirlendi ( $p>0,05$ ).

PBS enjekte edilen grubun total immünoglobulin düzeyinin kontrol grubundan istatistiksel olarak herhangi bir farklılık göstermediği saptandı ( $p>0,05$ ). Kontrol grubu ve PBS enjekte edilen gruba kıyasla, polen uygulanan grubun total immünoglobulin düzeyinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı gözlemlendi ( $p<0,05$ ). Oksitetrasiklin enjekte edilen grubun total immünoglobulin düzeyinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu belirlendi ( $p<0,05$ ). Yalnız oksitetrasiklin uygulanan gruba kıyasla oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grubun total immünoglobulin düzeyinin arttığı ( $p<0,05$ ), oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grubun total immünoglobulin düzeyinin kontrol grubuna yakın olduğu ve kontrol grubundan istatistiksel herhangi bir farklılık göstermediği tespit edildi ( $p>0,05$ ).

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Hematolojik parametreler balıkların sağlık durumunu değerlendirmek için genel bir gösterge olarak kabul görmekte, stres ve hastalık durumlarını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Mişe Yonar vd., 2014; Vazirzadeh vd., 2017). Bu parametreler balıkların fonksiyonel ve beslenme durumunun ve ayrıca dış ortama adaptasyonunun değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılabilen önemli bir araçtır (Abdel-Tawwab vd., 2018). Ayrıca kan parametrelerindeki değişimler normal ve patolojik süreçlerin iyi anlaşılabilmesi konusunda ipuçları vermektedir (Li vd., 2011; Dotta vd., 2014). Bununla birlikte hematolojik parametreler immüno stimulanların kullanımı nedeniyle oluşabilecek herhangi bir anormal durumun belirlenmesinde kullanılabilen ve immüno stimulanların balıklara olumlu ya da olumsuz etkileri konusunda sağlık durumunu gösteren işaretler sunmaktadır (Talpur ve Ikhwanuddin, 2013). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, deneme sonunda kontrol grubuna göre yalnız polen uygulanan grupta eritrosit sayısı ile hemoglobin ve hematokrit düzeyinin önemli ölçüde arttığını göstermiştir. Benzer sonuçlar farklı doz ve sürelerde ve farklı yollarla polen uygulanmış farklı balık türlerinde de elde edilmiştir. Örneğin El-Asely vd. (2014), tarafından yapılan bir çalışmada tilapia (*Oreochromis niloticus*)'lara sırasıyla % 1, % 2,5 ve % 4 oranında polen içeren yemler oral yolla verilmiş, sonuç olarak denemenin 10., 20. ve 30. günlerinde hematokrit düzeyinin istatistiksel olarak önemli oranda arttığı gözlemlenmiştir. Hematokrit düzeyindeki bu artış 21 gün boyunca % 1, 2 ve 4 oranında polen içeren yemlerin oral yolla verildiği alabalıklarda da belirlenmiştir (Yöntürk, 2017). Yine

alabalıklarda yapılan bir çalışmada 0,5, 2,5, 5, 10, 20 ve 30 ppm konsantrasyonlarında ve 96 saat uygulanan polenin eritrosit sayısı ile hematokrit ve hemoglobin düzeyini kontrol grubuna göre arttırdığı ifade edilmiştir (Talas ve Gulhan, 2013).

Diğer taraftan oksitetrasiklinin balıkların hematolojik parametrelerine etkisini araştıran bazı çalışmalar yapılmıştır. Rijkers vd. (1980), sazanlara enjeksiyon ve oral yolla uygulanan 180 mg/kg balık dozundaki oksitetrasiklinin hematokrit değeri ile eritrosit ve lökosit sayısını düşürdüğünü tespit etmiştir. Diğer bir çalışmada, alabalıklara 14 gün süreyle oral yolla verilen oksitetrasiklinin immünoşüpresif etki gösterdiği ve hematokrit düzeyini azalttığı ifade edilmiştir (Yonar, 2012). Sağlam ve Yonar (2009), tarafından alabalıklarda yapılan ve balık hastalıklarının tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılan sulfamerazinin de eritrosit sayısı ile hemoglobin ve hematokrit düzeyini düşürdüğü tespit edilmiştir. Benzer şekilde bu çalışmada da balıklara oksitetrasiklin enjeksiyonundan sonra incelenen hematolojik değerlerin tamamının azaldığı belirlenmiştir. Ancak bu azalma oksitetrasiklin ile eş zamanlı polen uygulanan grupta gözlemlenmemiş, bu gruptaki hematolojik değerler kontrol grubuna yakın bulunmuştur.

Lökositler spesifik ve nonspesifik bağışıklıkta çok önemli bir rol oynamakta, lökosit sayısı veya aktivitesi balıkların genel sağlık durumu hakkında ipuçları verebilmektedir (Secombes, 1996; Yonar vd., 2019). Kemotaksis, opsonizasyon, absorpsiyon, intraselüler yıkım ve sindirim gibi birçok safhada gerçekleşen fagositozda görev alan lökositler solunum patlaması (respiratory burst) sırasında reaktif oksijen türlerini üretirler. NBT testi fagositik aktivitenin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Siwicki ve Studnicka, 1987). Diğer taraftan toplam plazma proteini nonspesifik immün sistemin humoral unsuru olarak kabul edilmekte (Jeney vd., 1997), antijenik uyarımları sonucu plazma hücreleri tarafından sentezlenen ve antijenlerle birleşerek reaksiyon verebilen immünooglobülinler ise balıklarda spesifik savunma mekanizmalarının en önemli elemanlarını oluşturmaktadır (Tizard, 1992; Dalmo vd., 1997). El-Asely vd. (2014), tarafından tilapia (*Oreochromis niloticus*)larda yapılmış bir çalışmada, polen uygulanan balıkların fagositik hücre (nötrofil ve monositler) sayısının denemenin 10 gününde istatistiksel olarak önemli oranda arttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada, total plazma protein düzeyinin denemenin 10. gününde % 2,5 oranında polen uygulanan grupta, denemenin 20. gününde ise % 2,5 ve % 4 oranında polen uygulanan gruplarda istatistiksel olarak önemli oranda arttığı görülmüştür. Alabalıklarda yapılan başka bir çalışmada % 1, 2 ve 4 düzeyinde ve 21 gün süreyle immünoşüpresif olarak oral yolla verilen polenin lökosit sayısı, oksidatif radikal üretimi, total protein ve total immünooglobulin düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir artışa sebep olduğu belirlenmiştir (Yöntürk, 2017). Diğer taraftan yine polenin kullanıldığı fakat 1 ve 10 mg/kg balık dozunda pullu sazana enjeksiyonla verildiği bir çalışmada lökosit sayısı, oksidatif radikal üretimi, total protein ve total immünooglobulin düzeylerinin kontrol grubuna göre denemenin 3., 7. ve 10. günlerinde arttığı tespit edilmiştir (Kolgar, 2019). Yukarıda belirtilen araştırmacıların çalışmalarından elde edilen bulgularla uyumlu bir şekilde bu çalışmada da banyo yoluyla yalnız polen uygulanan grubun lökosit sayısı, oksidatif radikal üretimi, total protein ve total immünooglobulin düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuç polenin immünoşüpresif etkisini bir kez daha teyit etmiştir. Polenin bu etkisi yapısında bulunan yağ asitleri, flavonoidler ve fenolik maddeler ile açıklanabilir.

Öte yandan oksitetrasiklinin balıklardaki immünomodülatör etkisini araştıran bazı çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, Rijkers vd. (1980) ve Dobšiková vd. (2013), tarafından yapılan çalışmalarda oksitetrasiklinin sazanlarda lökosit sayısını düşürdüğü görülmüştür. Alabalıklarda (Lunden vd., 1998) ve kalkan balıklarında (Tafalla vd, 1999) oksitetrasiklinin fagositik aktiviteyi azalttığı belirlenmiştir. Başka bir araştırmada (Siwicki vd., 1989) oksitetrasiklin uygulanan alabalıklarda, nötrofillerinin

adherent düzeyi (NBT pozitif hücre aktivasyonu) kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Oksitetrasiklin uygulamasından sonra total protein ve immüoglobulin düzeylerinde meydana gelen değişimleri araştıran farklı balık türlerinde yapılmış bazı çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, oksitetrasiklin uygulaması ile kalkan balıkları (*Scophthalmus maximus*)'nda toplam plazma protein seviyesinin düştüğü tespit edilmiştir (Tafalla vd., 1999). Bu düşüş, sazanlara oksitetrasiklin verildikten sonra toplam immüoglobulin düzeyinde de saptanmıştır (Rijkers vd., 1980). Dobšiková vd. (2013), oksitetrasiklinin sazanlarda total protein ve immüoglobulin düzeylerini denemenin bazı günlerinde arttırdığını, bazı günlerinde ise düşürdüğünü ifade etmiştir. Reda vd. (2013), Nil tilapiasında OTC uygulamasının serum IgM miktarını düşürdüğünü bulmuşlardır. Öntaş (2017), 75 mg/kg balık dozunda oral yolla verilen oksitetrasiklinin levreklerde serum immüoglobulin M düzeyini düşürdüğünü fakat toplam serum protein miktarına ise istatistiki açıdan herhangi bir etkisinin olmadığını ifade etmişlerdir. Yukarıda açıklanan çalışmalardan elde edilen bulgularla paralel olarak bu araştırmada da enjeksiyonla oksitetrasiklin uygulanan grupta incelenen tüm immünolojik değerlerin düştüğü saptanmıştır. Fakat oksitetrasiklinle birlikte polen uygulanan grupta immünolojik değerlerin kontrol grubuna yakın olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, yalnız polen uygulanan gruptaki balıkların hematolojik ve immünolojik parametrelerine ait değerlerin arttığı dolayısıyla polenin immüno stimulan etki gösterdiği belirlenmiştir. Yalnızca oksitetrasiklin enjekte edilen gruptaki balıkların hematolojik ve immünolojik parametrelerine ait değerlerin azaldığı, oksitetrasiklinin immüno süpresif etki gösterdiği ancak oksitetrasiklinle eş zamanlı olarak polen uygulamasının oksitetrasiklinin yol açtığı immüno süpresif etkiyi önlediği görülmüştür. Yalnız polen uygulaması bazı hematolojik ve immünolojik parametreleri olumlu etkilediği için bu madde balıklarda immüno stimulan olarak kullanılabilir. Oksitetrasiklin uygulamasının yol açtığı immüno süpresif etki polen kullanılarak önenebilir.

#### **Çıkar Çatışması Beyanı**

Yazar bu makale ile ilgili başka kişi veya kurumlar ile çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

**Not:** Bu çalışma; birinci yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

#### **KAYNAKÇA**

- 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. doi: 10.4194/1303-2712-v12\_4\_13.
- Abdel-Tawwab, M., Adeshina, I., Jenyo-Oni, A., Ajani, E. K., & Emikpe, B. O. (2018). Growth, physiological, antioxidants, and immune response of African catfish, *Clarias gariepinus* (B.), to dietary clove basil, *Ocimum gratissimum*, leaf extract and its susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 78, 346-354. doi: 10.1016/j.fsi.2018.04.057.
- Arda, M., Seçer, S., & Sarıyüpeoğlu, M. (2017). *Balık Hastalıkları*. 3. Bas., Medisan Yayınevi.
- Björklund, H., Rabergh, C. M. L., & Bylund, G. (1991). Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediment from fish farms. *Aquaculture*, 84, 85-96. doi: 10.1016/0044-8486(91)90281-B.
- Çankaya, N., & Korkmaz, A. (2008). *Polen*. Samsun İl Tarım Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi Yayını.

- Dalmo, R. A., Ingebrigtsen, K., & Bogwald, J. (1997). Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases*, 20, 241- 273. doi: 10.1046/j.1365-2761.1997.00302.x.
- Dobšíková, R., Blahová, J., Mikulíková, I., Modrá, H., Prášková, E., Svobodová. ... Andrzej-Krzysztof Siwicki, A. K. (2013). The effect of oyster mushroom  $\beta$ -1,3/1,6-D-glucan and oxytetracycline antibiotic on biometrical, haematological, biochemical, and immunological indices, and histopathological changes in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 35(6), 1813-1823. doi: 10.1016/j.fsi.2013.09.006.
- Dotta, G., Andrade, J. I. A., Gonçalves, E. L. T., Brum, A., Mattos, J. J., Maraschin, M., & Martins M. L. (2014). Leukocyte phagocytosis and lysozyme activity in Nile tilapia fed supplemented diet with natural extracts of propolis and *Aloe barbadensis*. *Fish & Shellfish Immunology*. 39, 280-284. doi: 10.1016/j.fsi.2014.05.020.
- Drabkin, D. L. (1946). The crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species. *Journal of Biological Chemistry*, 64, 703-723.
- 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. doi: 10.1016/j.fsi.2014.07.017.
- 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. doi: 10.1016/j.fct.2008.10.013.
- Grondel J. L., Gloudemans A. G. M., & Van Muiswinkel, W. B. (1987). The influence of antibiotics on the immune system.II. modulation of fish leukocyte responses in culture. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 9, 251-260. doi: 10.1016/0165-2427(85)90075-3.
- Inglis, V., Robertson, D., Miller, K., Thompson, K. D., & Richards, R. H. (1996). Antibiotic protection against recrudescence of latent *Aeromonas salmonicida* during furunculosis vaccination. *Journal Fish Diseases*. 19, 341-348. doi: 10.1046/j.1365-2761.1996.d01-86.x.
- İmren, H., & Turan, O. (1985). *Klinik Tanıda Laboratuvar*. Beta Yayın Dağıtım Anonim Şirketi.
- 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. doi: 10.1016/S0044-8486(97)00042-2.
- Kayaalp, O. (1984). *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Ulucan Matbaası.
- Konuk, T. (1981). *Pratik Fizyoloji*, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları.
- Li, Z. H., Velisek, J., Grabic, R., Li, P., Kolarova, J., & Randak, T. (2011). Use of hematological and plasma biochemical parameters to assess the chronic effects of a fungicide propiconazole on a freshwater teleost. *Chemosphere*, 83, 572-578. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.12.024.
- Michel, C. M. F., Squibb, K. S., & O'connors, J. M. (1990). Pharmacokinetics of sulphadimethoxine in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Xenobiotica*, 20(12), 1299-1309. doi: 10.3109/00498259009046628.



- Miße Yonar, S., Yonar, M. E., Yöntürk, Y., & Pala, A. (2014). Effect of ellagic acid on some haematological, immunological and antioxidant parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98, 936-941. doi: 10.1111/jpn.12162.
- Öntaş, C. (2017). Oksitetrasiklin kullanımının levrek (*Dicentrarchus labrax*, l. 1758) balığı immün sistemi üzerindeki etkisinin belirlenmesi [Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi].
- Reda, R. M., Ibrahim, R. E., & Ahmed, E. G. (2013). Effect of oxytetracycline and florfenicol as growth promoters on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. *Egypt Journal of Aquatic Research*, 39(4), 241-248.
- Rijkers G. T., Teunissen A. G., Van Oosterom R., & van Muiswinkel W. B. (1980). The immune system of cyprinid fish. The immunosuppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in carp. *Aquaculture*, 19(2), 177-189. doi: 10.1016/0044-8486(80)90018-6.
- Sağlam, N., & Yonar, M. E. (2009). Effects of sulfamerazine on selected haematological and immunological parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792), *Aquaculture Research*, 40(4), 395-404. doi: 10.1111/j.1365-2109.2008.02105.x.
- Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172(1-2), 63-92. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00436-0.
- Secombes, C. J. (1996). The nonspecific immune system: cellular defences. (Eds. Iwama, G., Nakanishi, T.), *The fish immune system, organism, pathogen and environment*. Academic Press.
- 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. doi: 10.1111/j.1095-8649.1987.tb05293.x.
- Siwicki, A. K., Anderson, D. P., & Dixon O. W. (1989). Comparisons of nonspecific and specific immunomodulation by oxolinic acid, oxytetracycline and levamisole in salmonids. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 14, 231-237. doi: 10.1016/0165-2427(89)90122-0.
- 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. doi: 10.1016/0165-2427(94)90062-0.
- Tafalla, C., Novoa, B., Alvarez, J. M., & Figueras, A. (1999). *In vivo* and *in vitro* effect of oxytetracycline treatment on the immune response of turbot, *Scophthalmus maximus*. *Journal of Fish Diseases*, 22, 271-276. doi: 10.1046/j.1365-2761.1999.00179.x
- Talas, Z. S. & Gulhan, M. F. (2013). Effects of various pollen concentrations on some biochemical and hematological parameters and paraoxanase activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12(4), 928-938.
- Talpur, A. D., & Ikhwanuddin, M. (2013). *Azadirachta indica* (neem) leaf dietary effects on the immunity response and disease resistance of Asian seabass, *Lates calcarifer* challenged with *Vibrio harveyi*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34, 254-264. doi: 10.1016/j.fsi.2012.11.003.
- Tizard, I. (1992). *Veterinary Immunology, an Introduction*. W. B. Saunders Company.

- Uno, K., Aoki, T., & Ueno, R. (1993). Pharmacokinetics of sulphamonomethoxine and sulphadimethoxine following oral administration to cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 115, 209-219. doi: 10.1016/0044-8486(93)90137-N.
- Vazirzadeh, A., Dehghan, F., & Kazemeini, R. (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. doi: 10.1016/j.fsi.2017.08.022.
- Wishkovsky A., Roberson B. S., & Hetrick F. M. (1987). In vitro suppression of the phagocytic response of fish macrophages by tetracyclines. *Journal of Fish Biology*, 31(A), 61-65. doi: 10.1111/j.1095-8649.1987.tb05294.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 dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 42-46. doi: 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. doi: 10.1016/j.intimp.2006.11.001.
- Yonar, M. E. (2012). The Effect of lycopene on oxytetracycline-induced oxidative stress and immunosuppression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.). *Fish and Shellfish Immunology*, 32(6), 994-1001. doi: 10.1016/j.fsi.2012.02.012.
- Yonar, M. E., Mişer Yonar, S., Ispir, U., & Ural, M. Ş., (2019). Effects of curcumin on haematological values, immunity, antioxidant status and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Aeromonas salmonicida* subsp. *Achromogenes*. *Fish & Shellfish Immunology*, 89, 83-90. doi: 10.1016/j.fsi.2019.03.038.
- Yonar, M. E., Mişer Yonar, S., & Silici, S. (2011). Protective effect of propolis against oxidative stress and immunosuppression induced by oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.). *Fish and Shellfish Immunology*, 31, 318-325. doi: 10.1016/j.fsi.2011.05.019.
- Yöntürk, Y. (2017). *Gökkuşığı alabalığı (Oncorhynchus mykiss, W.)'nda arı poleninini antioksidan ve immunostimulan etkisinin araştırılması* [Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi].