

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



ZEYTİNYAĞI İLE ÖZÜTLENEN PROPOLİSİN
ALABALIKLARDA (*Oncorhynchus mykiss*)
İMMUNOSTİMULANT ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

GERLY-AYN TUPAS

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DR. ÖĞR. ÜYESİ SONER BİLEN

KASIM - 2022

KASTAMONU

TEZ ONAYI

GERLY-AYN TUPAS tarafından hazırlanan “**Zeytinyağı ile Özütilenen Propolisin Alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) İmmunostimulant Etkisinin Belirlenmesi**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı **25.11.2022** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Su Ürünleri Yetiştiriciliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Dr. Öğr. Ü. Soner BİLEN Kastamonu Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Derya Güroy Yalova Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Adem Yavuz SÖNMEZ Kastamonu Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Enstitü Müdürü V.

Doç. Dr. Osman ÇİÇEK

.....

TAAHHÜTNAME

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

Gerly-ayn TUPAS

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEYTİNYAĞI İLE ÖZÜTLENEN PROPOLİSİN ALABALIKLARDA (*Oncorhynchus mykiss*) İMMUNOSTİMULANT ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

GERLY-AYN TUPAS

**KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANA BİLİM DALI
DANIŞMAN:DR. ÖĞR. ÜYESİ SONER BİLEN**

Bu çalışmada, gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) zeytinyağı ile ekstrakte edilen propolisin immün sistemi uyarıcı etkisini belirlemek için 21 günlük bir besleme denemesi yapılmıştır. Başlangıç vücut ağırlığı $5,21 \pm 0,13$ g olan yavru gökkuşağı alabalıklarında, zeytinyağı ile ekstrakte edilmiş farklı miktarlarda propolis içeren diyet denenmiştir. Çalışmada kullanılan dozlar %0 (kontrol); %0,1 (P01); %0,3 (P03) ve %0,5 (P05) olarak belirlenmiştir. Deneme balıkları, çalışmanın 7., 14. ve 21. günlerde rastgele örneklenmiştir. Besleme denemesinin sonunda, enjeksiyon yoluyla *Yersinia ruckeri* ile enfekte edilen balıkların deney gruplarına göre yaşama oranları belirlenmiştir. Çalışma sonucunda hematolojik değerler karşılaştırıldığında kırmızı kan hücreleri (RBC), hemoglobin (HGB), hematokrit (HCT), ortalama korpüsküler hemoglobin (MCH) ve ortalama korpüsküler hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) değerlerinin gruplar arasında sadece 21. gün anlamlı bir farklılık gösterdiği tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Örneklemelerde alınan, bağırsak, böbrek, dalak ve karaciğer dokuları histopatolojik olarak gruplar arasında farklılık göstermemiştir. Ayrıca tüm deney gruplarında oksidatif radikal üretiminde de herhangi bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$). Balıkların bağırsak, böbrek ve dalak dokularından yapılan gen ekspresyon analizleri neticesinde; IFN, IL-1 β , TNF- α ve TGF- β sitokinlerinin dokulara göre değişen ekspresyon seviyelerinde, kontrol grubuna göre farklı dozlarda artışların olduğu tespit edilmiştir. *Yersinia ruckeri* bakterisi ile yapılan kontrol testi sonucunda yaşama oranlarının kontrol grubuna kıyasla P01 grubunda en çok arttığı tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Tüm bu veriler ışığında, zeytinyağı ile ekstrakte edilen propolisin bağışıklık sistemini iyileştirdiği ve *Y. ruckeri*'ye karşı bağışıklık direncini arttırdığı sonucuna varılmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Propolis, zeytinyağı, gökkuşağı alabalığı, bağışıklık tepkisi, gen ifadesi

Kasım 2022, 64 Sayfa

ABSTRACT

MSC THESIS

DETERMINATION OF THE IMMUNOSTIMULANT EFFECT OF PROPOLIS EXTRACTED WITH OLIVE OIL IN TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)

GERLY-AYN TUPAS

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
DEPARTMENT OF AQUACULTURE
SUPERVISOR: ASST. PROF. SONER BİLEN

In this current study, a 21-day feeding trial was carried out to determine the immunostimulant effect of propolis extracted with olive oil in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Juvenile rainbow trout with an initial body weight of 5.21 ± 0.13 g were supplemented with a diet containing different amounts of propolis extracted with olive oil. The doses utilized in the study were 0.1%, 0.3%, 0.5%, and propolis-free as the control. Treatment fish were randomly sampled every 7th, 14th and 21st day of the study. Hematological parameters were examined, and the results showed that only the 21st day ($p < 0.05$) demonstrated a significant difference between the groups in terms of red blood cells (RBC), hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular hemoglobin (MCH), and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC). The results of histopathological analysis of the intestine, kidney, spleen and liver were similar among all treatment groups ($p > 0.05$). Oxidative radical production showed no significant difference in all treatment groups. The results of gene expression analyses performed on fish intestine, kidney, and spleen tissues showed that the expression levels of IFN, IL-1, TNF, and TGF- cytokines varied according to tissues and at different doses in comparison to the control group. The result of the control test using *Yersinia ruckeri* bacteria revealed that the survival rate of P01 group increased most dramatically compared with the control group ($p < 0.05$). The outcome of this study indicates that propolis extracted with olive oil improved the immune system and control of fish infection against *Y. ruckeri*.

KEYWORDS: Propolis, olive oil, rainbow trout, immune response, gene expression

November 2022, 64 Page

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında emeklerini eksik etmeyen herkese teşekkürlerimi borç bilirim. Alçakgönüllü, cana yakın ve zeki danışmanım Doç. Dr. Soner Bilen, yüksek lisans yolculuğum boyunca yorulmak bilmeyen desteği ve rehberliğinin yanı sıra, benimle paylaştığı tüm bilgi ve değerler için, özellikle de bana hayatta iyi şeyler yapma konusunda ilham verdiği için sonsuza dek minnettarım. Ayrıca Osman Nezih Kenanoğlu ve Yiğit Taştan başta olmak üzere yolculuğumun başından sonuna kadar tüm laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan Su Ürünleri Bölümü öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerine; yolculuğum boyunca ortaya çıkan tüm mücadelelerin üstesinden gelmemi sağlayan sınırsız sevgileri ve destekleri için Filipinler'de beni çok özleyen amah, inah ve kardeşlerime; Yüksek lisans eğitimime Türkiye'de Kastamonu Üniversitesi'nde başlamamı sağlayan ve MSU-TCTO'daki görevimin ilk gününden bu yana ölçülemez desteği için, MSU-TCTO Rektörü Prof. Dr. Mary Joyce Z. Guinto-Sali 'ye;

Sonsuz şükranlarımı borç bilirim.

Gerly-Ayn TUPAS

Kastamonu, 2022

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ ONAYI	ii
TAAHHÜTNAME	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
2.1 Gökkuşuğı Alabalığında Bazı Yem Katkı Maddelerinin Kullanımı ve Etkisi	5
2.2 Balık Yemlerinde Propolis Kullanımı	13
2.3 Alabalıklarda Kırmızı Ağız Hastalığının Tedavisi.....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1 Materyal.....	17
3.1.1 Çalışma Alanı	17
3.1.2 Balık ve Propolisin Temini	17
3.1.3 Deneyin Tasarlanması ve Dizaynı	19
3.2 Yöntem	20
3.2.1 Yemlerin Hazırlanması ve Balıkların Beslenmesi.....	20
3.2.2 Örnekleme Tekniğı ve Veri Toplama	21
3.2.3 Hematolojik Analizler.....	22
3.2.4 Histolojik Değerlendirme	23
3.2.5 Spesifik Olmayan Bağışıklık Tepkileri için Parametreler	24
3.2.6 Sitokin Gen Ekspresyon Analizleri.....	24
3.2.7 Kontrol Testi	28
3.2.8 İstatistiksel Analizler	29
4. BULGULAR	30
4.1 Hematolojik Bulgular	30
4.2 Histopatolojik Analiz	31
4.3 İmmunolojik Değişimler	32
4.4 Gen Sunumları.....	33
4.4.1 İnterferon-1 (IFN-I)	33
4.4.2 İnterlökin 1 Beta (IL-1β).....	35
4.4.3 Tümör Nekroz Faktörü (TNF- α).....	37
4.4.4 Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF-β)	39
4.4.5 Kontrol Testi	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	43
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ.....	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1 Akuatik toksikoloji laboratuvarı	17
Şekil 3.2 Gökkuşuğu alabalığının toksikoloji laboratuvarına taşınması	18
Şekil 3.3 Adaptasyon boyunca balıkların ticari yem ile beslenmesi.....	18
Şekil 3.4 Zeytinyağı ile özütlenmiş propolis	19
Şekil 3.5 Deney akvaryumu ve balıklar	19
Şekil 3.6 Fizikokimyasal su kalite parametrelerinin ölçümü	20
Şekil 3.7 Gökkuşuğu alabalığı yemlerine zeytinyağı ile özütlen edilen propolisin dahil edilmesi.....	21
Şekil 3.8 İmmünolojik analiz için kullanılan gökkuşuğu alabalığı doku örnekleri	22
Şekil 3.9 Kan örneklerinin toplanması ve analizinde kullanılan hematoloji cihazı ...	23
Şekil 3.10 Histopatoloji analizi için kullanılan doku örnekleri.....	24
Şekil 3.11 RNA izolasyon aşamaları	25
Şekil 3.12 cDNA sentezi	26
Şekil 3.13 qRT-PCR sisteminde genetik ifade.....	28
Şekil 3.14 Gökkuşuğu alabalığına <i>Yersinia ruckeri</i> enjeksiyonu	28
Şekil 4.1 Bağırsak, böbrek, dalak ve karaciğer üzerinde histopatolojik analiz.....	32
Şekil 4.2 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşuğu alabalıklarının bağırsak dokularında IFN-1 gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler	33
Şekil 4.3 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşuğu alabalıklarının böbrek dokularında IFN-1 gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler	34
Şekil 4.4 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşuğu alabalıklarının dalak dokularında IFN-1 gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler	35
Şekil 4.5 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşuğu alabalıklarının bağırsak dokularında IL-1 β gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler	35
Şekil 4.6 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşuğu alabalıklarının böbrek dokularında IL-1 β gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler	36
Şekil 4.7. Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşuğu alabalıklarının dalak dokularında IL-1 β gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler	37
Şekil 4.8 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşuğu alabalıklarının bağırsak dokularında TNF- α gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler	38
Şekil 4.9 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşuğu alabalıklarının böbrek dokularında TNF- α gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler	38
Şekil 4.10 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşuğu alabalıklarının dalak dokularında TNF- α gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler	39

Şekil 4.11 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşığı alabalıklarının bağırsak dokularında TGF- β gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler	40
Şekil 4.12 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşığı alabalıklarının böbrek dokularında TGF- β gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler	40
Şekil 4.13 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşığı alabalıklarının dalak dokularında TGF- β gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler	41
Şekil 4.14 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin <i>Yersinia ruckeri</i> bakterisi ile enfekte edilen gökkuşığı alabalıklarının yaşama oranlarına etkileri....	42



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan ticari diyetin bileşimi	21
Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan primerler.....	27
Tablo 4.1 Çalışmanın 7., 14. ve 21. günlerinde gökkuşuğu alabalıklarında gruplara göre RBC,HGB ve HCT değerleri.....	30
Tablo 4.2 Çalışmanın 7., 14. ve 21. günlerinde gökkuşuğu alabalığında gruplara göre MCV, MCH ve MCHC değerleri	31
Tablo 4.3 Çalışmanın 7., 14. ve 21. günlerinde gökkuşuğu alabalığında gruplara göre oksidatif radikal üretimleri	33



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
C	Santigrat
gr	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
kg	Kilogram
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
°	Derece
O ₂	Oksijen
OH ⁻	Hidroksit
OH	Hidroksil
KOH	Potasyum hidroksit
DMSO	Dimetil sülfoksit

Kısaltmalar

cDNA	Komplementer DNA
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
HCT	Hematokrit
HGB	Hemoglobin
IL	İnterlökin
MCH	Ortalama Korpüsküler Hemoglobin
MCHC	Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu
MHC	Büyük Doku Uyuşum Kompleksi
NBT	Nitroblue Tetrazolium
ORÜ	Oksidatif Radikal Üretimi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RBC	Kırmızı Kan Hücresi
RNA	Ribonükleik asit
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktör
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurum

1. GİRİŞ

Dünya genelinde artan insan nüfusu ve beslenmenin önemi göz önünde bulundurulduğunda, gelecek nesillerin ihtiyaç duyduğu gıdaların karşılanabilmesi adına su ürünleri yetiştiriciliğinin önemi her geçen gün daha da artmaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliği, gıda ihtiyacına yönelik küresel talebe katkıda bulunan en hızlı büyüyen zirai faaliyet olarak bilinmektedir. 2020 yılında dünya çapında yaklaşık 87,5 milyon ton ile rekor miktara ulaşan su ürünleri üretiminin tahmini değeri 281,5 milyar ABD doları olarak belirlenmiştir (FAO, 2022). Bu miktar, 2019 su ürünleri üretimine göre 2,3 tonluk bir artışı temsil etmektedir. Gökkuşaağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), iç su ürünleri üretiminin % 54,4'ünü oluşturarak en çok üretilen ilk onbeş balık sıralamasında yerini almıştır.

Son yıllarda su ürünleri yetiştiriciliğinin artan gelişimi ile sucul ortamda hem bakteriyel hem de viral hastalıklar endişe verici bir hale gelmiştir (Lieke vd., 2020; Varalakshmi vd., 2022). Yetiştiricilik alanlarındaki suyun fizikokimyasal yapısı ve mikrobiyal içeriği, yetersiz beslenme durumu ve yüksek stok yoğunluğu gibi çok sayıda stres faktörü, enfeksiyon hastalıklara bağlı kitlesel ölümleri indükleyebilmektedir (Kumari, 2020). Bu nedendir ki, gökkuşaağı alabalığı yetiştiriciliğinde çok sayıda bakteriyel ve viral hastalığın ortaya çıkması ve buna bağlı salgınlar ile mücadele söz konusudur (Adams, 2019; Radosavljević vd., 2022). *Yersinia ruckeri* bakterisi, gökkuşaağı alabalığında görülen yaygın patojenlerden birisidir (Pajdak-Czaus vd., 2021). Söz konusu bakterinin, gökkuşaağı alabalıklarında enterik kızıl ağız hastalığına neden olduğu bilinmektedir (Aflakian vd., 2022; Ummey vd., 2021; Wrobel vd., 2019).

Son yıllarda, balıklarda viral, bakteriyel, parazitik ve fungal hastalıkların salgınlarını kontrol etmek veya önlemek için çeşitli antibiyotikler, kemoterapötikler ve aşılar kullanılmaktadır (Mehana vd., 2015). Antibiyotiklerin ve kimyasal ürünlerin balık, balık eti, çevre ve insan sağlığı üzerinde istenmeyen etkilerinin olduğu bilinmektedir. Artan nüfus için balığa olan talep arttıkça, araştırmacılar balıklardaki hastalıkları tedavi etmek adına yeni kaynaklar ve daha etkili alternatifler aramaya devam

etmektedirler. Bununla birlikte çeşitli doğal ürünlerin, özütleri ve diğer türevlerinin, sucul canlıların bağışıklık tepkilerine ve hastalık direncine olumlu etkileri önceden çalışılmıştır (Awad ve Awaad, 2017; Elumalai vd., 2020; Hernández-Contreras ve Hernández, 2020; Reverter vd., 2017; Stratev vd., 2018). Geçmişten günümüze, ilaç yapım endüstrisinde, doğal ürünlerin öncülüğü ve yeri bilinmektedir (Boy vd., 2018; Dhar vd., 2000; Tandon ve Yadav, 2017).

Doğal ürünler; antimikrobiyal, kokuşma önleyici, ısı yalıtımı sağlayıcı ve su geçirmez etkiye sahip reçineli bileşik ürettiği önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Dell ve McComb, 1979; Dimkić vd., 2016; Langenheim, 1990; Monti vd., 1983). Arılar tarafından toplanan bu reçineli madde, arıların tükürük salgılarıyla karıştırılarak propolis adı verilen yan ürünü meydana getirmektedir (Drescher vd., 2019; König, 1985; Leonhardt vd., 2011; Monti vd., 1983; Simone-Finstrom ve Spivak, 2010; Wagh, 2013).

Propolisin esas olarak reçine, bitkisel balzam, balmumu, aromatik yağlar, polen ve diğer çeşitli maddelerden oluştuğu rapor edilmiştir (Cirasino vd., 1987). Propolis, aromatik asitler, esterler, yağ asitleri, karbonhidratlar, aldehitler, amino asitler, ketonlar, kalkonlar, dihidrokalkonlar, terpenoidler, vitaminler ve inorganik maddeler gibi tanımlanmış 300'den fazla farklı bileşiğe sahiptir (Bankova vd., 2000; Huang vd., 2014). Flavonoidler anti-inflamatuar, anti-viral, anti-alerjik, anti-kanser, anti-bakteriyel ve antioksidan etkilere sahip olup, propolisin en önemli ajanlarından biridir (Ahangari vd., 2018; Martinotti ve Ranzato, 2015; Sawicka vd., 2012). Aslında propolis halk hekimliğinde çok uzun süredir kullanılmaktadır (Burdock, 1998; Castaldo ve Capasso, 2002; De Almeida ve Menezes, 2002; Ghisalberti, 1979; Sardana vd., 2013). Günümüzde modern bilim, propolisin faydalı farmakolojik özelliklerini kullanarak saf biçimde erişilebilen dünya çapında popüler bir tedavi geliştirmiş olup, aynı zamanda diğer ürünlerle birlikte makyaj malzemeleri ve gıda katkı maddeleri olarakta kullanılmıştır (Castaldo ve Capasso, 2002; Vassya vd., 2021; Zampini vd., 2021).

Propolis için birçok klasik ve modern ekstraksiyon yöntemleri çalışılmıştır (Bankova vd., 2021; Šuran vd., 2021). Birçok sulu solüsyon kullanımı mevcut olan propolis

ekstraksiyonunda (Taddeo vd., 2016), etanol ile kullanımı basit ve etkili bir yöntem olup, ekstraksiyon sonrası antioksidan, antimikrobiyal, antikanserojenik gibi biyolojik aktiviteler gösterdiği öne sürülmektedir (Funari vd., 2016; Hernandez vd., 2018; Mello vd., 2010; Pujirahayu vd., 2014). Ancak alkol toleransı olan kişiler, kanser hastaları, diyabet ve oftalmolojik operasyonlar gibi bazı kısıtlamalar nedeniyle propolisin alkolle birlikte kullanımı insan sağlığına zarar verebildiği için önerilmemektedir (Konishi vd., 2004). Bu nedenle bitkisel yağlarda çözünen propolisin sağlık açısından kullanımının güvenli olduğu ileri sürülmektedir (Silici ve Baysa, 2020). Tıbbi açıdan önemli bir ürün olan propolis bağışıklık sistemini güçlendirmesi ve büyüme performansının iyileştirilmesi amacıyla kümes hayvanlarında sentetik antibiyotiklere alternatif olarak kullanılmaktadır (Saeed, 2017). Çeşitli balık türlerinde de büyüme performansını artırmak amacıyla kullanılan propolis bileşenlerinin, antibakteriyel ve antioksidan özellikleri sayesinde sindirime, emilime ve bağırsak sağlığına yardımcı olduğu belirtilmiştir (Abbass vd., 2012; Bae vd., 2012; Nur vd., 2017). Ayrıca propolisin balık diyetine dahil edilmesi sonucunda balıklarda immünolojik parametreleri iyileştirdiği de belirtilmiştir (Deng vd., 2011; Dotta vd., 2014; Dotta vd., 2015; Tukmechi vd., 2014; Zheng vd., 2012).

Akdeniz bölgesinde zeytin (*Olea europaea*) çok popüler bir temel gıda maddesidir (Bankova vd., 1992; Boskou, 2006). Zeytinyağı temel olarak triaçilgliseroller ve ikincil olarak serbest yağ asitleri, mono-açilgliseroller ve diasilgliseroller ile hidrokarbonlar, steroller, alifatik alkol, tokoferoller ve pigmentler gibi bir dizi lipidden meydana gelmektedir (Boskou vd., 2006). Silici ve Baysa (2020) tarafından propolisin zeytinyağı ekstraktının antioksidan, antiradikal ve antipiretik etkileri üzerine yapılan çalışmaları sonucunda, propolis zeytinyağı ekstraktının alkol sulu ekstrakt solüsyonuna göre daha sağlıklı bir alternatif olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Bu çalışmanın amacı, zeytinyağı ile ekstrakte edilen propolisin yem katkı maddesi olarak kullanılarak gökkuşağı alabalığındaki bağışıklık uyarıcı etkisinin belirlenmesi üzerinedir. Bu amaçla oksidatif radikal üretiminin, bağışıklıktan sorumlu genlerin (IFN-1, IL-1 β , TNF- α ve TGF- β) ekspresyon seviyelerinin ve *Yersinia ruckeri* bakterisine karşı yaşama oranına etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca

histopatolojik analiz ile propolisin dokularda tahribata sebep olup olmadığına dair değerlendirme yaparak gůvenilirliđi ortaya konmaya çalışılmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Doğal ürünler, tüm dünyada oldukça aktif bir şekilde bilimsel çalışmalarda kullanılmıştır (Van Wyk ve Wink, 2018). Tıbbi aromatik olarak bilinen şifalı bitkiler insan kültürünün gelişmesinde hayati bir rol oynamış ve geleneksel ilaçların kaynaklarını oluşturmuştur (Dar vd., 2017; Hosseinzadeh vd., 2015). Aslında bu bitkiler dünya çapında çeşitli kültürlerde geleneksel olarak çeşitli hastalıkların tedavisinin temelini oluşturmuştur (Okoye vd., 2014; Ross, 2005). Birçok tıbbi bitki içerikli ilaçların, kardiyovasküler hastalıkların ve iltihap oluşumlarının önlenmesi veya kimyasal maddelerin varlığından kaynaklanan kanser riskinin azaltılması gibi terapötik etkilerinin mevcut olduğu bilinmektedir (Škrovánková vd., 2012). Bu bitkiler, cüzzam, burun kanaması, felç, dalak, safra kesesi, mide, böbrek ve karaciğer hastalıklarını tedavi etmek için kullanılan zengin bir vitamin, mineral, karbonhidrat ve lif kaynağıdır (Alam vd., 2021; Pereira vd., 2020).

2.1 Gökkuşığı Alabalığında Bazı Yem Katkı Maddelerinin Kullanımı ve Etkisi

Su ürünleri yetiştiriciliğinde de, salgınlara mikrobiyal patojenler neden olduğundan, tıbbi bitkiler bu salgınları kontrol etmek ve balıkların bağışıklık sistemini iyileştirmek için antibiyotiklere alternatif olarak düşünülmektedir (Vaseeharan ve Thaya, 2014). Su ürünleri yetiştiriciliğinde birçok bitki yağı ekstraktı kullanılmıştır ve bunların tümü gökkuşığı alabalığında uygulamadan sonra sadece büyümede değil aynı zamanda sindirim enzimi, histoloji ve bağışıklıkta da faydalı sonuçlar sağlamıştır. Hajirezaee ve Khanjani (2021), çalışmasında çörek otu esansiyel yağı (ÇOEY) takviyesinin gökkuşığı alabalığında patojen olan *Aeromonas hydrophila*'ya karşı etkilerini 60 gün boyunca %0; %1 (10 g/kg); %2 (20 g/kg) ve %3 (30 g/kg) dozlarında denemişlerdir. Hajirezaee ve Khanjani (2021) deney grupları arasında büyüme parametrelerinde (yem dönüşüm oranı (FCR), toplam ağırlık artışı, toplam son ağırlık) gibi parametrelerde önemli bir değişiklik gözlenmediğini ($p>0,05$) fakat %2 ve %3 seviyelerindeki ÇOEY'nun, lizozimin serum ve mukozal seviyelerini ve bakterisidal aktiviteyi arttırdığını belirtmişlerdir ($p<0,01$). Hajirezaee ve Khanjani (2021), %3 ÇOEY

uygulanan balıklarda serum immünoglobulin (Ig) seviyelerinin, alternatif kompleman aktivitesinin (ACH50) ve peroksidaz aktivitesinin yükseldiğini belirtmişlerdir ($p<0,01$). ÇOEY uygulanan tüm balıklarda kandaki toplam albümin, mukus ve kandaki toplam protein arttığını belirten Hajirezaee ve Khanjani (2021), mukozal proteaz ve ALP aktivitelerinin %2 ve %3 BPO ile beslenen balıklarda yükseldiğini ($p<0,01$); bağışıklık ile ilgili genlerin (iNOS ve C3), ÇOEY uygulanan balıklarda artış gösterdiğini, %3 ÇOEY ile beslenen balıklarda ise maksimum ekspresyon ($p<0,01$) meydana geldiğini belirtmişlerdir. Ayrıca Hajirezaee ve Khanjani (2021), *A. hydrophila* ile mücadeleden sonra, IL-1 β ve TNF- α ekspresyonunun tüm gruplarda önemli ölçüde yükseldiğini ($p<0,01$), %2 ve %3 ÇOEY içeren diyetlerin, *A. hydrophila* ile mücadeleyi takiben balık ölümlerini önemli ölçüde azalttığını eklemişlerdir.

Parrino vd. (2020), acı biber (*Capsicum sp.*) yağının yem katkı maddesi olarak denendiği gökkuşağı alabalıklarında, büyüme performansı ve kan parametrelerinin etkisini araştırmışlar ve deneyler sonunda 4 mg/kg dozunda uygulamanın en yüksek büyüme yüzdesini ve en düşük yemden yararlanma oranını gösterdiğini belirtmişlerdir. Parrino vd. (2020), ayrıca serum biyokimyasal parametrelerinde önemli farklılıklar tespit etmiş olup, karaciğer enzimi, glikoz, kolesterol ve trigliserit düzeylerinde azalma; toplam protein ve albümin düzeylerinde ise kontrole göre artış meydana geldiğini vurgulamışlardır. Parrino vd. (2020), 1 mg/kg acı biber yağının gökkuşağı alabalıklarında, büyüme performansına, hematolojik ve serum biyokimyasal parametrelerine olumlu bir etki gösterdiği sonucuna varmışlardır.

Acar vd. (2018), gökkuşağı alabalığında nar çekirdeği yağı (NÇY) takviyesinin, büyüme performansına, bazı hematolojik, biyokimyasal, immünolojik parametrelere ve *Yersinia ruckeri* 'ye karşı hastalık direnci üzerindeki etkilerine dair çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonunda Acar vd. (2018), %0,5 ve %1 oranında NÇY'nin, kırmızı kan hücresi sayısı, hemoglobin konsantrasyonu, ortalama eritrosit hacmi, ortalama korpüsküler hemoglobin konsantrasyonu, kolesterol, aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz ve alkalik fosfat üzerinde önemli bir etki gösterdiğini belirtmişlerdir ($p<0,05$). Ayrıca, NÇY destekli diyetlerle beslenen balıklarda ağırlık artışı, büyüme ve yem dönüşümünde artış olduğunu belirten Acar

vd. (2018), NÇY'nin diyetle uygulanmasının, *Y. ruckeri* ile enfekte olan gökkuşığı alabalığının mortalitesinde düşüş sağladığını ve tedavi edilen gruplar arasında büyüme performansında ve bazı kan değerlerinde önemli farklılıklar meydana geldiği sonucuna varmışlardır.

Yousefi vd. (2022), kekik esansiyel yağı (KEY) ve prebiyotik (Immunogen ®) takviyesinin gökkuşığı alabalığında büyüme performansına, hematolojik parametrelere, doğal bağışıklık ve oksidatif stres durumu üzerindeki etkilerine dair yaptıkları çalışmalarında tüm deney gruplarının, kontrolden önemli ölçüde daha yüksek olan benzer nihai ağırlık, ağırlık artışı, spesifik büyüme oranı (SGR) ve hayatta kalma oranına (SR) sahip olduğunu belirtmişlerdir. Yousefi vd. (2022), deney gruplarının kontrol grubuna göre amilaz ve proteaz aktivitesinde önemli bir artış gösterdiğini, KEY ve İmmünojen takviyelerinin, kontrol grubuna kıyasla WBC ve Hb seviyesini önemli ölçüde artırdığını da eklemişlerdir. Yousefi vd. (2022), KEY ve İmmünojen takviyelerinin, katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GPx) ve süperoksit dismutaz (SOD) dahil olmak üzere karaciğer antioksidan parametreleri üzerinde de önemli ölçüde etkilerinin olduğu ve MDA üretiminin kontrol gruplarına göre azaldığı sonucuna da varmışlardır.

Diler vd. (2017), yem katkı maddesi olarak *Origanum onites* L. uçucu yağının farklı düzeylerinin gökkuşığı alabalığında büyüme performansına, antioksidan aktivitesine ve hastalık direnci üzerindeki etkilerine dair araştırma yapmışlardır. Diler vd. (2017), 90 gün boyunca balıklara dört farklı konsantrasyonda (0,125; 1,5; 2,5 ve 3,0 mL kg⁻¹) *O. onites* esansiyel yağı içeren yem vermelerinin neticesinde balıkların nihai ağırlıklarının kontrole göre önemli ölçüde artış sağladığını, FCR değerinin 1,5 ve 3,0 mL kg⁻¹ dozlarında diğer gruplara göre daha yüksek olduğunu (p<0,05) ve en düşük yem dönüşüm verimliliği oranının 0,125 mL kg⁻¹ grubunda gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Diler vd. (2017), *Lactococcus garvieae* ile kontrol testine tabi tuttukları balık gruplarından 3,0 mL kg⁻¹ 'da ölüm gerçekleşmediğini; 0,125; 1,5 ve 2,5 mL kg⁻¹ dozlarının ise balık ölümlerini önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir (p<0,05).

Zargar vd. (2019), *Thymus vulgaris* esansiyel yağlarının gökkuşığı alabalığının büyümesi, bağışıklık tepkisi ve hastalık direnci üzerindeki etkinliğini araştırdıkları

alışmalarında 2 ay boyunca balıkları 0,5; 1 ve 2 ml/kg yem katkılı yağlarla beslemişlerdir. Söz konusu çalışmada 0,5 ml/kg dozunda *Thymus vulgaris* esansiyel yağları ile beslenen balıklarda ağırlık artışı ve spesifik büyüme oranının, kontrole göre yüksek değere sahip olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Zargar vd. (2019), 2 ml/kg dozunda *Thymus vulgaris* yağ ile beslenen balıklarda IL-1 β ve lizozim genlerinin ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde azalmış olduğunu, ancak; 1 ve 2 ml yağlarla beslenen balıklarda C3 ve CD4 genlerinin önemli ölçüde stimüle olduğunu belirtmişlerdir ($p<0,05$). Söz konusu çalışmada *Aeromonas hydrophila* ile kontrol testine tabi tutulan balıklarda, en yüksek hayatta kalma oranının 0,5 ml/kg grubunda olduğu belirtilmiştir (Zargar vd., 2019).

Vazirzadeh vd. (2017), *Ducrosia anethifolia* esansiyel yağı ile takviye edilmiş bir diyetle yanıt olarak gökkuşaağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) büyüme, bağışıklık parametreleri ve bağışıklıkla ilgili genlerin ifadesindeki değışikliklerini değerlendirmişler ve 8 hafta boyunca balıkları farklı dozlarda (%0; %0,001; %0,01 ve %0,1) beslemişlerdir. Vazirzadeh vd. (2017), besleme denemelerinin sonunda, farklı uygulamalarda uçucu yağların büyümeyi etkilemediğı, %0,001 grubunda hematokrit seviyesinin yükseldiğini, %0,01 ve %0,1 gruplarındaki WBC değerin, %0,001 ve kontrol gruplarındakilerden daha yüksek değerde olduğu sonucuna varmışlardır ($p<0,05$). Vazirzadeh vd. (2017), lizozim aktivitesinde gruplar arasında farklılık görülmezken, solunum patlaması aktivitesinin %0,01 grubunda yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Söz konusu çalışmada ayrıca IL-1 β ve TNF- α genlerinin böbrekte ekspresyonun 30. günde %0,001 dozunda yukarı regüle edilirken, dalakta en yüksek IL-1 β ekspresyonunun %0,1 dozunda ve TNF- α için %0,01 dozunda meydana geldiğı belirtilmiştir (Vazirzadeh vd., 2017).

Fadeifard vd. (2018), zencefil (*Zingiber officinale*), çörek otu (*Nigella sativa*) ve koni ieğı (*Echinacea angustifolia*) gibi esansiyel yağlarla takviye edilerek beslenmiş gökkuşaağı alabalıklarının bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Fadeifard vd. (2018), çörek otu, zencefil ve koni ieğı ile beslenen gruplarda kontrole göre daha yüksek lizozim serum seviyeleri ve fagositik mikropların fark edildiğini ($p<0,05$); öte yandan, RBC, Hb, PCV, MCV, MCH ve MCHC'de tüm gruplarda anlamlı bir farklılık bulunmadığını rapor etmişlerdir ($p>0,05$).

Lakwani vd. (2022), siyah hardal tohumu yağı uygulamasının gökkuşacağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) büyüme performansına, sindirim enzim aktivitelerine ve bağışıklık yanıtı etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında 60 gün boyunca gökkuşacağı alabalıklarının üç farklı dozda siyah hardal tohumu yağı takviyesi ((%0,5 (SH05), %1 (SH1) ve %2 (SH2)) ile beslemişlerdir. Söz konusu çalışmanın neticesinde amilaz ve lipaz seviyelerinde, herhangi bir örnekleme zamanında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklılık olmadığını belirtmişlerdir ($p>0,05$). Lakwani vd. (2022), siyah hardal tohumu yağı uygulamasının gökkuşacağı alabalığında, potansiyel öldürme aktivitesini özellikle SH2 grubunda 30. günde yükselttiğini belirtmişlerdir ($p<0,05$). Buna ek olarak kontrole kıyasla, 30. günde SH1 ve SH2 balık gruplarında ve 60. günde SH05 ve SH1 gruplarında lizozim aktivitesini arttırdığını ($p<0,05$), ayrıca 30. günde SH1 ve SH2 balık gruplarında MPO değerini kontrole kıyasla önemli ölçüde arttırdığı ($p<0,05$) ortaya konulmuştur (Lakwani vd., 2022). Balık gruplarının farklı organlarının histolojisinde herhangi bir değişiklik gözlenmediğinin belirtildiği çalışmada, deney gruplarındaki tüm balık gruplarının bağırsaklarında IL-1 β gen ekspresyonunun, 30. günde önemli ölçüde arttığı belirtilmiştir (Lakwani vd., 2022). Benzer şekilde, 30. günde bağırsakta IL-8 ve IL-6, IL-10 ve IL-12 sitokin genlerinin ekspresyonunun arttığı söz konusu çalışmada SH05 ve SH1 balık gruplarının baş böbrek hücrelerinde bu genlerin benzer gelişmiş seviyelerinin görüldüğü rapor edilmiştir (Lakwani vd., 2022).

Farklı seviyelerde ticari bir bitkisel yağ karışımı (*Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* ve *Eucalyptus* sp.) olan Mix-oil®'in gökkuşacağı alabalığında hematolojik, biyokimyasal ve immünolojik etkilerinin incelendiği bir çalışmada, Mix-oil®'in *Streptococcus iniae*, *Aeromonas hydrophila*, *Lactococcus garviae* ve *Y. ruckeri* bakterileri için minimum inhibitör konsantrasyon (MIK) değerleri tespit edilmiştir (Bababaalian vd., 2020). Söz konusu çalışmada MIK değerlerinin sırayla ilk üç bakteri için 6,25 $\mu\text{l ml}^{-1}$, *Y. ruckeri* için ise 12,5 $\mu\text{l ml}^{-1}$ olduğu; 400 ppm Mix-oil® ile beslenen balıklarda kırmızı kan hücresi sayısı, hematokrit, immünoglobulin, lizozim, toplam protein, kompleman bileşeni C3, C4 ve alternatif kompleman yolunda (ACH50) kontrol grubuna kıyasla önemli gelişmeler gözlemlendiği rapor edilmiştir ($p<0,05$) (Bababaalian Amiri vd., 2020). Ayrıca; MCV, MCH, MCHC düzeyleri ve hemoglobin yüzdesi, aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeyleri açısından gruplar

arasında farklılık gözlenmezken ($p>0,05$), Mix-oil® uygulamasının, gökkuşağı alabalığının hematolojik parametrelerini ve bağışıklık fonksiyonunu destekleyerek *Y. ruckeri* 'ye karşı balık direncini artırabileceğini de öne sürmüşlerdir (Bababaalian Amiri vd., 2020).

Origanum onites yağı takviyesinin gökkuşağı alabalığında histoloji ve besin sindirilebilirliği üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, kontrol balıklarının karaciğer ve böbrek histopatolojisinde, herhangi bir deformite belirtisi olmaksızın normal bir histolojik mimari gösterirken, diyetlerde yüksek oranda *O. onites* yağı ile beslenen balıkların karaciğer ve böbrek örneklerinde hafif nekroz veya dejenerasyon gözlemlendiği belirtilmiştir (Yigit vd., 2017). Söz konusu çalışmada; 2 haftalık histoloji sonuçlarının değerlendirilmesi neticesinde %0,5 Cr_2O_3 kullanılarak besin sindirilebilirliği tespit edilmiş ve denemenin sonunda, *O. onites* yağının alabalık diyetinde farklı konsantrasyonlarda eklendiğinde kuru madde, protein ve lipid sindirilebilirliğinin etkilenmediği sonucuna varılmıştır (Yigit vd., 2017).

Kitosan nanoparçacıklarına yüklenen limon esansiyel yağının (LEY/KNP) gökkuşağı alabalığında büyüme performansına, serum biyokimyasal parametrelerine, humoral bağışıklık tepkilerine ve vücut kompozisyonuna etkilerine dair yapılan bir çalışmada balıklar; %0 (kontrol); %0,5; %0,75 ve %1 LEY/KNP'le desteklenmiş olacak şekilde gruplara ayrılmıştır. Söz konusu çalışmanın sonunda en yüksek nihai ağırlık ($32,04 \pm 1,22$ g), ağırlık artışı ($27,40 \pm 1,36$ g) ve spesifik büyüme oranı ($3,45 \pm 0,12$ gün⁻¹) %1 ile LEY/KNP takviyesinin olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Gheytasi vd., 2021).

Ghafarifarsani vd. (2021), *Thymus vulgaris* uçucu yağının (TUY), gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) aflatoksin B1 (AFB1) toksisitesi üzerindeki etkinliğini, büyüme performansı, doğal plazma bağışıklık indeksleri ve bağışıklık ile ilgili genlerin ifadesi açısından değerlendirdikleri çalışmada 30 gün boyunca, balıklarda kontrol olarak ticari bir diyet, +25 ppb AFB1, kontrol diyeti +50 ppb AFB1, kontrol diyeti +25 ppb AFB1 + %1 bahçe timusu olmak üzere beş deneysel diyet denemişlerdir. Deneyin sonunda, TUY takviyeli diyetlerle beslenen balıklar, TUY takviyesi olmayan AFB1'e kıyasla daha iyi nihai ağırlık, ağırlık artışı, FCR ve spesifik büyüme oranları gösterdiği belirtilmiştir ($p<0,05$). Ayrıca TNF- α , TGF- β ve

interlökin-8'in ekspresyonunun, diğer gruplara kıyasla AFB1 üzerinde belirgin şekilde artış gösterdiği belirtilmiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte Ghafarifarsani vd. (2021), TUY takviyesinin, interlökin-1 β ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığını ($p<0,05$); %1 TUY'nun, gökkuşığı alabalığında AFB1 kaynaklı büyüme baskılanmasını ve doğal bağışıklığı azaltabileceği sonucuna varmışlardır.

Amiri vd. (2021), ekşi limon kabuğundan (*Citrus limon*) elde edilen uçucu yağın (LKUY), deltametrin (DMN) pestisitine maruz kalan gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) büyüme performansına, karkas bileşimine, kan-serum parametrelerine ve karaciğer enzimleri üzerindeki etkilerine dair gerçekleştirdikleri çalışmalarında, LKUY (0; 200; 400 ve 600 mg/kg) olacak şekilde dört tedavi grubu denemişlerdir. Amiri vd. (2021), çalışmalarının sonunda LKUY 'nun uygulamasının DMN içeren gruplarda balık büyüme parametrelerini iyileştirdiği sonucuna varmışlardır.

Yousefi vd. (2021), gökkuşığı alabalıklarını (*Oncorhynchus mykiss*) %0 (C); 0,5 (T1); 1,5 (T2); 2,5 (T3) ve %4 (T4) ökse otu (*Viscum album*) özü ile takviye edilmiş diyetlerle sekiz hafta boyunca beslemişlerdir. Sonuçlara göre, en yüksek nihai ağırlık ve ağırlık artışı (%) ve en düşük yem dönüşüm oranı (FCR) T2 ve T3 uygulamalarında gözlenmiştir.

Hafsan vd. (2022), *Dracocephalum kotschy* uçucu yağının (DKUY) gökkuşığı alabalığı yavrularının bakteriyel (*Aeromonas hydrophila*) enfeksiyonuna karşı; hematoloji, bağışıklık, antioksidan savunma sistemi parametrelerini baz alarak hastalık direncine etkisini araştırmıştır. Söz konusu çalışmada 60 gün boyunca 0 (kontrol), 0,2; 0,25 ve 0,3 mg/kg dozlarında olmak üzere farklı DKUY içeren diyet uygulamışlardır. Hafsan vd. (2022), plazmadaki (alternatif kompleman aktivitesi (ACH50), IgM içeriği, lizozim aktivitesi, toplam protein ve toplam albümin) ve mukustaki (proteaz aktivitesi, IgM içeriği ve lizozim aktivitesi) bağışıklık bileşenlerinin, 0,2 mg/kg grubunda diğer gruplarla karşılaştırıldığında önemli ölçüde artış gösterdiğini belirtilmiştir ($p<0,01$). Hafsan vd. (2022), balıklara uygulanan 0,3 mg DKUY/kg takviyesinin mukozal, lizozim aktivitesi ve IgM içeriği baskıladığını; karaciğer antioksidan enzimleri, glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) ve

süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin, diğer deneysel diyetlerle karşılaştırıldığında 0,25 ve 0,3 mg DKUY/kg dozlarının artan aktivite gösterdiklerini vurgulamışlardır ($p<0,01$). DKUY'ye yanıt olarak hematokrit, kırmızı kan hücresi sayısı (RBC), beyaz kan hücresi (WBC), hemoglobin içeriği ve ortalama eritrosit hücre hemoglobin içeriğinin (MCHC) arttığı, buna karşılık, diğer diyetlere kıyasla 0,2 ve 0,25 mg DKUY/kg diyetle beslenen balıklarda ortalama korpüsküler hemoglobin düzeylerinin (MCH) azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,01$). Hafsan vd. (2022), balıkların 0,2 ve 0,25 mg DKUY/kg ile desteklenmesi sonucunda TNF- α ve IL-8 ekspresyonunun azaldığını; buna karşılık, lizozim ekspresyonunda artış sağladığını tespit etmişlerdir. Hafsan vd. (2022), optimize edilmiş konsantrasyonda DKUY'nin bağışıklık uyarıcı ve *A. hydrophila* enfeksiyonunun neden olduğu ölümlere karşı direnç sağlayıcı etkisi olduğunu ortaya koymuşlardır.

Salem vd. (2022), beyaz hardal (*Sinapis alba*) yağının (BHY) diyet takviyesinin yavru gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) büyüme performansı, bağışıklık tepkileri, sindirim ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. 9 hafta boyunca balıklara; %0 (kontrol); %0,5; 1 ve %1,5'inde BHY içeren yemlere destekledikleri çalışma sonunda, balıkları iki ayrı deney düzeneğinde *Aeromonas hydrophila* ve *Yersinia ruckeri* ile kontrol testine tabi tutmuşlardır. Sonuç olarak, kontrol grubuna kıyasla tüm deney gruplarında nihai ağırlık, ağırlık artışı ve spesifik büyüme hızının önemli ölçüde arttığını tespit etmişler, solunum patlaması ve potansiyel öldürme aktivitesi gibi bağışıklık parametrelerinin, kontrole kıyasla tüm deney gruplarında azaldığı sonucuna varmışlardır ($p<0,05$). Ayrıca Salem vd. (2022), deney gruplarının hematolojik sonuçlarının, tüm gruplarda önemli bir farklılık göstermediğini ayrıca pepsin ve tripsin seviyelerinin tüm deney gruplarında azaldığını belirtmişlerdir ($p<0,05$). Salem vd. (2022), çalışma sonunda, *A. hydrophila*'ya karşı yapılan kontrol testi sonucunda gruplar arasında önemli farklılık gözlenmediğini; bununla birlikte, *Y. ruckeri* 'ye karşı deney gruplarında kontrol grubuna göre artan hayatta kalma oranı gözlemlediklerini belirtmişlerdir ($p<0,05$).

2.2 Balık Yemlerinde Propolis Kullanımı

Propolisin, çeşitli balık türlerinde bağışıklığı destekleyici olarak kullanılmasının yanı sıra büyüme performansına olumlu etkilerini içeren çalışmalar mevcuttur.

Örneğin; Deng vd. (2011) çalışmasında, gökkuşaklı alabalığı *Oncorhynchus mykiss* üzerinde 10 hafta boyunca 2 ve 4 g/kg dozlarında propolisin etanolik ekstraktının yeme ilave edilmesinin sonucunda, nihai ağırlıkta, ağırlık artışında, SGR ve FCR değerlerinde iyileşme olduğunu ayrıca, gökkuşaklı alabalığında spesifik olmayan bağışıklık parametrelerini de önemli ölçüde arttırdığını belirtmiştir (Deng vd., 2011).

Tukmechi vd. (2014), gökkuşaklı alabalığı beslenmesinde 96 saat süreyle 0 (kontrol); 1 g/kg; 2 g/kg ve 5 g/kg dozunda ve 45 gün süreyle de 0,5 g/kg; 1 g/kg ve 2 g/kg dozunda etanolik İran propolisi ekstraktını yem katkı maddesi olarak denemişlerdir. Tukmechi vd. (2014), propolisin balıklarda büyüme performansının arttığını ve hem kısa süreli hem de uzun süreli uygulamaların tüm tedavi gruplarında, kontrol grubuna göre serum lizozim aktivitesinde, kompleman aktivitesinde ve toplam immünoglobülinde önemli bir artış sağladığını belirtmişlerdir.

Abd-El-Rhman (2009), 28 gün boyunca Nil tilapya balıklarında yem katkı maddesi olarak 10 g/kg ham propolis ve etanolik propolis ekstraktı denemişlerdir. Çalışma sonunda propolisin etanolik ekstraktları kullanılarak daha iyi büyüme performansı, özgül büyüme oranı, yemden yararlanma oranı ve günlük büyümenin önemli ölçüde artışını tespit etmişlerdir. Abd-El-Rhman (2009), ayrıca propolisin etanolik ekstraktlarının tilapyada serum lizozim aktivitesini ve monosit düzeylerini arttırdığı sonucuna varmıştır. Wafaa vd. (2014), çalışmalarında propolisin etanolik ekstraktının tilapia balıklarında (*Oreochromis niloticus*), 5 g/kg dozunda 12 hafta boyunca uygulanması neticesinde; nihai ağırlık, ağırlık artışı ve spesifik büyüme oranı için benzer sonuçlar elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Dotta vd. (2015), %0,5; %1 ve %2 'lik dozlarda propolis ve *Aloe barbadensis* 'in 1:1 oranında doğal özlerinin karışımıyla desteklenen Nil tilapyasının yüzme kesesinde karajenan tarafından indüklenen akut inflamatuvar yanıtı tespit etmişlerdir. Dotta vd. (2015), özellikle 0,5'lik dozda propolis ve Aloe karışımının, enflamatuvar odaktaki

hücrelerin sayısında önemli bir artışa neden olduğunu, özellikle makrofajların, dokulardaki fagositik aktiviteden sorumlu hücrelerinde önemli bir artış sağladığını belirtmişlerdir.

Abbass vd., 2012 çalışmasında, 3 hafta boyunca tilapia balıklarında, yeme ilave ettikleri 25 g/kg dozunda suyla ekstrakte edilmiş propolisin, spesifik büyüme hızında, ağırlık artışında ve yemden yararlanma iyileşmeler sağladığını belirtmişlerdir. Ayrıca propolisin sulu ekstraktının tilapiada sadece büyüme hızını arttırmakla kalmayıp aynı zamanda fertilizasyonda da artış sağladığını belirtmişlerdir.

2.3 Alabalıklarda Kırmızı Ağız Hastalığının Tedavisi

Su ürünleri yetiştiriciliği tarihi boyunca artan sayıdaki bakteriyel, parazitik ve viral hastalıklardaki problemler, üreticilerin bir numaralı endişesi olmuştur. Enfekte bir hastalığın başarılı bir şekilde tedavi edilebilmesi erken zamanda alınan tedbirle mümkündür, çünkü birçok hastalık balıkları yaşam evreleri boyunca olumsuz etkilenmiştir (Ellis, 1988).

Balıklarda akut bir bakteriyel sepsisemi olan enterik kırmızı ağız, bakteriyel *Yersinia ruckeri* 'den kaynaklanır (Bullock, 1990; Busch, 1978; Furones vd., 1993). 1950 'lerin başlarında Ross vd. (1966) bu bakteriyi ilk kez ABD Hagerman Vadisi 'nde, izole etmiş olup; 1978'de ise bu bakteri *Yersinosis*'in yeni bir türü olarak sınıflandırılmıştır (Ewing vd., 1978). Hagerman Vadisi 'ndeki keşfinden bu yana, bu bakteri ılıman sularda aktif olarak yetiştirilen tatlı su balıkları için dünyanın birçok bölgesinde tehlike yaratmaya devam etmiştir (Barnes, 2011). 1978'de etkili aşılardan erken gelişimi ve bunların hastalıktan etkilenen ülkelerde yaygın olarak kullanılması nedeniyle bakteriyel hastalıkların etkisi önemli ölçüde azalmıştır (Busch 1978; Horne ve Robertson, 1987). Enterik kırmızı ağız hastalığı aşılarının uygulanmasının 7 günde en yüksek koruma düzeylerini sağladığı belirtilmiştir (LaPatra vd., 2015). Benzer sonuçlara Salinas vd. (2015) tarafından da ulaşılmış olup; AquaVac ERM Oral (MERCK Animal Health) veya deneysel *Y. ruckeri* O1 aşısının gökkuşağı alabalığına gavaj yoluyla verilmesinin *Yersinia ruckeri* bakterisine karşı koruma sağladığı belirtilmiştir (Villumsen vd., 2014).

Aşılama yoluyla korumanın arttığına dair birçok rapor olmasına rağmen, yeni *Y. ruckeri* suşlarının ortaya çıkışı ile birlikte özellikle stres koşullarında aşılamanın etkili bir şekilde kontrol sağlayamadığı tespit edilmiştir (Pickering ve Pottinger, 1987). Bu sebepten canlı aşılardan gibi aşılardan dikkatli kullanılmalı, aşılarda mutant suşların kullanılırsa, bu bakterilerin sucul ekosistemlerde daha kolay yayılmasının mümkün olduğu gözden kaçırılmamalıdır (Vivas vd., 2004).

Antibiyotik kullanımı, viral veya bakteriyel enfeksiyonlara maruz kalmış balıklar için enfeksiyonun ve yayılmasının önüne geçilmesi için genellikle ilk akla gelen seçenektir (Kumar vd., 2015; Rucker, 1966). Amoksisilin; oksolonik asit; oksitetrasiklin; sülfadiazin trimetoprim ve florfenikol gökkuşağı alabalığında entrikt kırmızı ağız hastalığını tedavi etmek için kullanılmaktadır (Abbass vd., 2010). Bununla birlikte, ABD'de izole edilmiş olan bazı *Yersinia ruckeri* suşlarının, hem sülfamerazin hem de oksitetrasiklin terapötik dozlarına karşı bir direnç gösterdiği bilinmektedir (De Grandis ve Stevenson, 1985; Post, 1987). Bu durum daha sonra antibiyotik dirençli bakterilerin gelişmesine de katkıda bulunmuştur (Defoirdt vd., 2007).

Antibiyotiklerin ve aşılardan, bakteriyel *Yersinia ruckeri* gibi hastalıkları kontrol etmek için kullanılan ana yöntemler olarak tercih edilse de, son araştırmalar probiyotik kullanımına da ilgi göstermektedir (Brunt vd., 2007; Capkin ve Altınok, 2009; Irianto ve Austin, 2002; Kim ve Austin, 2006). Ayrıca balıklarda çeşitli immün uyarıcılar ve yöntemlerde denenmektedir, özellikle son yıllarda, balıkların doğuştan gelen bağışıklığını artırdığı ortaya konulan çeşitli doğal bileşenlerle daha fazla üretim yemi desteklendiğinden, balık diyetlerinde de immüno-uyarıcıların kullanımı yaygınlaşmıştır. İmmün uyarıcılar, bakteriyel enfeksiyonlara karşı direnci artırarak aşılamanın etkinliğini artırmak için kullanılabilir (Tobback vd., 2007). İmmün uyarıcıların balık larvalarında, bağışıklık uyarıcıların bir besin takviyesi olarak uygulanması, hayvanın doğuştan gelen savunmasını artırabilmektedir (Bricknell ve Dalmo, 2005). Bu immünostimulanların patojen organizmalara karşı faydalı olduğu tespit edilmiştir (Awad ve Awaad, 2017; Galina vd., 2009; Govind vd., 2012; Olusola vd., 2013; Pandey vd., 2014; Stratev vd., 2018; Vaseeharan ve Thaya, 2014). *Juniperus excelsa* uygulaması gökkuşağı alabalığında *Y. ruckeri* 'ye karşı koruma sağlar (Bilen vd., 2021b). Gökkuşağı alabalığında yeme kışniş ekstraktı eklenmesinin, *Y. ruckeri*

enfeksiyonuna karşı balıkların direncini geliştirdiği, ayrıca büyüme faktörlerini ve immünolojik indeksleri olumlu yönde etkilediği belirtilmiştir (Farsani vd., 2019). Deniz yosunu olan *Ceramium rubrum* özünün, *Y. ruckeri* enfeksiyonuna karşı koruma sağladığı tespit edilmiştir (Cortés vd., 2014).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışma Alanı

Bu çalışmanın tüm aşamaları, Kastamonu Üniversitesi, Kuzeykent kampüsü, Su Ürünleri Fakültesi Akuatik Toksikoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Akuatik toksikoloji laboratuvarı

3.1.2 Balık ve Propolisin Temini

Gökkuşaağı alabalığı Ilgaz, Kastamonu'da özel bir üretim çiftliğinden temin edilmiştir. Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Toksikoloji laboratuvarına getirilen balıklar kapalı devre filtrasyon sistemine bağlı olan ve hava kompresörü ile sürekli olarak oksijen sağlanan akvaryumlara yerleştirilmiş, 2 hafta süreyle ortama adaptasyonları sağlanmıştır (Şekil 3.2). Balıkların deneme öncesi beslenmesi için ticari yem kullanılmıştır (Şekil 3.3). Propolis, zeytinyağı ile özütlenmiş bir şekilde, Kastamonu Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Kimya Mühendisliği bölümünden temin edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Zeytinyağı ile özütlenmiş propolis

3.1.3 Deneyin Tasarlanması ve Dizaynı

Laboratuvara getirilen 396 balık 12 adet akvaryuma dağıtılmıştır. Her 100 L'lik akvaryuma, vücut ağırlıkları ortalama $5,22 \pm 0,13$ g olan 33 balık stoklanmıştır (Şekil 3.5). Çalışmada kullanılacak balıklar dört gruba ayrılmış olup, her grup 3 tekrardan meydana gelmiştir.



Şekil 3.5 Deney akvaryumu ve balıklar

Balıklar ve tutuldukları kapalı devre sistem her gün kontrol edilmiş bakımları yapılmıştır. Sıcaklık, tuzluluk, pH ve çözülmüş oksijen, çoklu sensör probu olan multiparametre ile (Hach Lange HQ 40D) her gün kaydedildiği (Şekil 3.6) deney süresince, akvaryumların dip temizlikleri düzenli olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.6 Fizikokimyasal su kalite parametrelerinin ölçümü

3.2 Yöntem

3.2.1 Yemlerin Hazırlanması ve Balıkların Beslenmesi

Zeytinyağı ile özütlenen propolis, rasyonları bilinen ticari balık yemine (Tablo 3.1) sırasıyla P01 için %0,1; P03 için %0,3 ve P05 için %0,5 oranlarında püskürtülerek ilave edilmiş olup kontrol grubu yemlerine ise hiçbir ilave yapılmamıştır (Şekil 3.7). Tüm deney gruplarının günde iki defa olacak şekilde (sabah 9:00 ve akşam 17:00) doyana kadar beslenmeleri gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan ticari diyetin bileşimi

Temel besin değerleri	Değer
Ham protein	%51,0
Ham yağ	%16,0
Ham selüloz	%1,66
Kül	%10,77
Kalsiyum	%1,73
Fosfor	%0,91
Sodyum	%0,65
Vitaminler ve mikroelementler	
Vitamin A	8000 IU/kg
Vitamin D3	1000 IU/kg
Vitamin E	350 mg/kg
Manganez	30 mg/kg
Çinko	60 mg/kg
Demir	20 mg/kg
İyot	2 mg/kg
Bakır	6 mg/kg
Selenyum	0,2 mg/kg



Şekil 3.7 Gökkuşuğu alabalığı yemlerine zeytinyağı ile özülten edilen propolisin dahil edilmesi

3.2.2 Örneklem Tekniği ve Veri Toplama

Deneyler Kastamonu Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 2021, 19 no'lu kararı ile alınan etik kurul izni ile gerçekleştirilmiştir. Balıklar gruplara göre 3'er tekerrür olacak şekilde, toplamda 12 adet akvaryuma dağıtılmak üzere rastgele

seçilmiştir ve canlı ağırlıkları deney başlangıcından sonra 7., 14. ve 21. günlerde tespit edilmiştir. Örnekleme zamanlarında, her akvaryumdan 3 'er balık alınarak, 0,5 ml/L konsantrasyonda 2-fenoksietanol ile anestezi işlemine tabi tutulmuştur (Sönmez vd., 2018). Bayıltilan balıklardan heparinize edilmiş şırıngalar ile kan örneklemeleri gerçekleştirilmiştir ve ardından hızlı bir şekilde ötenazi uygulanarak; dalak, böbrek ve bağırsak gibi doku örneklemeleri yapılmıştır (Şekil 3.8). Gökkuşığı alabalığında zeytinyağı ile özütlenen propolisin immünolojik etkilerini belirlemek amacıyla alınan doku örnekleri analiz zamanına kadar -80 °C 'de saklanmıştır. Ayrıca, histopatolojik analiz için karaciğer, dalak, böbrek ve bağırsak dokularından gerekli kesitler alınmıştır.



Şekil 3.8 İmmünolojik analiz için kullanılan gökkuşığı alabalığı doku örnekleri

3.2.3 Hematolojik Analizler

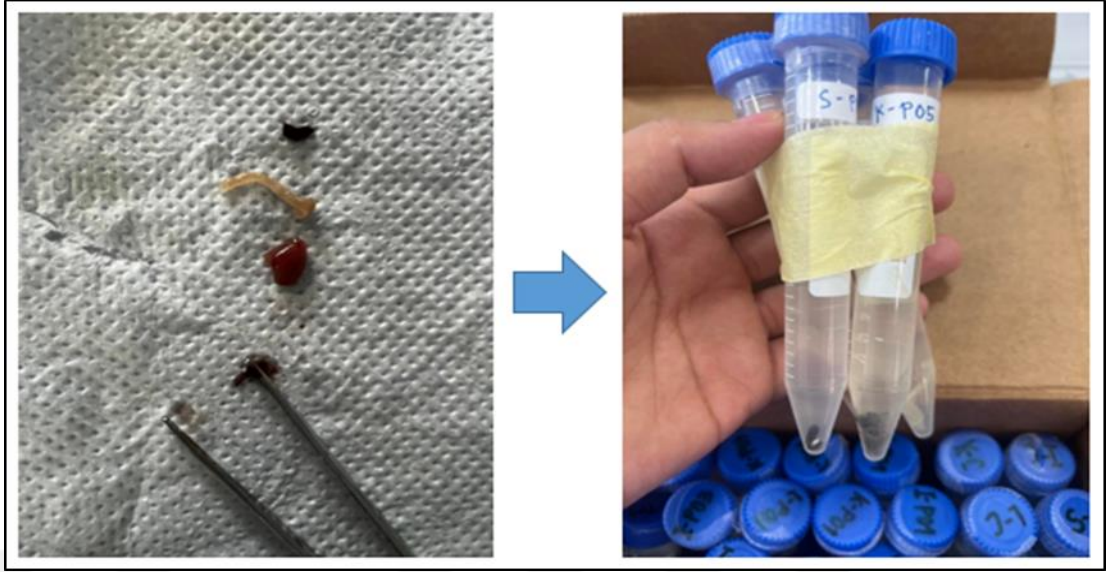
Balıkların kaudal venalarından alınan kan örnekleri, hematolojik parametrelerin analizi için konik Eppendorf® tüplerine aktarılmıştır (Şekil 3.9). Kırmızı kan hücresi ($RBC \times 10^6/mm^{-3}$) sayıları, hemoglobin (Hb, g/dL^{-1}) ve hematokrit (Hct, %) değerleri hematoloji cihazında (Mindary BC-3000) tespit edilmiştir (Şekil 3.9) (Blaxhall ve Daisley, 1973). Ayrıca MCV (fl), MCH (pg), MCHC (g/dl) değerleri Dacie (2006) ve Wintrobe (1934) yöntemlerine göre tespit edilmiştir.



Şekil 3.9 Kan örneklerinin toplanması ve analizinde kullanılan hematoloji cihazı

3.2.4 Histolojik Değerlendirme

Gökkuşığı alabalığı yavrularının farklı dozlarda propolisle beslenmesinden sonra herhangi bir anormallik olup olmadığını tespit etmek için histolojik değerlendirme yapılmıştır. 3 tekrarlı olan tüm gruplardan balık dokuları (bağırsak, böbrek, karaciğer ve dalak) %10 tamponlu formol solüsyonunda sabitlenmiş (Şekil 3.10) ve ardından fiksasyonu takiben dokular çeşme suyunda yıkanmıştır. Dokular dereceli alkollerde (%70; %80; %96 ve %100) dehidrate edilmiş ve metilbenzoat ve benzol serilerinden geçirilerek parafine gömülmüştür. Döner bir mikrotom (Leica RM 2155 R) vasıtasıyla parafin bloklarından 5 µm'lik seri kesitler alınan dokularda hematoksilin-eozin (HE) boyaması yapılmıştır. Kesitlerin histomorfolojik yapısı dijital kamera entegreli (Olympus DP72, Japonya) araştırma mikroskobu (Olympus BX51, Japonya) altında incelenmiş ve istenilen bölgelerden fotoğrafları çekilmiştir.



Şekil 3.10 Histopatoloji analizi için kullanılan doku örnekleri

3.2.5 Spesifik Olmayan Bağışıklık Tepkileri için Parametreler

3.2.5.1 Oksidatif radikal üretimi (NBT analizi)

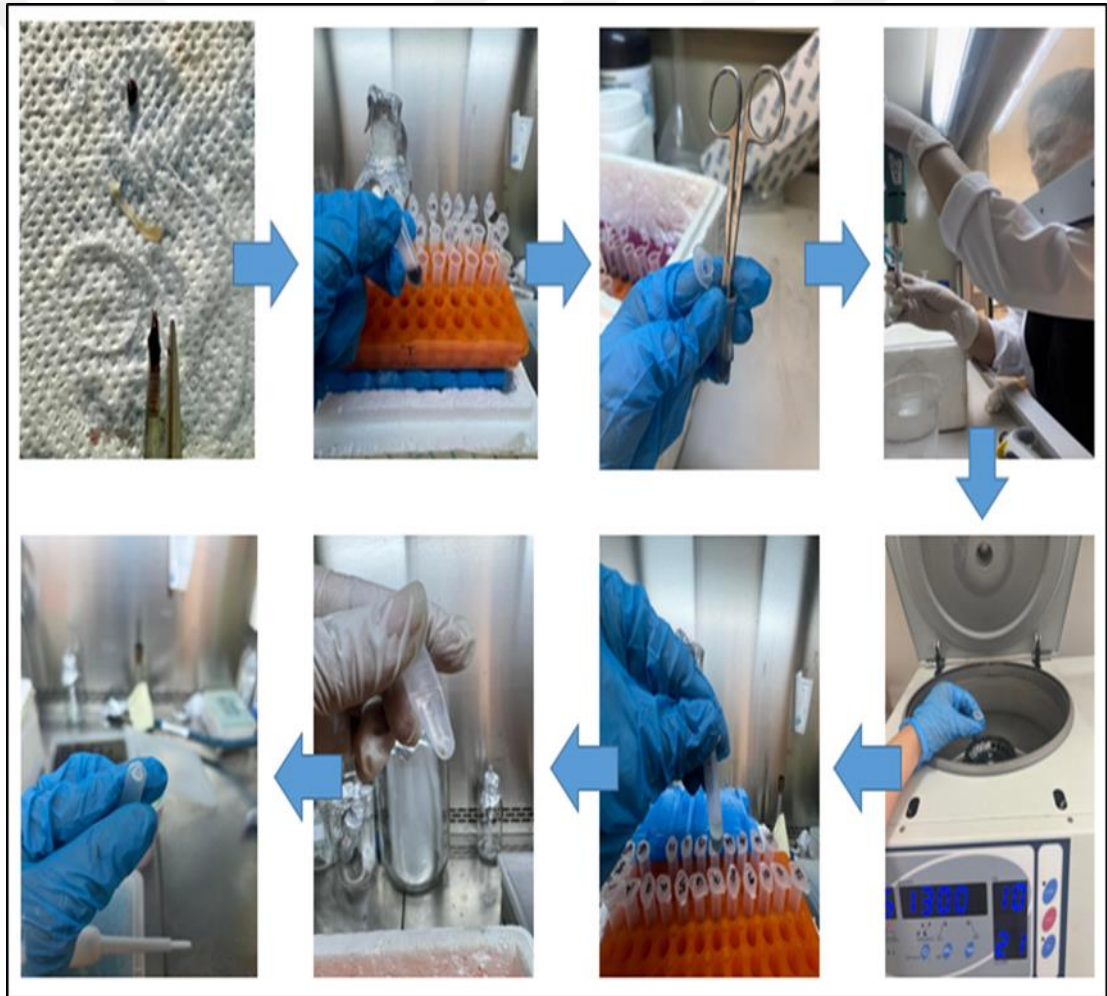
Balıklarda oksidatif radikal üretimi, Siwicki ve Anderson (1993) tarafından kullanılan yöntemle göre hesaplanmıştır. Kısaca, 0,1 ml kan (heparinize kan) numunesi ile 0,1 ml %0,2 NBT solüsyonu (Sigma-Aldrich, Almanya) bir test tüpünde on dakika süreyle reaksiyona bırakılmıştır. Süre bitiminde, çözeltiye 0,5 ml N N-dimetilformamid eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. N N-dimetilformamid eklendikten hemen sonra karışıma 5000 xg 4°C’de 8 dakika santrifüjlenmiştir. Örnekler spektrofotometre cihazında (Hach-Lange DR6000) optik yoğunluğu (OD) değerlendirmek için 540 nm dalga boyunda analiz edilmiştir.

3.2.6 Sitokin Gen Ekspresyon Analizleri

3.2.6.1 RNA saflaştırması

Dokulardan RNA saflaştırması için; 7., 14. ve 21. günlerde alınan doku örnekleri kullanılmıştır. Akvaryumlardan rastgele seçilen üçer balık örneğinden alınan dokular (bağırsak; böbrek ve dalak) RNA ekstraksiyonu için bir dizi analiz işlemlerine alınmıştır. Örnekleme gününden söz konusu analizlerin yapılacağı zamana kadar -80

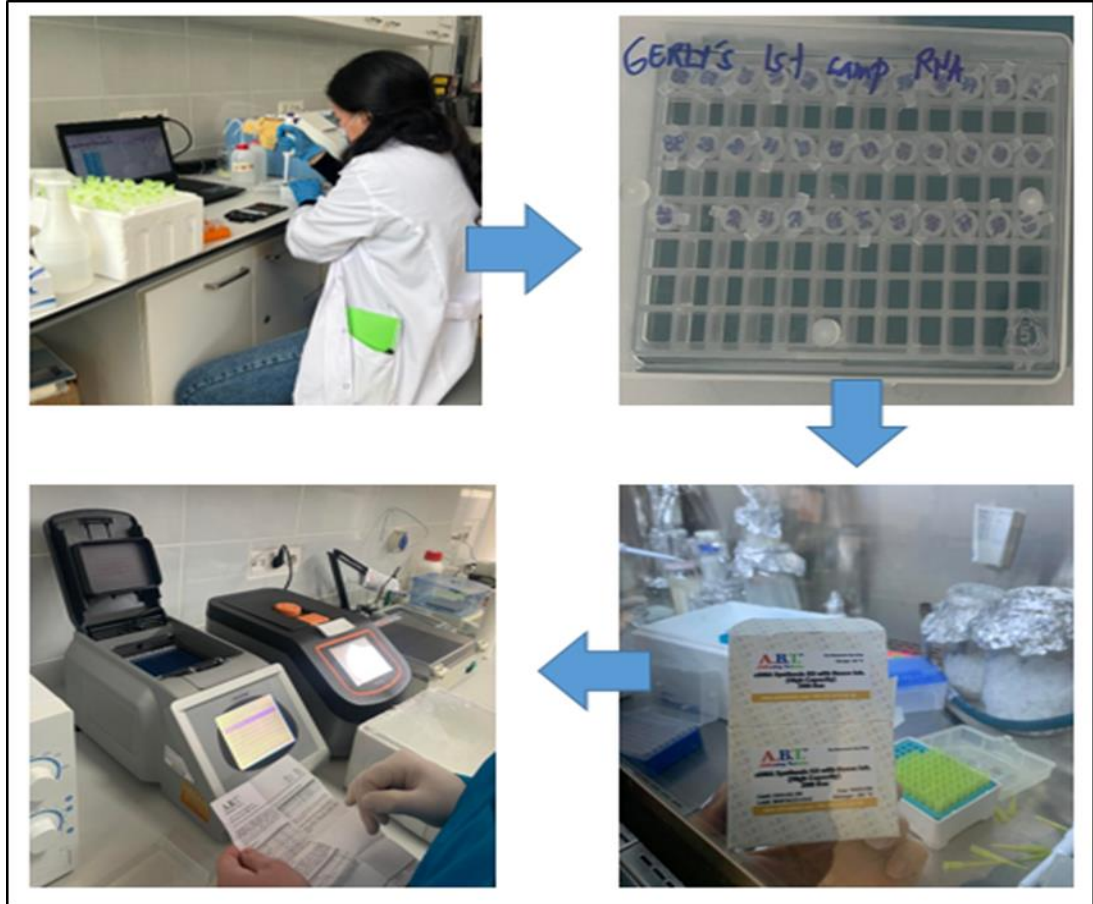
C'de saklanan dokulara TRIzol (GIBCO BRL, ABD, Kat. No.15596-026) ilave edilerek homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 4°C'de 10 dakika 13000 rpm'de santrifüj (cihaz model: Nüve 1200 R) edilmiş ve ardından, ISOLATE II RNA Mini Kiti kullanılarak tüm RNA'nın izolasyonu sağlanmıştır (şekil 3.11). Ardından, izole edilen RNA'ların saflık ve konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla Multiskan GO spektrofotometrisi (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak 260/280 nm dalga boylarında absorban ölçümleri yapılmıştır. Sonrasında nükleaz içermeyen saf su ile (NFW) 10 ng/μl olacak şekilde seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.11 RNA izolasyon aşamaları

3.2.6.2 Komplementer DNA (cDNA) sentezi

RNA izolasyonundan sonra, cDNA sentezi için 1 µl toplam RNA kullanılmıştır. Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi için Applied Biosystems kiti/ThermoFisher™ yüksek kapasiteli cDNA Ters Transkripsiyon Kiti kullanılmıştır. Kısaca, cDNA kiti protokolünde belirtildiği gibi 20 µl ana karışım solüsyonu oluşturulmuştur. Bu çözelti 2 µl 10X Reaksiyon tamponu; 1 µl dNTP karışımı (her biri 2,5 mM); 2 µl heksamer (50 µM), 1 µl Ters transkriptaz (200 U/ µl); 0,5 µl RNase İnhibitörü; 3,5 µl RNase ve 10 µl RNA örneğinden oluşmaktadır. cDNA sentezi için hazırlanan karışım PCR cihazında 25°C'de 10 dakika, ters transkripsiyon için 42°C'de 15 dakika ve 85°C'de 5 dakika süreyle bir dizi protokol uygulanmıştır. Elde edilen cDNA örneklerinin saflık ve konsantrasyon değerleri multiskan spektrofotometrisi ile 260/280 nm absorbans aralığında ölçülmüş, sonrasında konsantrasyonu 10 ng/µl olacak şekilde seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.12 cDNA sentezi

3.2.6.3 RT-qPCR analizleri ve gen ekspresyonları

Sitokin genlerinin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için, RT-qPCR Bio-Rad, U.S.A. cihazı kullanılmıştır. cDNA master mix çözeltisine benzer şekilde, RT-qPCR mastermix için de 20 µl karışım kullanılmıştır. Mastermix içeriğinde, her spesifik genin (referans olarak β -aktin, IL-1 β , IFN, TNF, TGF- β) 2 'şer µl ileri ve geri primerleri (10 µM 'a seyreltilmiş), 2 µl cDNA örneği, 4 µl NFW ve 10 µl SYBR mevcuttur. Spesifik gen primerleri Tablo 3.2'de listelenmiştir. Söz konusu hazırlanan mastermix, 96 well plate içerine dağıtılarak Applied Biosystem marka RT-qPCR cihazında bir dizi reaksiyona tabi tutulmuştur (Şekil 3.13). RT-qPCR protokolü: önce denatürasyon, bağlanma ve uzatma olacak şekildedir. Altunoğlu vd. (2017), çalışmalarında belirttiği üzere; $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerine göre bağıl gen seviyesinin ifadeleri hesaplanmıştır.

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan primerler

Gen	Primer (5'-3')	Referans
β -Actin	F5' ATGGAAGGTGAAATCGCC 3' R5' TGCCAGATCTTCTCCATG 3'	(Sigh vd., 2004)
IL-1 β	F5' ACCGAGTTCAAGGACAAGGA 3' R5' CATTTCATCAGGACCCAGCAC 3'	(Awad vd., 2013)
IFN-1	F5' AGAATGCCCCAGTCCTTTTCC 3' R5' GACTTTGTCCTCAAACCTCAGCATCA 3'	(Ooi vd., 2008)
TNF- α	F: 5' AGCCACAGGATCTGGAGCTA 3' R: 5' GTCCGCTTCTGTAGCTGTCC 3'	(Roca vd., 2008)
TGF- β	F5' AGATAAATCGGAGAGTTGCTGTG 3' R5' CCTGCTCCACCTTGTGTTGT 3'	(Awad vd., 2013)

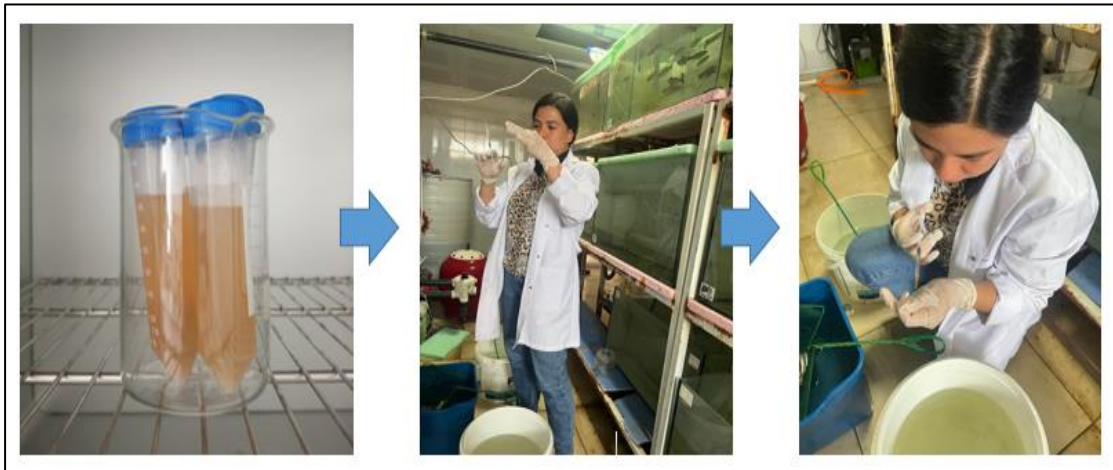


Şekil 3.13 qRT-PCR sisteminde genetik ifade

3.2.7 Kontrol Testi

Deneylerin bitiminden sonra, balıklar kontrol testinden önce 1 gün boyunca yemden kesilmiştir. Sonrasında balıklar *Yersinia ruckeri*, bakterisinin (daha önce hastalıklı balıklardan izole edilen; 100µL 1 x 10⁷ yoğunluğunda) intraperitoneal olarak enjekte edilmesi ile enfekte edilmiştir (Şekil 3.14). Enjeksiyondan sonra, ölü balıklar not edilmiş ve balıkların nispi hayatta kalma oranları (SR) 10 gün süre sonunda ilgili formüle (3.8) göre hesaplanmıştır (Rairakhwada vd., 2007).

Yaşama yüzdesi = (Hayatta kalan balık sayısı/enfekte balık sayısı)*100 (3.8).



Şekil 3.14 Gökkuşığı alabalığına *Yersinia ruckeri* enjeksiyonu

3.2.8 İstatistiksel Analizler

Tüm istatistiksel analizler SPSS 23.0 sürümü kullanılarak yapılmıştır. Çalışmadaki tüm tedavi grupları arasında kan parametreleri, spesifik olmayan bağışıklık tepkisi, sitokin ifadeleri ve hayatta kalma oranındaki dikkate değer farklılıkları bulmak için %0,05 anlamlılık düzeyinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır.



4. BULGULAR

4.1 Hematolojik Bulgular

Besleme denemesinin sonunda, hematolojik parametreler Tablo 4.1 ve Tablo 4.2’de özetlenmiştir. Örnekleme zamanlarından elde edilen sonuçlara göre, kırmızı kan hücresi (RBC) ve hematokrit (HCT) değerlerinde farklılık sadece 21. günde kontrol grubunda görülmüş olup, deneme gruplarına göre yüksek çıkmıştır ($p<0,05$). Diğer gruplar arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$). Bunun yanında hemoglobin (HGB), ortalama korpüsküler hemoglobin (MCH) ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) değerlerinde sadece 21. günde P05 grubunda diğer gruplara göre yüksek sonuç elde edilmiştir ($p<0,05$).

Tablo 4.1 Çalışmanın 7., 14. ve 21. günlerinde gökkuşağı alabalıklarında gruplara göre RBC,HGB ve HCT değerleri

Örnekleme zamanı (Gün)	Gruplar	RBC ($10^6/\text{mm}^{-3}$)	HGB (g/dl^{-1})	HCT (%)
7	K	$0,36 \pm 0,03$	$13,50 \pm 0,87$	$7,47 \pm 0,82$
	P01	$0,33 \pm 0,07$	$12,50 \pm 1,50$	$6,77 \pm 1,52$
	P03	$0,31 \pm 0,07$	$12,70 \pm 1,69$	$6,37 \pm 1,62$
	P05	$0,36 \pm 0,11$	$12,10 \pm 1,80$	$7,30 \pm 2,25$
14	K	$0,39 \pm 0,04$	$12,10 \pm 0,00$	$7,90 \pm 0,82$
	P01	$0,47 \pm 0,04$	$12,83 \pm 0,811$	$9,60 \pm 0,87$
	P03	$0,54 \pm 0,10$	$13,60 \pm 0,49$	$10,97 \pm 1,95$
	P05	$0,53 \pm 0,00$	$13,00 \pm 0,80$	$10,67 \pm 0,24$
21	K	$0,52 \pm 0,05^*$	$12,10 \pm 0,36$	$10,57 \pm 0,96^*$
	P01	$0,38 \pm 0,11$	$12,10 \pm 0,90$	$7,57 \pm 2,05$
	P03	$0,44 \pm 0,023$	$12,20 \pm 0,71$	$9,07 \pm 0,50$
	P05	$0,30 \pm 0,06$	$14,067 \pm 0,12^*$	$6,00 \pm 1,31$

Değerler ortalama $\pm$ SE olarak verilmiştir. P01: Propolis %0,1; P03: Propolis %0,3; P05: Propolis %0,5; RBC: Kırmızı Kan Hücresi; HGB: Hemoglobin; HCT: Hematokrit

Besleme denemesinin sonunda, ortalama eritrosit hacmi (MCV) gruplar arasında farklılık göstermemiş olup ($p>0,05$), eritrosit başına ortalama hemoglobin (MCH) ve eritrosit başına ortalama hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) düzeyleri, tüm tedavi gruplarında anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 Çalışmanın 7., 14. ve 21. günlerinde gökkuşağı alabalığında gruplara göre MCV, MCH ve MCHC değerleri

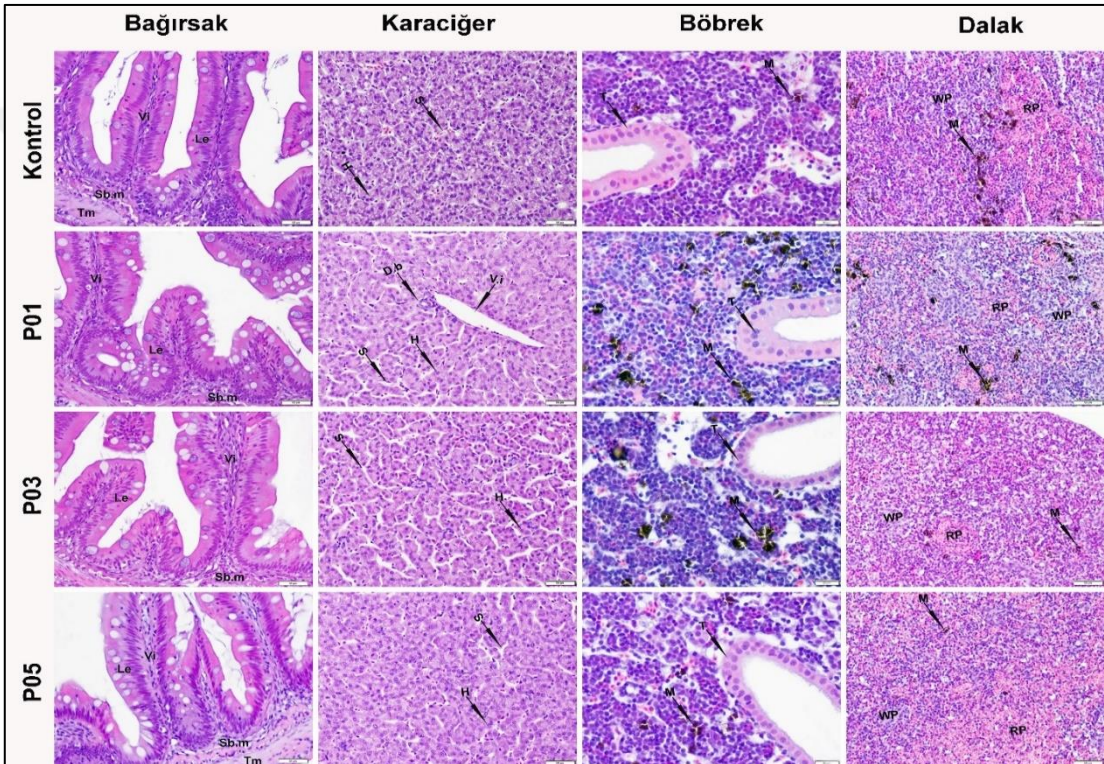
Örnekleme zamanı (Gün)	Gruplar	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)
7	K	206,67±4,15	378,09±25,78	183,45±15,53
	P01	205,68±3,86	401,65±66,10	195,85±33,52
	P03	205,73±4,22	441,57±62,47	216,04±34,21
	P05	198,43±4,78	375,10±79,44	191,23±45,71
14	K	204,22±0,50	320,15±35,57	156,85±17,82
	P01	204,07±2,46	274,18±6,84	134,45±4,65
	P03	203,04±1,85	264,56±37,33	130,44±19,00
	P05	202,52±2,52	247,48±19,54	122,33±10,40
21	K	204,73±1,84	238,24±21,69	116,24±9,89
	P01	200,27±2,98	371,83±105,51	186,96±55,62
	P03	207,60±0,40	279,75±12,55	134,77±6,28
	P05	200,78±3,90	524,66±125,19*	263,68±67,70*

Değerler ortalama $\pm$ SE olarak verilmiştir. P01: Propolis % 0,1; P03: Propolis %0,3; P05: Propolis %0,5; MCV: Ortalama Korpüsküler Hacim; MCH: Ortalama Korpüsküler Hemoglobin; MCHC: Ortalama Korpüsküler Hemoglobin Konsantrasyonu

4.2 Histopatolojik Analiz

Histopatolojik analiz Şekil 4.1'de özetlenmiştir. Yemleme denemesinin sonunda, farklı gruplardaki deney balıklarından alınan bağırsak, dalak, böbrek ve karaciğer dokuları incelenmiştir. İnce bağırsakların villus yapısı, lamina epitel bütünlüğü, lamina propria ve submukozada hücre infiltrasyonu, tunika muskularis kas yapısı ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu açısından incelenmiştir. Ayrıca karaciğer dokusu hepatositler, sinüzoidler, portal alandaki damar ve safra kanalının yapısı dikkate alınarak

incelenmiştir. Böbrek dokuları glomerüllerde, renal tübüllerde ve interstisyel hücre popülasyonu açısından incelenmiş. Bunun yanında dalak dokuları, beyaz pulpa ve kırmızı pulpadaki hücrelerin histomorfolojik yapıları, melanomafajların sayısı ve yapısı dikkate alınarak incelenmiştir. Tüm bu histopatolojik incelemelerin ve değerlendirmelerin sonunda, propolis ekstraktı ilave edilen her üç deney grubu ve kontrol grubundaki balıkların bağırsak karaciğer böbrek ve dalak dokularında patolojik histomorfolojik hiçbir değişiklik saptanmamıştır.



Şekil 4.1 Bağırsak, böbrek, dalak ve karaciğer üzerinde histopatolojik analiz

4.3 İmmunolojik Değişimler

Bu çalışmanın sonunda, spesifik olmayan bağışıklık tepkilerinden oksidatif radikal üretiminin sonucu Tablo 4.2 'de özetlenmiştir.

Tablo 4.3 Çalışmanın 7., 14. ve 21. günlerinde gökkuşuğı alabalığında gruplara göre oksidatif radikal üretimleri

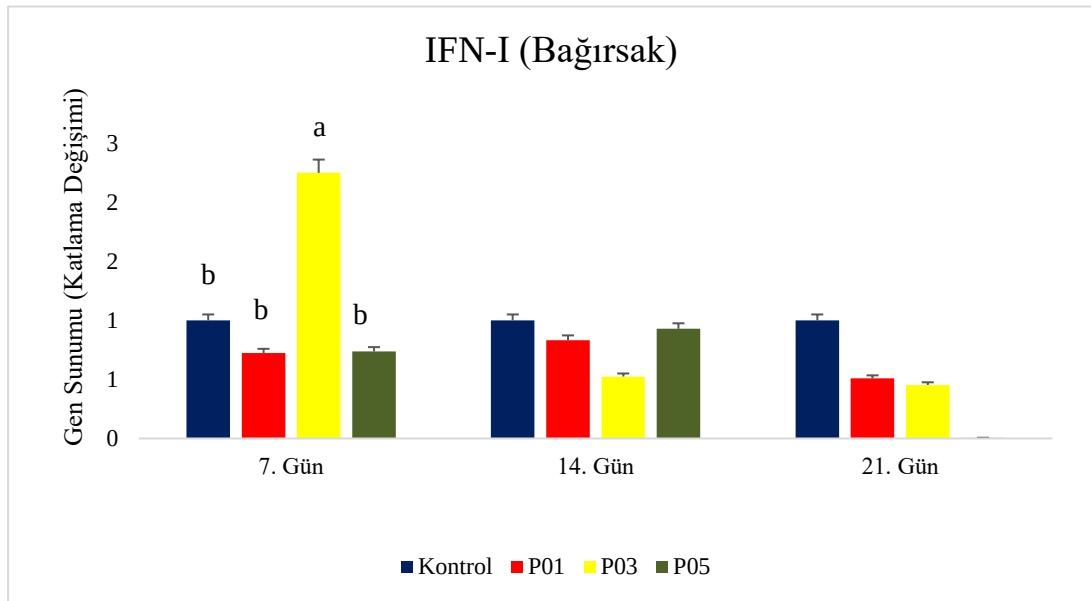
İmmün Parametre	Gruplar	Örnekleme Zamanı		
		17. gün	14. gün	21. gün
Oksidatif Radikal Üretimi (mg/ml)	Kontrol	0,64±0,06	0,71±0,10	0,78±0,19
	P01	0,80±0,06	0,68±0,18	0,67±0,09
	P03	0,74±0,07	0,67±0,15	0,66±0,21
	P05	0,40±0,23	0,98±0,11	1,09±0,04

Değerler ortalama ± SE olarak verilmiştir. Kontrol; P01; P03 ve P05, sırasıyla zeytinyağı ile özütlenmiş %0; %0,1; %0,3 ve %0,5 dozlarında propolis içeren diyetlerle beslenen balık gruplarını ifade etmektedir.

4.4 Gen Sunumları

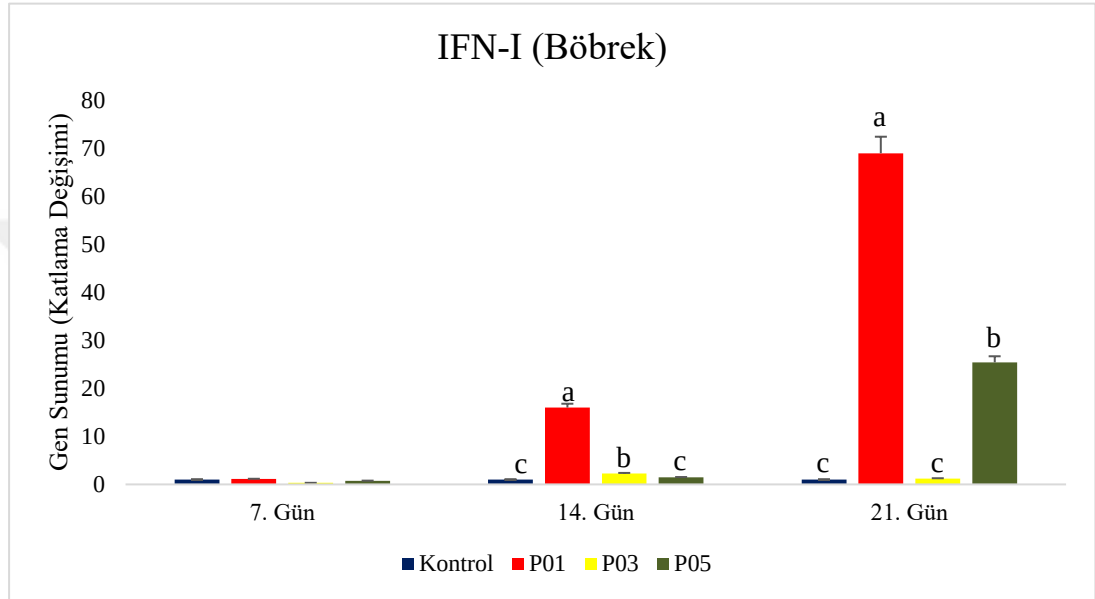
4.4.1 İnterferon-1 (IFN-I)

İlk örnekleminin sonucuna göre, bağırsakta P03 grubunda IFN-1 ekspresyonunda kontrol ve diğer gruplara göre 2,2 katlama değişimi artışı saptanmıştır (Şekil 4.2). Bununla birlikte ikinci ve son örneklemlerde, gruplar arasında önemli bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$).



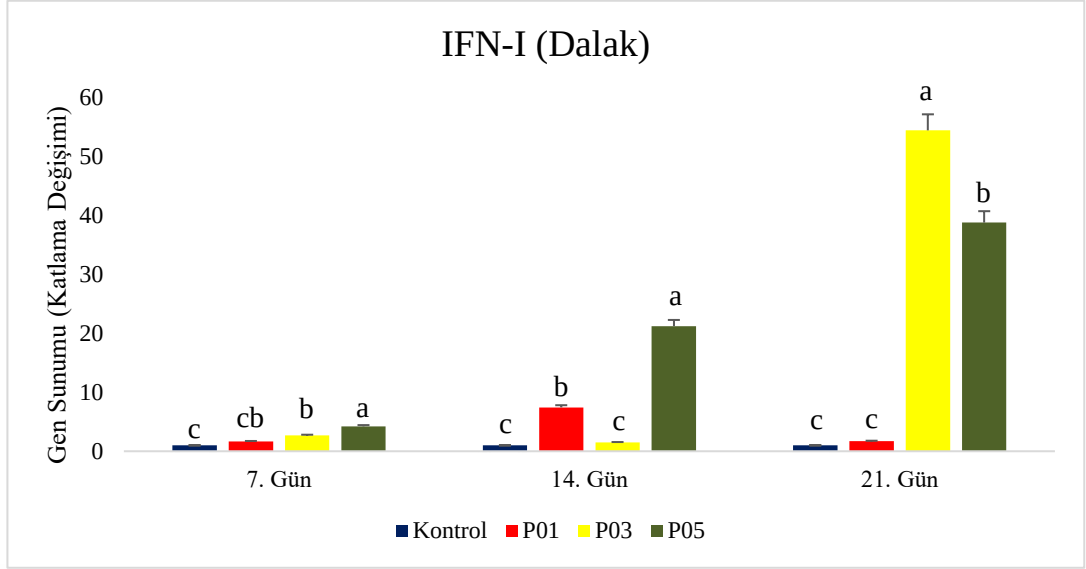
Şekil 4.2 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşuğı alabalıklarının bağırsak dokularında IFN-1 gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler

Böbrekteki gen ekspresyon değerleri karşılaştırıldığında 7. günde gruplar arasında hiçbir farklılık görülmezken ($p>0,05$); 14. günde sırasıyla P01 (16 katlama değişimi) ve P03 (2,3 katlama değişimi) gruplarında diğer gruplara göre önemli artış olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Çalışma sonunda ise P01 (68,9 katlama değişimi) ve P05 (25,4 katlama değişimi) gruplarında kontrol grubuna kıyasla bir artış gözlenmiştir.



Şekil 4.3 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşağı alabalıklarının böbrek dokularında IFN-1 gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler

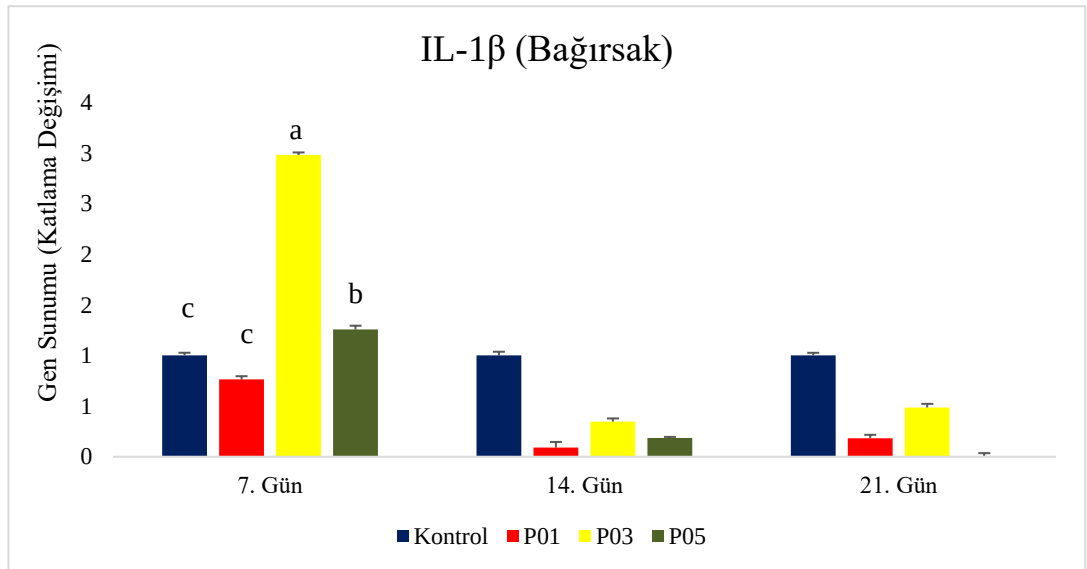
Söz konusu IFN-1 gen ekspresyon seviyesinin dalaktaki değişimleri karşılaştırıldığında 7. günde en yüksek gen sunumu P05 grubunda (4,2 katlama değişimi) ve P03 (2,7 katlama değişimi) grubunda gözlenirken P01 kontrol grubu ile benzerlik göstermiştir. 14. gün örneklemede en yüksek IFN değerleri sırasıyla P05 (21,2 katlama değişimi) ve P01 (7,4 katlama değişimi) gruplarında gözlenmiştir ($p<0,05$). Çalışma sonunda yine P03 (54,4) ve P05 (38,7) gruplarının gen sunuları kontrol grubuna kıyasla önemli derecede artmıştır. Bununla birlikte P01 grubu ile kontrol grubu arasında bir farklılık tespit edilememiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşağı alabalıklarının dalak dokularında IFN-1 gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler

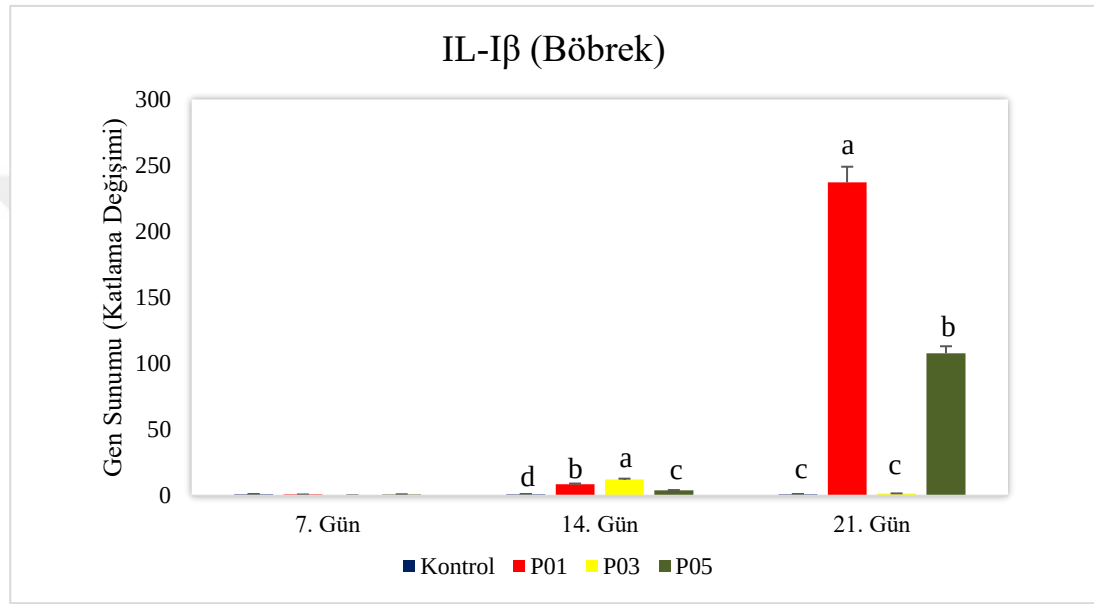
4.4.2 İnterlökin 1 Beta (IL-1 β)

%0; %0,1; %0,3 ve %0,5 oranlarında propolis içeriği ile beslenen gökkuşağı alabalıklarının bağırsak, böbrek ve dalak dokularındaki IL-1 β 'nin gen ekspresyonu değişimleri sonuçlarına göre, çalışmanın 7. gününde, P03 (2,98 katlama değişimi) ile beslenen gruplarda kontrol grubuna göre artış gözlenmiştir ($p < 0,05$). Bununla birlikte tüm diğer örnekleme zamanlarında gruplar arasında bir farklılık tespit edilememiştir ($p > 0,05$).



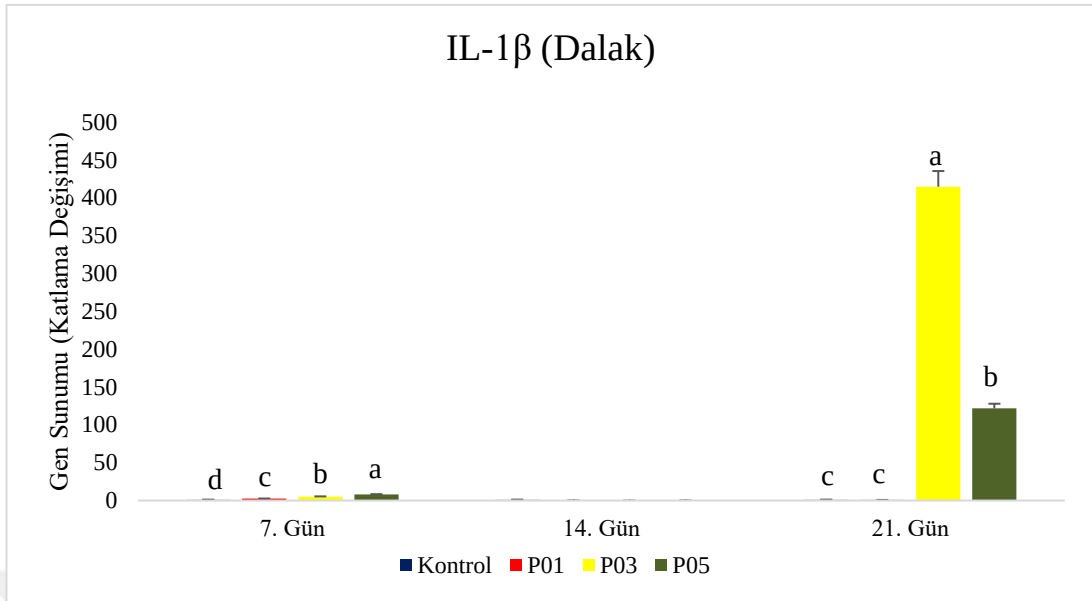
Şekil 4.5 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşağı alabalıklarının bağırsak dokularında IL-1 β gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler

IL-1 β 'nın gökkuşağı alabalıklarının böbrek dokularındaki değişimlerine bakıldığında ilk örnekleme zamanı olan 7. günde gruplar arasında fark tespit edilememişken ($p>0,05$); çalışmanın 14. gününde tüm deneme gruplarının gen sunumları kontrol grubuna kıyasla önemi derecede artış göstermiştir ($p<0,05$). En yüksek gen sunumu sırasıyla P03 (12,29), P01 (8,75) ve P05 (4,08) grupları olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşağı alabalıklarının böbrek dokularında IL-1 β gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler

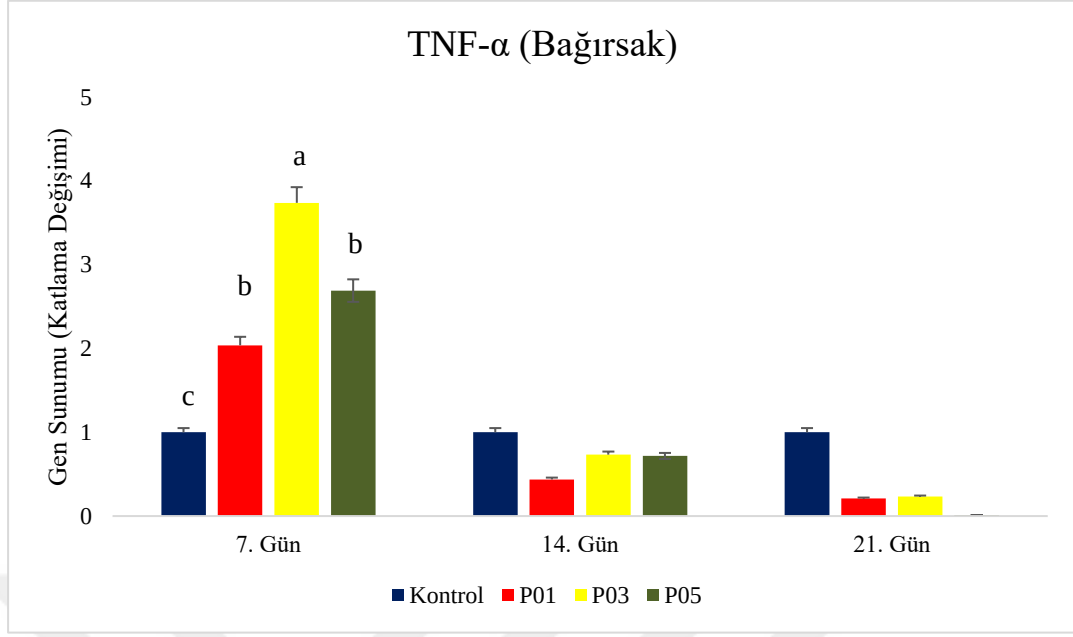
IL-1 β gen ekspresyon seviyesinin gökkuşağı alabalıklarının dalak dokularındaki seviyelerine bakıldığında, çalışmanın 7. gününde tüm grupların gen sunumları kontrol grubuna kıyasla artış göstermiştir ($p<0,05$). En yüksek gen sunumu P05 grubunda (8,1) gözlenirken bunu sırasıyla P03 (5,26) ve P01 (2,56) olmuştur. Çalışma sonunda P03 (414,7) ve P05 (212,86) grubunda gen sunumları önemli derecede artarken ($p<0,05$) bundan farklı olarak P01 ve kontrol grupları benzerlik göstermiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.7).



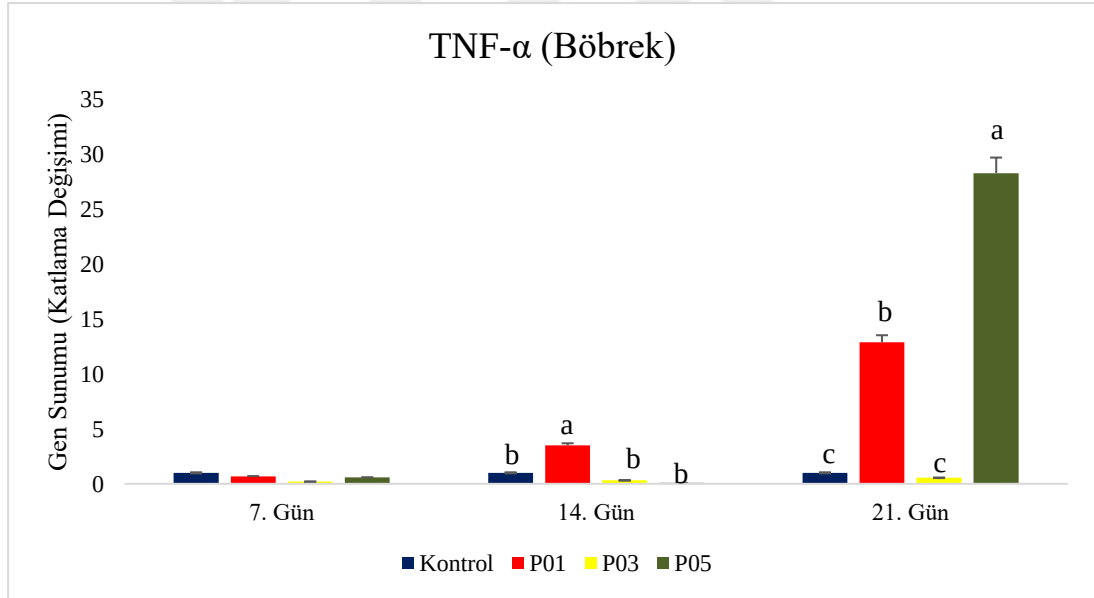
Şekil 4.7. Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşağı alabalıklarının dalak dokularında IL-1 β gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler

4.4.3 Tümör Nekroz Faktörü (TNF- α)

Gökkuşağı alabalıklarının dokularında tümör nekroz faktörü geni (TNF- α) ekspresyon değerleri diğer genlerde olduğu gibi örnekleme zamanlarına ve dozlara bağlı olarak farklılıklar göstermiştir. Fakat söz konusu bu farklılıkların tüm dokularda 14. ve 21. günlerdeki için geçerli olmadığı göze çarpmakta olup, bağırsak için tüm grupların gen sunumları kontrol grubuna kıyasla artış gösterirken ($p < 0,05$) en yüksek gen sunumu P03 grubunda (3,73) gözlenmiştir (Şekil 4.8). Bununla birlikte çalışmanın 14 ve 21. günlerinde tüm deneme gruplarının gen sunumları kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli bir artış tespit edilememiştir ($p > 0,05$).



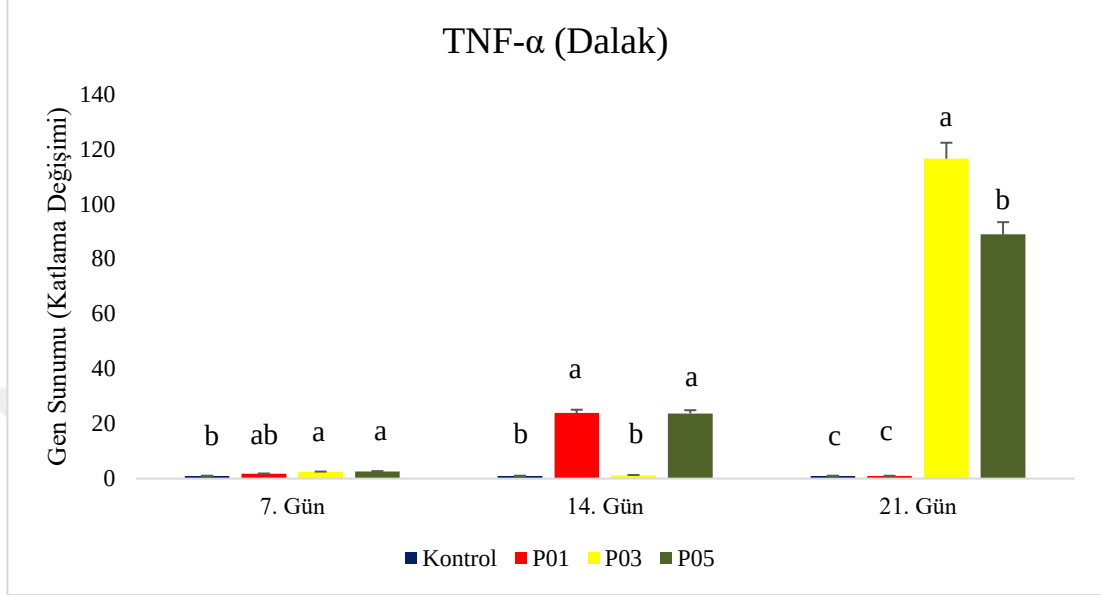
Şekil 4.8 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşağı alabalıklarının bağırsak dokularında TNF- α gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler



Şekil 4.9 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşağı alabalıklarının böbrek dokularında TNF- α gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler

TNF- α geninin böbrekteki ekspresyon seviyeleri Şekil 4.9’da verilmiştir. Buna göre çalışmanın 7. gününde deneme grupları ile kontrol grubu arasında bir farklılık tespit edilememiştir ($p>0,05$). 14. gün sonuçlarına bakıldığında ise P01 grubunun gen sunumu (3,51) önemli derecede artış göstermiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte P05 ve P03 grupları arasında bir farklılık tespit edilememiştir ($p>0,05$). Çalışma sonunda ise

P05 (28,28) ve P01 (12,88) gruplarında TNF- α sunumları kayda değer bir şekilde artış göstermiştir.

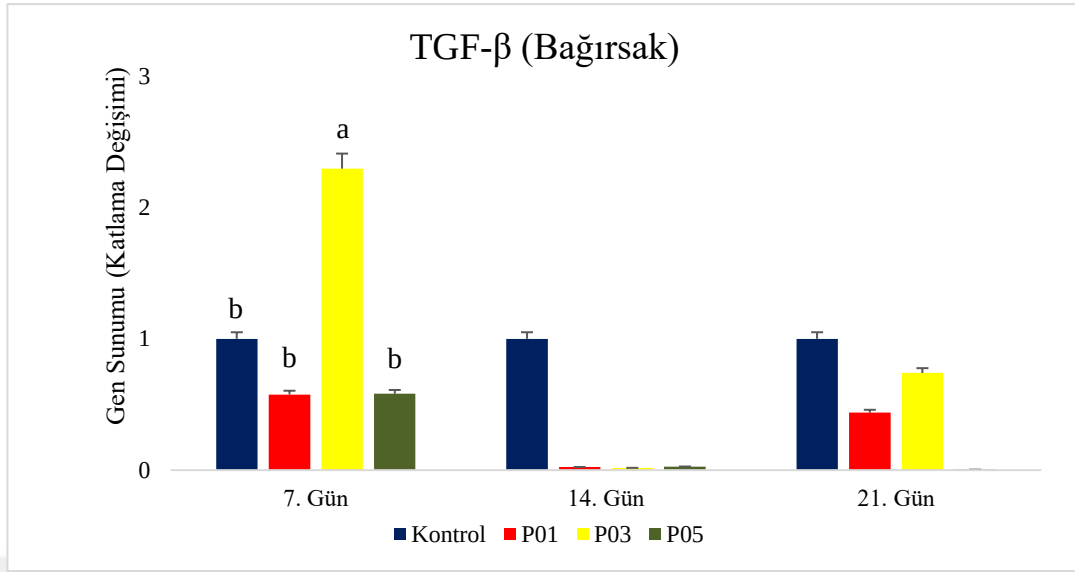


Şekil 4.10 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşağı alabalıklarının dalak dokularında TNF- α gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler

Şekil 4.10'da dalak dokularındaki TNF- α gen sunumları gösterilmiştir. Buna göre en yüksek gen sunumları çalışmanın 7. gününde P03 (2,43) ve P05 (2,59) gruplarında gözlenirken ($p<0,05$) bunlardan farklı olarak P01 ve kontrol grupları benzerlik göstermiştir ($p>0,05$). Çalışmanın 14. gününde P01 grubu (23,89) ve P05 (23,72) grupları kontrol grubuna kıyasla önemli derecede artış göstermiştir ($p<0,05$). Çalışma sonunda elde edilene verilere göre ise en yüksek gen sunumu sırasıyla P03 (116,48) ve P05 (88,94) gruplarında tespit edilirken ($p<0,05$), bundan farklı olarak P01 ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilememiştir ($p>0,05$).

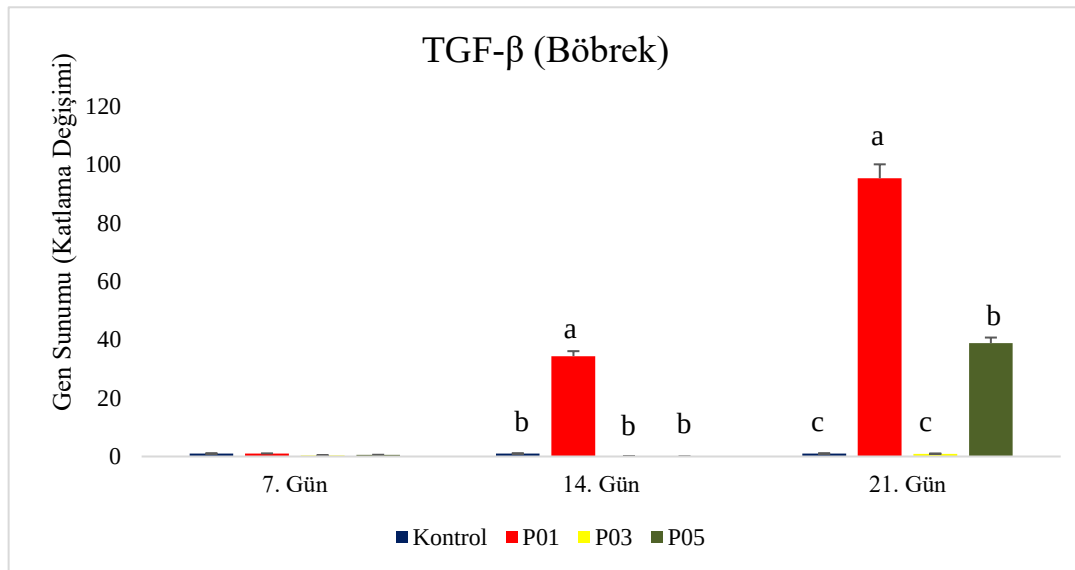
4.4.4 Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF- β)

Bağırsak örneklemelerinde TGF- β ekspresyonu açısından 7. günde P03 grubu gen sunumları diğer tüm gruplara kıyasla artış gösterirken ($p<0,05$), bundan farklı olarak P05 ve P01 grupları kontrol grubu ile bir farklılık göstermemiştir ($p>0,05$). Çalışmanın 14 ve 21. günlerinde deneme grupları ve kontrol grubu arasında bir farklılık tespit edilememiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.11).



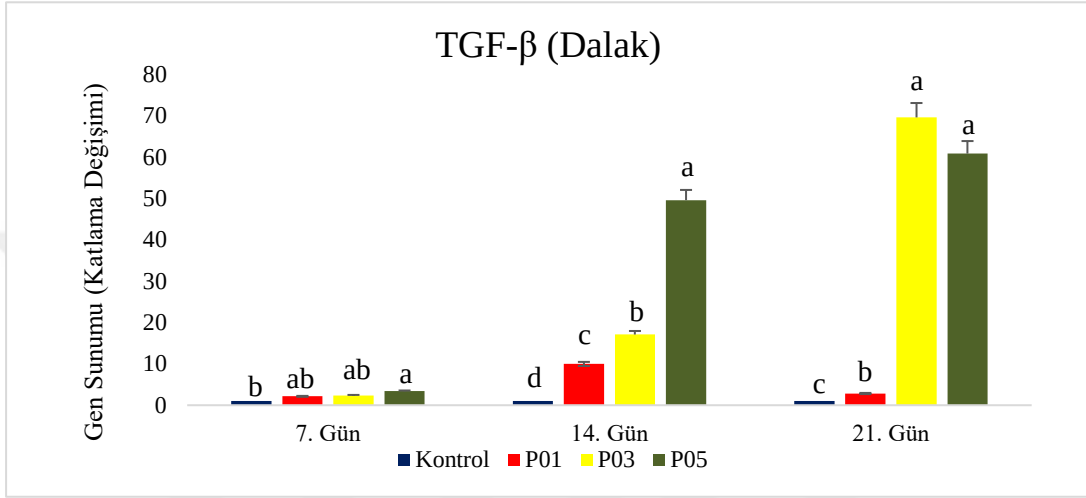
Şekil 4.11 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşağı alabalıklarının bağırsak dokularında TGF- β gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler

TGF- β gen sunumlarının böbrekte değişimleri Şekil 4,12’de ifade edilmiştir. Buna göre çalışmanın 7. gününde gruplar arasında bir farklılık tespit edilememişken, çalışmanın 14. gününde, P01 grubu gen sunumu (34,37) kontrol grubuna ve diğer deneme gruplarına kıyasla önemli derecede artış göstermiştir (Şekil 4.12). Çalışma sonunda ise en yüksek gen sunumu P01 grubunda (95,32) tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ayrıca P05 grubunda TGF- β gen sunumu P01 grubundan düşük tespit edilmişse de (38,8), P03 ve kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek değere ulaşmıştır ($p<0,05$).



Şekil 4.12 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşağı alabalıklarının böbrek dokularında TGF- β gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler

Şekil 4.13 ‘de dalak dokularındaki TGF- β gen sunumları ifade edilmiştir. Buna göre tüm deneme gruplarının gen sunumları; çalışmanın 7. gününde kontrol grubuna kıyasla artış göstermiştir. Çalışmanın 14. gününde ise tüm deney gruplarının gen sunumları kontrol grubuna kıyasla önemli derecede artış gösterirken en yüksek seviyelerine sırasıyla P05 (49,55), P03 (17,08) ve P01 (9,97) gruplarında ulaşmıştır.

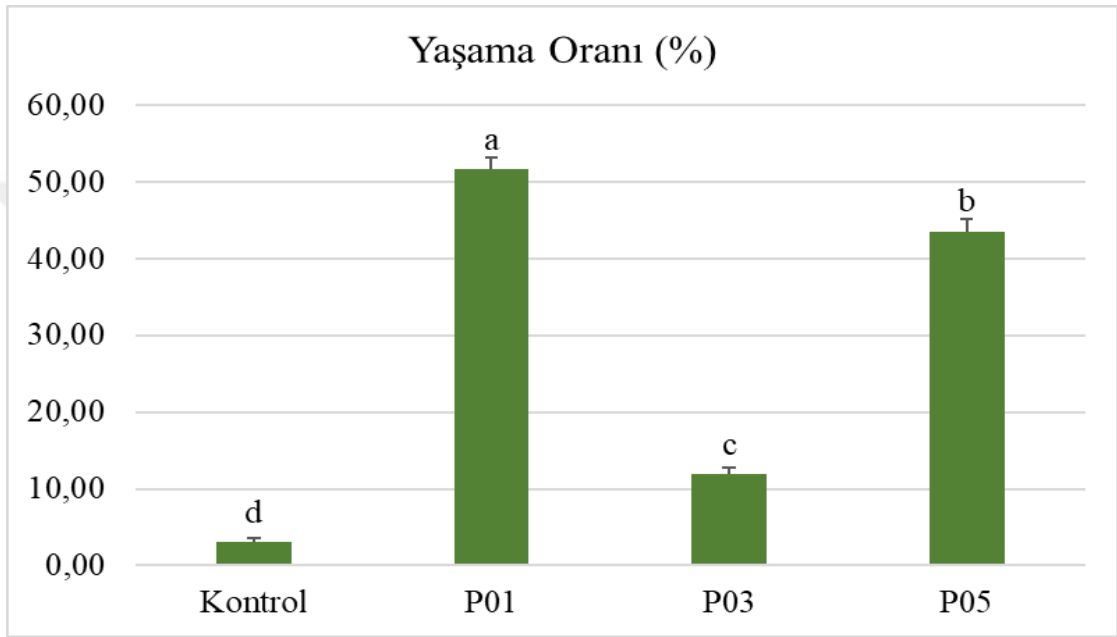


Şekil 4.13 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin gökkuşağı alabalıklarının dalak dokularında TGF- β gen ekspresyonunda meydana getirdiği değişimler

Çalışmanın sonunda ise çalışmanın 14. gününde benzer şekilde tüm grupların gen sunumları kontrol grubuna kıyasla artış gösterirken bu artış sırasıyla en yüksek P03 (69,55), P05 (60,8) ve P01 (2,83) gruplarında tespit edilmiştir.

4.4.5 Kontrol Testi

Şekil 4.14 'te belirtildiği üzere, *Yersinia ruckeri* ile enfekte edilen gökkuşuğu alabalığında yapılan kontrol testleri sonucunda tüm grupların yaşama oranlarının kontrol grubuna kıyasla artış gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,05$). Sonuç olarak en iyi etkinliğin P01 grubunda olduğu görülmüştür ($p<0,05$).



Şekil 4.14 Zeytinyağı ile özütlenen propolis takviyesinin *Yersinia ruckeri* bakterisi ile enfekte edilen gökkuşuğu alabalıklarının yaşama oranlarına etkileri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalık salgınına çözüm bulmak dünyada popüler bir akım olmuştur. Birçok çalışma, doğal ürünlerin türevlerinin bağışıklık tepkisinde ve istilacı patojene karşı mücadelede olumlu bir sonuç gösterdiğini ortaya koymuştur (Dawood vd., 2018; Elumalai vd., 2020; Stratev vd., 2018; Zhang vd., 2022; Zhu, 2020). Meyveler, sebzeler ve kepekli tahıllar gibi bitkiler biyoaktif bileşikler içerir (Cömert vd., 2020). Şu anda, çeşitli sağlık ve hastalık durumlarında çeşitli aktif bileşiklerin faydasını gösteren giderek artan miktarda bilimsel kanıt bulunmaktadır (Ortega ve Campos, 2019). Bununla birlikte, bitkilerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, çeşitlerine, çevresel koşullara, iklimsel ve mevsimsel değişikliklere, coğrafi büyüme bölgelerine, olgunluk derecesine, yetiştirme uygulamalarına ve diğer birçok faktöre bağlıdır (Grandison, 2006; Pandey ve Savita, 2017). Çalışmada gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) zeytinyağı ile ekstrakte edilen propolisin bağışıklık uyarıcı etkisi araştırılmıştır. Çalışma periyodunda 7., 14. ve 21. günde kan parametreleri, humoral immün analiz, sitokin gen ekspresyonu ve histopatolojik analizleri incelemek için örneklemeler yapılmıştır.

Kan, tüm vücut hücrelerinde oksijen ve besin tedarikini sağlayan dolaşımdaki sıvıdır. Hematolojik indeksler, tanımlanmış çevresel koşullar ve tedaviler altında endokrin, immünolojik, üreme ve genetik fonksiyonların entegre bir yansımaları sağlayabilir (Seibel vd., 2021). Kısacası, kan parametreleri ve türevleri, çeşitli çevresel streslere, bakteriyel enfeksiyona ve kimyasal toksisiteye maruz kaldıktan sonra balıkların sağlık durumunu değerlendirmek için göstergeler olabilir (Houston, 1997). Bu nedenle, toksik maddelere maruziyet balık kanının fizyolojisini etkileyebilir (Kim vd. 2021; Xu vd. 2021). Bu çalışmada propolisin sadece 21. gün RBC, HCT, MCH ve MCHC değerlerinde farklılığa sebebiyet verdiği; bu farklılığın RBC ve HCT için kontrol grubunda, HGB, MCH ve MCHC değerleri için ise P05 grubunda diğer gruplara göre yüksek seviyede olduğu sonucuna varılmıştır. Selamoglu vd. (2012), çalışmalarında propolis uyguladıkları sazanlarda eritrosit, hemoglobin, hematokrit düzeylerinde artış fakat MCV, MCH, MCHC düzeylerinde ise azalma saptamışlardır. Alishahi vd.

(2018), propolis denedikleri sazanlarda hematolojik indekslerin önemli ölçüde etkilenmediği sonucuna varmışlardır.

Makromasitik anemi, yetersiz hemoglobin dağılımının olduğu ve eritrositlerin normal hacimden daha büyük olduğu bir kan durumudur (Clauss vd., 2008). Bu çalışmada %0,5 propoliste MCH ve MCHC düzeyindeki artışın makrositik anemiden kaynaklandığı düşünülmüştür. Çalışmamızın aksine Salem vd. (2022), beyaz hardal yağının gökkuşığı alabalıklarında 21. günde RBC değerlerinde gruplar arasında farklılık yaratmadığını ($p<0,05$), fakat %1 oranında ilavenin ise HGB, HCT MCH ve MCHC değerlerinin kontrole göre yükselttiğini ($p>0,05$) belirtmişlerdir. Faklı olarak Fadeifard vd. (2018) ise, gökkuşığı alabalığında yem katkı maddesi olarak denenen çörek otu (*Nigella sativa*), zencefil (*Zingiber officinale*) ve koni çiçeği (*Echinacea angustifolia*) bitkilerinin, balıkların hematolojik parametreleri üzerinde önemli bir etki yaratmadığını tespit etmişlerdir.

Gökkuşığı alabalığına propolis ekstraktı ile beslenme sonunda balık dokuları (bağırsak, karaciğer, böbrek ve dalak) histolojik analize tabi tutulmuştur. Histopatoloji, canlı dokuların normal durumundaki değişiklikleri ve potansiyel olarak çıplak gözle tespit edilemeyen etken maddeleri tanımlamaktadır (Costa, 2018). Bu çalışmada hematolojik sonuçlar histopatoloji ile benzerlik göstermektedir. Bağırsak, karaciğer, böbrek ve dalağın histopatoloji analizi, tüm örnekleme periyotlarında tüm tedavilerde önemli bir farklılık göstermemiştir. Bu çalışmaya benzer şekilde, Dotta vd. (2018), nil tilapyasında propolis uygulamasının histopatolojik analizde gözle görülür herhangi bir değişiklik göstermediğini belirtmişlerdir. Mu vd. (2022), çalışmalarında propolis uygulamasının, *E. piscicida* tehdidinin neden olduğu bağırsak mikrovillus kırılmasını iyileştirdiği ve bağırsak mikrovillusinin kontrol grubuna göre daha sağlam ve kalın olduğu ortaya koymuşlardır.

Balığın doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bir göstergesi olan solunum patlaması aktivitesi oksidasyon derecesindeki artış olup solunum patlaması işlemi sırasında, fagositler toksik oksijen üretmektedirler (Harikrishnan vd., 2011). Bu çalışmada tüm deney gruplarında oksidatif radikal üretimi hiçbir grupta değişim göstermemiştir ($p>0,05$). Bulgularımıza benzer şekilde, Cuesta vd. (2005), propolis

denedikleri çipura balıklarında, solunum patlaması aktivitesi sırasında herhangi bir grupta oksidatif radikal üretim seviyelerinin önemli ölçüde değişmediğini belirtmişlerdir.

Enflamasyon, doğuştan gelen bir bağışıklık tepkisi ile karakterize edilir ve epitel bariyeri herhangi bir enfeksiyon tarafından geçildiğinde ortaya çıkar (Secombes vd., 2001). Bu nedenle, doğuştan gelen adaptif yanıt, hastalıklara karşı ilk koruma hattıdır. Sitokinler, inflamatuvar olayları başlatmaktan ve düzenlemekten sorumludur (Kelso, 1998; Nathan ve Sporn, 1991; Oppenheim, 2001; Zhang ve An, 2007). İnterferon, hücrel bağışıklığın aktivasyonunda ve bağışıklık tepkisinin uyarılmasında önemli bir rol oynar (Jorgovanovic vd., 2020; Zou ve Secombes, 2011). IFN-1, makrofajları, hücre içi bakterileri öldürmek için reaktif oksijen ara ürünleri ve reaktif nitrojen ara ürünleri gibi toksik ajanlar üretmeye yönlendirir ve bir dizi konakçı antiviral proteinin sentezini indükleyerek antiviral aktiviteler uygular (McNab vd., 2015). Bu çalışmada IFN geninin, bağırsakta sadece 7. günde P03 'te diğer gruplara göre artışı söz konusu iken, 14. ve 21. günlerde böbrekte P01 grubunda; dalakta ise P05 grubunda güne bağlı olarak artan bir gen ekspresyon değeri söz konusudur. Tetra'nın (*Cotinus coggygia*) sulu metanolik ekstraktlarının uygulanmasında da benzer sonuçlar rapor edilmiştir (Bilen ve Elbeshti, 2019). Ayrıca gökkuşağı alabalığında *Astragalus caudiculatus* (Sönmez vd., 2022) ve sakal likeni (*Usnea barbata*) (Bilen vd., 2019) sulu metanolik ekstraktlarının uygulanmasında da benzer sonuçlar bulunduğu rapor edilmiştir.

Gökkuşağı alabalığında bulunan ilk sitokin geni IL-1β'dir (Zhou vd., 1999). IL-1β, humoral immün yanıtın etkili bir aktivatörüdür (Nakae vd., 2001). Bu gen, monosit aktivasyonunda ve periferik dokularda proinflamatuvar sinyal yollarının aktivasyonunda yer alan ana sitokin genidir (Hwang, 2013). Propolisin, B ve T hücrelerini aktive edebilen IL-1 gibi sitokinlerin üretimini uyarma yeteneğine sahip olduğu belirtilmiştir (Wolska vd., 2019). Mevcut çalışmada propolis uygulanmış balıklarda, IL-1β 'nın IFN 'ye benzer şekilde sadece 7. günde bağırsakta yukarı regüle olduğu, 21. günde ise böbrekte P01, P05 ve dalakta P03, P05 gruplarında diğer gruplara göre önemli derecede ekspresyon değerlerinin arttığı tespit edilmiştir (p<0,05). Mu vd., 2022 kalkan balığı diyetine propolis eklenmesinin bizim bulgumuza benzer şekilde böbrek ve dalakta IL-1β ekspresyonunu artırdığını tespit etmişlerdir.

Bu çalışmaya benzer şekilde, limon mineçiçeği (*Aloysia citrodora*) (Hoseinifar vd., 2020a), Yunan ardıç ekstresi (Bilen vd., 2021b), çörek otu ekstresi (Altunoglu vd. 2017), *Ginkgo biloba* (Hajirezaee vd., 2019) ve *Gracilariopsis persica*, *Hypnea flagelliformis* ve *Sargassum boveanum* dahil deniz yosunları (Vazirzadeh vd., 2020) çalışmalarında bitkisel takviyelerin olumlu sonuçları ele alınmıştır.

Tümör nekroz alfa (TNF- α) doğal olarak monositler ve aktive makrofajlar tarafından oluşturulur, normal ve malign hücreler üzerinde pleiotropik etkiler gösterir (Aronson, 2015). Bu sitokin geni, bağışıklık hücrelerinde iltihaplanma sürecinde ve düzenlenmesinde rol oynar (Krakauer vd., 1999; Salomon vd., 2018). Bu çalışmada TNF ekspresyonu, diğer çalışılan genlerle tutarlı sonuçlar sergilemektedir. Özellikle 7. günde bağırsakta yukarı regüle olan P03 grubu en yüksek artışı göstermiş ($p<0,05$) 14. ve 21. günlerde ise böbrek dokuda P01; dalakta ise P05 gruplarında kontrole göre önemli artışlar göze çarpmıştır ($p<0,05$). Mu vd. (2022), kalkan diyetine propolis ilavesinin TNF- α ifadesini arttırdığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, Reboucas-Silva vd. (2017), çalışmasında kuru propolis özünün, enflamatuar profili önemli ölçüde değiştirdiğini ve TNF- α 'yı yukarı regüle ettiğini belirtmişlerdir. Öte yandan ısırgan otu (*Urtica dioica*) (Mehrabi vd., 2020), kapari (*Capparis spinosa*) (Bilen vd., 2016) ve nane (*Mentha longifolia*) (Heydari vd., 2020) çalışmalarında da benzer sonuçlar elde edildiği rapor edilmiştir. Bu sonuçların tersine Hafsan vd. (2022), balıkların 0,2 ve 0,25 mg DKE/kg ile desteklenmesi sonucunda TNF- α ve IL-8 gen ekspresyon değerlerinin azaldığını belirtmişlerdir.

Dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β), gelişim ve karsinogenez sırasında çok sayıda fizyolojik ve patolojik süreci kontrol eden bir sitokindir (Chaudhury ve Howe, 2009). Bu sitokin ayrıca hücredeki reseptörlerin ve sinyal proteinlerinin ekspresyonuna aracılık eder (Chen ve Wahl, 2002). Bu çalışmanın 14. ve 21. günlerinde, IFN ve TNF genlerine benzer şekilde böbrekte P01; dalakta ise P03 ve P05 gruplarında gen ifadelerinin artışı söz konusudur ($p<0,05$). Ayrıca 14. ve 21. günlerdeki örneklemelerde gökkuşağı alabalığı diyetine %0,3 ve %0,5 oranlarında ilave edilen propolisin, dalakta çok ciddi bir gen ekspresyonu katlama değeri oluşturması göze çarpmaktadır ($p<0,05$). Önceki çalışmalardan çörek otu (*Nigella sativa*) (Altunoglu vd., 2017), limon mineçiçeği (*Aloysia citrodora*) (Hoseinifar vd.,

2020a) ve defne yaprağı cistus (*Cistus laurifolius*) (Bilen vd., 2021a) gökkuşaağı alabalığında TGF- β 'yi yukarı regüle etmiştir. Buna karşın; 2,5 ve 5 g kg⁻¹ dozunda zeytin atığı uygulamasından sonra gökkuşaağı alabalığında da aşağı regüle olduğu rapor edilmiştir (Hoseinifar vd., 2020b). Bu araştırmada çalışılan tüm gen ekspresyon değerlerine bakıldığında; yeme %0,1 ve %0,5 propolis ilavesinin gökkuşaağı alabalığı böbrek dokusunda bağışıklıktan sorumlu genleri diğey deney gruplarına göre önemli derecede aktive ettiğı (p<0,05); bağırsakta ise 14. ve 21. günlerde gruplar arasında önemli değışimlerin olmadığı (p>0,05) görölmüştür. Dalakta ise söz konusu genlerin ekspresyon düzeylerinin P03 ve P05 gruplarında, diğey gruplara göre daha fazla artış gösterdiği (p<0,05) sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada, balıklara *Yersinia ruckeri* bakterisi enjekte edilmiş ve 10 gün boyunca hayatta kalma oranları gözlemlenmiştir. Çalışmanın sonunda, kontrol ile karşılaştırıldığında en yüksek hayatta kalma oranı P01'de meydana gelmiştir (p<0,05). Yonar (2008), gökkuşaağı alabalığı yemine etanolik propolis ekstraktı uygulanmasının, bizim bulgularımıza benzer şekilde, *Y. ruckeri*'ye karşı hayatta kalma oranını arttırdığını doğrulamıştır. Bu çalışmanın sonucuna benzer şekilde bitki ekstraktlarının uygulanması, *Polygonum minus* özleri (Adel vd., 2020), at nanesi (*Mentha longifolia*), hidroalkolik özü (Heydari vd., 2020) ve zeytin yaprağı (*Olea europea* L.) (Baba vd., 2018) ekstraktının gökkuşaağı alabalığında *Y. ruckeri*'ye karşı dirençte artış sağladıkları rapor edilmiştir.

Bu çalışma sonucunda zeytinyağı ile özütlenen propolisin, gökkuşaağı alabalığı için bir bağışıklık güçlendirici yem takviyesi olarak kullanılabileceğı sonucuna varılmıştır. Ayrıca kan parametrelerinde ve histopatolojik incelemelerde herhangi bir değışiklik olmadığı, propolisin bağışıklıktan sorumlu genlerin stimölasyonunu arttırdığı ve *Y. ruckeri* enfeksiyonuna karşı koruma sağlayarak hayatta kalma oranını arttırdığı sonucuna varılmıştır. Çalışma sonucunda, zeytinyağı ile ekstrakte edilen propolisin gökkuşaağı alabalığı diyetleri için uygun olduğu ve bağışıklığı güçlendirdiğı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abbass, A. A., El-Asely, A. M., & Kandiel, 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(4), 851-859.
- Abbass, A., Sharifuzzaman, S. M., & Austin, B. (2010). Cellular components of probiotics control *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish diseases*, 33(1), 31-37.
- Abd-El-Rhman, A. M. (2009). Antagonism of *Aeromonas hydrophila* by propolis and its effect on the performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & shellfish immunology*, 27(3), 454-459.
- Acar, Ü., Parrino, V., Kesbiç, O. S., Lo Paro, G., Saoca, C., Abbate, F., Fazio, F. (2018). Effects of different levels of pomegranate seed oil on some blood parameters and disease resistance against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout. *Frontiers in Physiology*, 9, 596.
- Adams, A. (2019). Progress, challenges and opportunities in fish vaccine development. *Fish & shellfish immunology*, 90, 210-214.
- Adel, M., Dawood, M. A., Shafiei, S., Sakhaie, F., & Shekarabi, S. P. H. (2020). Dietary Polygonum minus extract ameliorated the growth performance, humoral immune parameters, immune-related gene expression and resistance against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 519, 734738.
- Aflakian, F., Nikoueian, H., Salimizand, H., Rad, M., & Zomorodi, A. R. (2022). Heterogeneity of *Yersinia ruckeri* Isolated from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Infected with Enteric Red Mouth Disease. *World*, 12(1), 19-27.
- Ahangari, Z., Naseri, M., & Vatandoost, F. (2018). Propolis: Chemical “composition and its applications in endodontics. *Iranian endodontic journal*, 13(3), 285.
- Alam, M. A., Nadirah, T. A., Mohsin, G. M., Saleh, M., Moneruzzaman, K. M., Aslani, F., & Alam, M. Z. (2021). Antioxidant compounds, antioxidant activities, and mineral contents among underutilized vegetables. *International Journal of Vegetable Science*, 27(2), 157-166.
- Altunoglu, Y. C., Bilen, S., Ulu, F., & Biswas, G. (2017). Immune responses to methanolic extract of black cumin (*Nigella sativa*) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & shellfish immunology*, 67, 103-109.

- Amiri Resketi, M., Yeganeh, S., & Jani Khalili, K. (2021). Dietary sour lemon (*Citrus limon*) peel essential oil supplementation for reduction of deltamethrin-induced stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of the World Aquaculture Society*, 52(1), 105-123.
- Aronson, J. K. (2015). Meyler's side effects of drugs: the international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions: *Elsevier*.
- Arslan, G., Sönmez, A. Y., & Yan? k, T. (2018). Effects of grape *Vitis vinifera* seed oil supplementation on growth, survival, fatty acid profiles, antioxidant contents and blood parameters in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Research*, 49(6), 2256-2266.
- Awad, E., & Awaad, A. (2017). Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish & shellfish immunology*, 67, 40-54.
- Awad, E., 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.
- Baba, E., Acar, Ü., Yılmaz, S., Zemheri, F., & Ergün, S. (2018). Dietary olive leaf (*Olea europea L.*) extract alters some immune gene expression levels and disease resistance to *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & shellfish immunology*, 79, 28-33.
- Bababaalian Amiri, A., Azari Takami, G., Afsharnasab, M., & Zargar, A. (2020). Effects of commercial herbal oil mixture on some hematological, biochemical and immunological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and its preventive efficacy against *Yersinia ruckeri* infection. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19(3), 1304-1318.
- Bae, J. Y., Park, G. H., Lee, J. Y., Okorie, O. E., & Bai, S. C. (2012). Effects of dietary propolis supplementation on growth performance, immune responses, disease resistance and body composition of juvenile eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture International*, 20(3), 513-523.
- Bankova, V. S., de Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.
- Bankova, V., Dyulgerov, A., Popov, S., Evstatieva, L., Kuleva, L., Pureb, O., & Zamjansan, Z. (1992). Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. *Apidologie*, 23(1), 79-85.
- Bankova, V., Trusheva, B., & Popova, M. (2021). Propolis extraction methods: A review. *Journal of Apicultural Research*, 60(5), 734-743.

- Barnes, A. C. (2011). 13 Enteric Redmouth Disease (ERM)(*Yersinia ruckeri*). *Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*, 484.
- Bilen, S., & Elbeshti, H. T. A. G. (2019). A new potential therapeutic remedy against *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using tetra, *Cotinus coggygia*. *Journal of fish diseases*, 42(10), 1369-1381.
- Bilen, S., Ali, G. A. M., Amhamed, I. D., & Almabrok, A. A. (2021a). Modulatory effects of laurel-leaf cistus (*Cistus laurifolius*) ethanolic extract on innate immune responses and disease resistance in common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish & shellfish immunology*, 116, 98-106.
- Bilen, S., Altunoglu, Y. C., Ulu, F., & Biswas, G. (2016). Innate immune and growth promoting responses to caper (*Capparis spinosa*) extract in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & shellfish immunology*, 57, 206-212.
- Bilen, S., Ispir, S., Kenanoglu, O. N., Taştan, Y., Güney, K., & Terzi, E. (2021b). Effects of Greek juniper (*Juniperus excelsa*) extract on immune responses and disease resistance against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fish Diseases*, 44(6), 729-738.
- Bilen, S., Sirtiyah, A. M. A., & Terzi, E. (2019). Therapeutic effects of beard lichen, *Usnea barbata* extract against *Lactococcus garvieae* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & shellfish immunology*, 87, 401-409.
- Blaxhall, P., & Daisley, K. (1973). Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of fish biology*, 5(6), 771-781.
- Boskou, D. (2006). Olive oil: chemistry and technology: AOCS Publishing.
- Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M. (2006). Olive oil composition Olive oil (pp. 41-72): Elsevier.
- Boy, H. I. A., Rutilla, A. J. H., Santos, K. A., Ty, A. M. T., Alicia, I. Y., Mahboob, T., Nissapatorn, V. (2018). Recommended medicinal plants as source of natural products: a review. *Digital Chinese Medicine*, 1(2), 131-142.
- Bricknell, I., & Dalmo, R. A. (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & shellfish immunology*, 19(5), 457-472.
- Brunt, J., Newaj-Fyzul, A., & Austin, B. (2007). The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 30(10), 573-579.
- Bullock, G. L. (1990). Enteric redmouth disease of salmonids (Vol. 82). US Department of the Interior, *Fish and Wildlife Service*.

- Burdock, G. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical toxicology*, 36(4), 347-363.
- Busch, R. (1978). Enteric redmouth disease. *Mar. Fish. Rev*, 40, 42-51.
- Capkin, E., & Altinok, I. (2009). Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease. *Journal of applied microbiology*, 106(4), 1147-1153.
- Castaldo, S., & Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, S1-S6.
- Chaudhury, A., & Howe, P. H. (2009). The tale of transforming growth factor-beta (TGF β) signaling: A soigné enigma. *IUBMB life*, 61(10), 929-939.
- Chen, W., & Wahl, S. M. (2002). TGF-b: receptors, signaling pathways and autoimmunity. *Curr. Dir. Autoimmun*, 5, 62-91.
- Cirasino, L., Pisati, A., & Fasani, F. (1987). Contact dermatitis from propolis. *Contact dermatitis*, 16(2), 110-111.
- Clauss, T. M., Dove, A. D., & Arnold, J. E. (2008). Hematologic disorders of fish. *Veterinary clinics of North America: Exotic animal practice*, 11(3), 445-462.
- Cömert, E. D., Mogol, B. A., & Gökmen, V. (2020). Relationship between color and antioxidant capacity of fruits and vegetables. *Current Research in Food Science*, 2, 1-10.
- Cortés, Y., Hormazábal, E., Leal, H., Urzúa, A., Mutis, A., Parra, L., & Quiroz, A. (2014). Novel antimicrobial activity of a dichloromethane extract obtained from red seaweed *Ceramium rubrum* (Hudson)(Rhodophyta: Florideophyceae) against *Yersinia ruckeri* and *Saprolegnia parasitica*, agents that cause diseases in salmonids. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(3), 126-131.
- Costa, P. (2017). The handbook of histopathological practices in aquatic environments: *Guide to histology for environmental toxicology*. Academic Press.
- Cuesta, A., Rodríguez, A., Esteban, M. A., & Meseguer, J. (2005). In vivo effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 18(1), 71-80.
- Dacie, J. V. (2006). Dacie and Lewis practical haematology: *Elsevier Health Sciences*.
- Dar, R. A., Shahnawaz, M., & Qazi, P. H. (2017). General overview of medicinal plants: A review. *The Journal of Phytopharmacology*, 6(6), 349-351.

- Dawood, M. A., Koshio, S., & Esteban, M. Á. (2018). Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 10(4), 950-974.
- De Almeida, E., & Menezes, H. (2002). Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 8, 191-212.
- De Grandis S.A. & Stevenson R.M.W. (1985) Antimicrobial susceptibility patterns and R plasmid-mediated resistance of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 27, 938–942.
- Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W., & Bossier, P. (2007). Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in biotechnology*, 25(10), 472-479.
- Dell, B., & McComb, A. (1979). Plant resins—their formation, secretion and possible functions *Advances in botanical research* (Vol. 6, pp. 277-316): Elsevier.
- Deng, J., An, Q., Bi, B., Wang, Q., Kong, L., Tao, L., & Zhang, X. (2011). Effect of ethanolic extract of propolis on growth performance and plasma biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 37(4), 959-967.
- Dhar, U., Rawal, R. S., & Upreti, J. (2000). Setting priorities for conservation of medicinal plants—a case study in the Indian Himalaya. *Biological conservation*, 95(1), 57-65.
- Diler, O., Gormez, O., Diler, I., & Metin, S. (2017). Effect of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil on growth, lysozyme and antioxidant activity and resistance against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Nutrition*, 23(4), 844-851.
- Dimkić, I., Ristivojević, P., Janakiev, T., Berić, T., Trifković, J., Milojković-Opsenica, D., & Stanković, S. (2016). Phenolic profiles and antimicrobial activity of various plant resins as potential botanical sources of Serbian propolis. *Industrial Crops and Products*, 94, 856-871.
- Dotta, G., de 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(2), 280-284.
- Dotta, G., Ledic-Neto, J., Gonçalves, E. L. T., Brum, A., Maraschin, M., & Martins, M. L. (2015). Acute inflammation and hematological response in Nile tilapia fed supplemented diet with natural extracts of propolis and *Aloe barbadensis*. *Brazilian Journal of Biology*, 75, 491-496.

- Drescher, N., Klein, A.-M., Schmitt, T., & Leonhardt, S. D. (2019). A clue on bee glue: New insight into the sources and factors driving resin intake in honeybees (*Apis mellifera*). *PLoS One*, 14(2), e0210594.
- Ellis, A. E. (1988). Current aspects of fish vaccination. *Diseases of Aquatic Organisms*, 4(2), 159-164.
- Elumalai, P., Kurian, A., Lakshmi, S., Faggio, C., Esteban, M. A., & Ringø, E. (2020). Herbal immunomodulators in aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 29(1), 33-57.
- Ewing, W. H., Ross, A. J., Brenner, D. J., & Fanning, G. R. (1978). *Yersinia ruckeri* sp. nov., the redmouth (RM) bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 28(1), 37-44.
- Fadeifard, F., Raissy, M., Jafarian, M., Boroujeni, H. R., Rahimi, M., & Faghani, M. (2018). Effects of black seed (*Nigella sativa*), ginger (*Zingiber officinale*) and cone flower (*Echinacea angustifolia*) on the immune system of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 70, 199-204.
- FAO. 2022. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation*. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Farsani, M. N., Hoseinifar, S. H., Rashidian, G., Farsani, H. G., Ashouri, G., & Van Doan, H. (2019). Dietary effects of *Coriandrum sativum* extract on growth performance, physiological and innate immune responses and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Yersinia ruckeri*. *Fish & shellfish immunology*, 91, 233-240.
- Farsani, M. N., Hoseinifar, S. H., Rashidian, G., Farsani, H. G., Ashouri, G., & Van Doan, H. (2019). Dietary effects of *Coriandrum sativum* extract on growth performance, physiological and innate immune responses and resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against *Yersinia ruckeri*. *Fish & shellfish immunology*, 91, 233-240.
- Funari, C. S., Carneiro, R. L., Creese, M. E., Leme, G. M., Cavaleiro, A. J., & Hilder, E. F. (2016). On Track for a Truly Green Propolis. Fingerprinting Propolis Samples from Seven Countries by Means of a Fully Green Approach. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(12), 7110-7117.
- Furones, M. D., Rodgers, C. J., & Munn, C. B. (1993). *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 3, 105-125.
- Galina, J., Yin, G., Ardo, L., & Jeney, Z. (2009). The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. *Fish physiology and biochemistry*, 35(4), 669-676.

- Ghafariarsani, H., Kachuei, R., & Imani, A. (2021). Dietary supplementation of garden thyme essential oil ameliorated the deteriorative effects of aflatoxin B1 on growth performance and intestinal inflammatory status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 531, 735928.
- Gheytasi, A., Hosseini Shekarabi, S. P., Islami, H. R., & Mehrgan, M. S. (2021). Feeding rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, with lemon essential oil loaded in chitosan nanoparticles: effect on growth performance, serum hemato-immunological parameters, and body composition. *Aquaculture International*, 29(5), 2207-2221.
- Ghisalberti, E. (1979). Propolis: a review. *Bee world*, 60(2), 59-84.
- Govind, P., Madhuri, S., & Mandloi, A. K. (2012). Immunostimulant effect of medicinal plants on fish.
- Grandison, A. S. (2006). Postharvest handling and preparation of foods for processing. *Food processing handbook*, 1.
- Hafsan, H., Bokov, D., Abdelbasset, W. K., Kadhim, M. M., Suksatan, W., Majdi, H. S., Balvardi, M. (2022). Dietary *Dracocephalum kotschyi* essential oil improved growth, haematology, immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 53(8), 3164-3175.
- Hajirezaee, S., & Khanjani, M. H. (2021). Evaluation of dietary inclusion of *Bunium persicum*, *Bunium persicum* essential oil on growth, immune components, immune-related gene expressions and resistance to *Aeromonas hydrophila*, in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture Research*, 52(10), 4711-4723.
- Hajirezaee, S., Rafieepour, A., Shafiei, S., & Rahimi, R. (2019). Immunostimulating effects of *Ginkgo biloba* extract against toxicity induced by organophosphate pesticide, diazinon in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: innate immunity components and immune-related genes. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(9), 8798-8807.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., & Heo, M. S. (2011). Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317(1-4), 1-15.
- Hernandez Zarate, M. S., Abraham Juarez, M. d. R., Ceron Garcia, A., Ozuna Lopez, C., Gutierrez Chavez, A. J., Segoviano Garfias, J. d. J. N., & Avila Ramos, F. (2018). Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. *Food Science and Technology*, 38, 210-215.

- Hernández-Contreras, Á., & Hernández, M. D. (2020). Application of aromatic plants and their extracts in aquaculture Feed Additives (pp. 239-259): *Elsevier*.
- Heydari, M., Firouzbakhsh, F., & Paknejad, H. (2020). Effects of *Mentha longifolia* extract on some blood and immune parameters, and disease resistance against *yersiniosis* in rainbow trout. *Aquaculture*, 515, 734586.
- Horne, M. T., & Robertson, D. A. (1987). Economics of vaccination against enteric redmouth disease of salmonids. *Aquaculture Research*, 18(2), 131-137.
- Hoseinifar, S. H., Shakouri, M., Van Doan, H., Shafiei, S., Yousefi, M., Raeisi, M., Reverter, M. (2020a). Dietary supplementation of lemon verbena (*Aloysia citrodora*) improved immunity, immune-related genes expression and antioxidant enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & shellfish immunology*, 99, 379-385.
- Hoseinifar, S. H., Shakouri, M., Yousefi, S., Van Doan, H., Shafiei, S., Yousefi, M., Faggio, C. (2020b). Humoral and skin mucosal immune parameters, intestinal immune related genes expression and antioxidant defense in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed olive (*Olea europea L.*) waste. *Fish & shellfish immunology*, 100, 171-178.
- Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A., & Armand, R. (2015). The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*, 6(09), 635.
- Houston, A. H. (1997). Are the classical hematological variables acceptable indicators of fish health? *Transactions of the American Fisheries Society*, 126(6), 879-894.
- Huang, S., Zhang, C.-P., Wang, K., Li, G. Q., & Hu, F.-L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610-19632.
- Hwang, D. (2013). Dietary modulation of inflammation. *Encyclopedia of Human Nutrition*, 74-78.
- Irianto, A., & Austin, B. (2002). Probiotics in aquaculture. *Journal of fish diseases*, 25(11), 633-642.
- Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L., & Zhang, Y. (2020). Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: A review. *Biomarker research*, 8(1), 1-16.
- Kelso, A. (1998). Cytokines: principles and prospects. *Immunology and cell biology*, 76(4), 300-317.
- Kim, D. H., & Austin, B. (2006). Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish & shellfish immunology*, 21(5), 513-524.

- Kim, J.-H., Yu, Y.-B., & Choi, J.-H. (2021). Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses and neurotoxicity in fish exposed to microplastics: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 413, 125423.
- König, B. (1985). Plant sources of propolis. *Bee world*, 66(4), 136-139.
- Konishi, S., Sawaya, A., Custódio, A., Cunha, I., & Shimizu, M. (2004). Influence of solubilising agents on antimicrobial activity of propolis extracts and of hydro alcoholic spray formula. *Mensagem Doce*, 75, 22-25.
- Krakauer, T., Vilcek, J., & Oppenheim, J. (1999). Proinflammatory cytokines: TNF and IL-1 families, chemokines, TGF β and others. *Fundamental immunology*, 775-811.
- Kumar, G., Menanteau-Ledouble, S., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2015). *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Veterinary research*, 46(1), 1-10.
- Kumari, S. (2020). Freshwater and marine water fish diseases: A review.
- Lakwani, M. A., Kenanoğlu, O. N., Taştan, Y., & Bilen, S. (2022). Effects of black mustard (*Brassica nigra*) seed oil on growth performance, digestive enzyme activities and immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 53(1), 300-313.
- Langenheim, J. H. (1990). Plant resins. *American Scientist*, 78(1), 16-24.
- LaPatra, S., Kao, S., Erhardt, E. B., & Salinas, I. (2015). Evaluation of dual nasal delivery of infectious hematopoietic necrosis virus and enteric red mouth vaccines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vaccine*, 33(6), 771-776.
- Leonhardt, S. D., Wallace, H. M., & Schmitt, T. (2011). The cuticular profiles of Australian stingless bees are shaped by resin of the eucalypt tree *Corymbia torelliana*. *Austral Ecology*, 36(5), 537-543.
- Lieke, T., Meinelt, T., Hoseinifar, S. H., Pan, B., Straus, D. L., & Steinberg, C. E. (2020). Sustainable aquaculture requires environmental-friendly treatment strategies for fish diseases. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 943-965.
- Martinotti, S., & Ranzato, E. (2015). Propolis: a new frontier for wound healing? *Burns & trauma*, 3(1), 1-7.
- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., & O'garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews Immunology*, 15(2), 87-103.
- Mehana, E. E., Rahmani, A. H., & Aly, S. M. (2015). Immunostimulants and fish culture: an overview. *Annual Research & Review in Biology*, 477-489.

- Mehrabi, Z., Firouzbakhsh, F., Rahimi-Mianji, G., & Paknejad, H. (2020). Immunity and growth improvement of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed dietary nettle (*Urtica dioica*) against experimental challenge with *Saprolegnia parasitica*. *Fish & shellfish immunology*, 104, 74-82.
- Mello, B. C., Petrus, J. C. C., & Hubinger, M. D. (2010). Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. *Journal of Food Engineering*, 96(4), 533-539.
- Monti, M., Bertt, E., Carminati, G., & Cusini, M. (1983). Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. *Contact dermatitis*, 9(2), 163-163.
- Mu, D., Jiang, Y., He, J., Zhang, Y., Yang, D., Liu, Q., & Wang, Z. (2022). Dietary supplementation of propolis enhanced the innate immune response against *Edwardsiella piscicida* challenge in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 124, 273-279.
- Nakae, S., Asano, M., Horai, R., & Iwakura, Y. (2001). Interleukin-1 β , but not interleukin-1 α , is required for T-cell-dependent antibody production. *Immunology*, 104(4), 402-409.
- Nathan, C., & Sporn, M. (1991). Cytokines in context. *The Journal of cell biology*, 113(5), 981-986.
- Nur, F. M., Nugroho, R. A., & Fachmy, S. (2017, February). Effects of propolis (*Trigona* sp.) extract supplementation on the growth and blood profile of *Pangasius djambal*. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1813, No. 1, p. 020024). AIP Publishing LLC.
- Okoye, T. C., Uzor, P. F., Onyeto, C. A., & Okereke, E. K. (2014). Safe African medicinal plants for clinical studies Toxicological Survey of African Medicinal Plants (pp. 535-555): *Elsevier*.
- Olusola, S. E., Emikpe, B. O., & Olaifa, F. E. (2013). The potentials of medicinal plant extracts as bio-antimicrobials in aquaculture. *Int J Med Aromat Plants*, 3(3), 404-412.
- Olusola, S. E., Emikpe, B. O., & Olaifa, F. E. (2013). The potentials of medicinal plant extracts as bio-antimicrobials in aquaculture. *Int J Med Aromat Plants*, 3(3), 404-412.
- Ooi, E. L., Verjan, N., Haraguchi, I., Oshima, T., Kondo, H., Hirono, I., & Yuki, Y. (2008). Innate immunomodulation with recombinant interferon- α enhances resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to infectious hematopoietic necrosis virus. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(10), 1211-1220.

- Oppenheim, J. J. (2001). Cytokines: past, present, and future. *International journal of hematology*, 74(1), 3-8.
- Ortega, A. M. M., & Campos, M. R. S. (2019). Bioactive compounds as therapeutic alternatives Bioactive compounds (pp. 247-264): *Elsevier*.
- Pajdak-Czaus, J., Schulz, P., Terech-Majewska, E., Szweda, W., Siwicki, A. K., & Platt-Samoraj, A. (2021). Influence of Infectious Pancreatic Necrosis Virus and *Yersinia ruckeri* Co-Infection on a Non-Specific Immune System in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animals*, 11(7), 1974.
- Pandey, A., & Savita, R. (2017). Harvesting and post-harvest processing of medicinal plants: Problems and prospects. *The Pharma Innovation Journal*, 6(12), 229-235.
- Parrino, V., Kesbiç, O. S., Acar, Ü., & Fazio, F. (2020). Hot pepper (*Capsicum sp.*) oil and its effects on growth performance and blood parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Natural product research*, 34(22), 3226-3230.
- Pereira, A. G., Fraga-Corral, M., García-Oliveira, P., Jimenez-Lopez, C., Lourenço-Lopes, C., Carpena, M., & Simal-Gandara, J. (2020). Culinary and nutritional value of edible wild plants from northern Spain rich in phenolic compounds with potential health benefits. *Food & function*, 11(10), 8493-8515.
- Pickering, A. D., & Pottinger, T. G. (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish physiology and biochemistry*, 7(1), 253-258.
- Post G. (1987) Enteric redmouth disease (*Yersiniosis*). In: *Textbook of Fish Health* (ed. by G. Post), pp. 47–51. THF Publications, Neptune City, NJ.
- Pujirahayu, N., Ritonga, H., & Uslinawaty, Z. (2014). Properties and flavonoids content in propolis of some extraction method of raw propolis. *Int J Pharm Pharm Sci*, 6(6), 338-340.
- Radosavljević, V., Zdravković, N., Veljović, L., & Radanović, O. (2022). Important bacterial diseases and their control in rainbow trout in Serbian aquaculture. *Veterinarski glasnik*(00), 6-6.
- Rairakhwada, D., Pal, A. K., Bhathena, Z. P., Sahu, N. P., Jha, A., & Mukherjee, S. C. (2007). Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish & Shellfish Immunology*, 22(5), 477-486.
- Reboucas-Silva, J., Celes, F. S., Lima, J. B., Barud, H. S., de Oliveira, C. I., Berretta, A. A., & Borges, V. M. (2017). Parasite killing of *Leishmania (V) braziliensis* by standardized propolis extracts. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.

- Reverter, M., Tapissier-Bontemps, N., Sasal, P., & Saulnier, D. (2017). Use of medicinal plants in aquaculture. *Diagnosis and control of diseases of fish and shellfish*, 9, 223-261.
- Roca, F. J., Mulero, I., López-Muñoz, A., Sepulcre, M. P., Renshaw, S. A., Meseguer, J., & Mulero, V. (2008). Evolution of the inflammatory response in vertebrates: fish TNF- α is a powerful activator of endothelial cells but hardly activates phagocytes. *The Journal of Immunology*, 181(7), 5071-5081.
- Ross, A. J., Rucker, R. R., & Ewing, W. H. (1966). Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian journal of microbiology*, 12(4), 763-770.
- Ross, I. A. (2005). Medicinal plants of the world, volume 3: Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses: *Springer*.
- Saeed, M., Arain, M. A., Kamboh, A. A., Memon, S. A., Umar, M., Rashid, M., & Alagawany, M. (2017). Raw propolis as a promising feed additive in poultry nutrition: trends and advances. *Journal of Animal Health and Production*, 5(4), 132-142.
- Safari, O., & Sarkheil, M. (2018). Dietary administration of eryngii mushroom (*Pleurotus eryngii*) powder on haemato-immunological responses, bactericidal activity of skin mucus and growth performance of koi carp fingerlings (*Cyprinus carpio koi*). *Fish & shellfish immunology*, 80, 505-513.
- Salem, M. O. A., Taştan, Y., Bilen, S., Terzi, E., & Sönmez, A. Y. (2022). Effects of white mustard (*Sinapis alba*) Oil on growth performance, immune response, blood parameters, digestive and antioxidant enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & shellfish immunology*.
- Salinas, I., LaPatra, S. E., & Erhardt, E. B. (2015). Nasal vaccination of young rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis and enteric red mouth disease. *Developmental & Comparative Immunology*, 53(1), 105-111.
- Salomon, B. L., Leclerc, M., Tosello, J., Ronin, E., Piaggio, E., & Cohen, J. L. (2018). Tumor necrosis factor α and regulatory T cells in oncoimmunology. *Frontiers in immunology*, 9, 444.
- Sardana, D., InduShekar, K., Manchanda, S., Saraf, B. G., & Sheoran, N. (2013). Role of propolis in dentistry: review of the literature. *Focus on Alternative and Complementary Therapies*, 18(3), 118-125.
- Sawicka, D., Car, H., Borawska, M. H., & Nikliński, J. (2012). The anticancer activity of propolis. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 50(1), 25-37.

- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*, 75(2), 163-189.
- Secombes, C., Wang, T., Hong, S., Peddie, S., Crampe, M., Laing, K., Zou, J. (2001). Cytokines and innate immunity of fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 25(8-9), 713-723.
- Seibel, H., Baßmann, B., & Rebl, A. (2021). Blood will tell: what hematological analyses can reveal about fish welfare. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 616955.
- Sigh, J., Lindenstrøm, T., & Buchmann, K. (2004). The parasitic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis* induces expression of immune relevant genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of fish diseases*, 27(7), 409-417.
- Silici, S., & Baysa, M. (2020). Antioxidant, antiradical and antipyretic effects of olive oil extract of propolis. *Journal of Apicultural Research*, 59(5), 883-889.
- Simone-Finstrom, M., & Spivak, M. (2010). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, 41(3), 295-311.
- 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(1-2), 125-139.
- Škrovánková, S., Mišurcová, L., & Machů, L. (2012). Antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants. *Advances in food and nutrition research*, 67, 75-139.
- Sönmez, A. Y., Bilen, S., Taştan, Y., Kenanoğlu, O. N., & Terzi, E. (2022). Effects of dietary *Astragalus caudiculosus* (Boiss & Huet, 1856) supplementation on growth, hematology, antioxidant enzyme activities, and immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Fish & shellfish immunology*, 122, 366-375.
- Sönmez, A., Özdemir, R. C., Bilen, S., & Özdemir, Y. K. (2018). Cyclopamine induced expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) head kidney leukocytes, *Israeli Journal of Aquaculture*, 70, 1.
- Stanković, D., Crivelli, A. J., & Snoj, A. (2015). Rainbow trout in Europe: introduction, naturalization, and impacts. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 23(1), 39-71.

- Stratev, D., Zhelyazkov, G., Noundou, X. S., & Krause, R. W. (2018). Beneficial effects of medicinal plants in fish diseases. *Aquaculture International*, 26(1), 289-308.
- Šuran, J., Cepanec, I., Mašek, T., Radić, B., Radić, S., Tlak Gajger, I., & Vlainić, J. (2021). Propolis extract and its bioactive compounds—From traditional to modern extraction technologies. *Molecules*, 26(10), 2930.
- Taddeo, V. A., Epifano, F., Fiorito, S., & Genovese, S. (2016). Comparison of different extraction methods and HPLC quantification of prenylated and unprenylated phenylpropanoids in raw Italian propolis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 129, 219-223.
- Tandon, N., & Yadav, S. S. (2017). Contributions of Indian Council of Medical Research (ICMR) in the area of medicinal plants/traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 197, 39-45.
- Thorgaard, G. H., Bailey, G. S., Williams, D., Buhler, D. R., Kaattari, S. L., Ristow, S. S., Nagler, J. J. (2002). Status and opportunities for genomics research with rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 133(4), 609-646.
- Tobback, E., Decostere, A., Hermans, K., Haesebrouck, F., & Chiers, K. (2007). *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *Journal of fish diseases*, 30(5), 257-268.
- Tukmechi, A., Karimi, R. F., Farrokhi, F., Agh, N., & Jalili, R. (2014). The effects of short-and long-term diet supplementation with Iranian propolis on the growth and immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
- Ummey, S., Khan, S., Vijayakumar, P., & Ramya, A. (2021). Enteric Red Mouth disease and its causative bacterium, *Yersinia ruckeri*, in Indian Major Carps from culture ponds in Andhra Pradesh, India. *Aquaculture and Fisheries*, 6(3), 289-299.
- Van Wyk, B.-E., & Wink, M. (2018). Medicinal plants of the world: CABI.
- Varalakshmi, B., Shanmugapriya, A., Karpagam, T., Suganya, V., Firdous, J., Arumugam, V. A., Saradhasri, V. (2022). Bacterial Fish Diseases and Treatment Aquaculture Science and Engineering (pp. 517-572): Springer.
- Vaseeharan, B., & Thaya, R. (2014). Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquaculture International*, 22(3), 1079-1091.
- 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.
- Vazirzadeh, A., Marhamati, A., Rabiee, R., & Faggio, C. (2020). Immunomodulation, antioxidant enhancement and immune genes up-regulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on seaweeds included diets. *Fish & shellfish immunology*, 106, 852-858.
- Villumsen, K. R., Neumann, L., Ohtani, M., Strøm, H. K., & Raida, M. K. (2014). Oral and anal vaccination confers full protection against enteric redmouth disease (ERM) in rainbow trout. *PLoS One*, 9(4), e93845.
- Vivas, J., Carracedo, B., Riano, J., Razquin, B. E., López-Fierro, P., Acosta, F., & Villena, A. J. (2004). Behavior of an *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine in water microcosms. *Applied and environmental microbiology*, 70(5), 2702-2708.
- Wafaa, E., Doaa, I., El-Murr, A., & Rania, M. (2014). Effects of dietary inclusion of black cumin seeds, green tea and propolis extraction growth parameters, body composition and economic efficiency of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 6(5), 447-452.
- Wagh, V. D. (2013). Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in pharmacological sciences*, 2013.
- Wintrobe, M. M. (1934). Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia haematologica*, 51(32), 32-49.
- Wolska, K., Gorska, A., Antosik, K., & Lugowska, K. (2019). Immunomodulatory effects of propolis and its components on basic immune cell functions. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81(4), 575-588.
- Wrobel, A., Leo, J. C., & Linke, D. (2019). Overcoming fish defences: the virulence factors of *Yersinia ruckeri*. *Genes*, 10(9), 700.
- Xu, Z., Cao, J., Qin, X., Qiu, W., Mei, J., & Xie, J. (2021). Toxic Effects on Bioaccumulation, Hematological Parameters, Oxidative Stress, Immune Responses and Tissue Structure in Fish Exposed to Ammonia Nitrogen: A Review. *Animals*, 11(11), 3304.
- Yigit, N. O., Diler, O., Koca, S. B., & Gormez, O. (2017). Effect on histology and nutrient digestibility of supplemented *Origanum onites* essential oil to rainbow trout diets (*Oncorhynchus mykiss*). *Indian J. Pharmaceut. Educ. Res*, 51(3).
- Yonar, M. E. (2008). *Yersinia Ruckeri* ile enfekte edilen gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus Mykiss*)'nın tedavisinde propolis kullanılması/Usage of propolis for treatment of rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) infected with *Yersinia Ruckeri*.

- Yousefi, M., Farsani, M. N., Ghafarifarsani, H., Hoseinifar, S. H., & Van Doan, H. (2021). The effects of dietary supplementation of mistletoe (*Viscum album*) extract on the growth performance, antioxidant, and innate, immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 536, 736385.
- Yousefi, M., Ghafarifarsani, H., Hoseini, S. M., Hoseinifar, S. H., Abtahi, B., Vatnikov, Y. A., Van Doan, H. (2022). Effects of dietary thyme essential oil and prebiotic administration on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) welfare and performance. *Fish & shellfish immunology*, 120, 737-744.
- Zampini, I. C., Salas, A. L., Maldonado, L. M., Simirgiotis, M. J., & Isla, M. I. (2021). Propolis from the Monte region in Argentina: A potential phytotherapeutic and food functional ingredient. *Metabolites*, 11(2), 76.
- Zargar, A., Rahimi-Afzal, Z., Soltani, E., Taheri Mirghaed, A., Ebrahimzadeh-Mousavi, H. A., Soltani, M., & Yuosefi, P. (2019). Growth performance, immune response and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed *Thymus vulgaris* essential oils. *Aquaculture Research*, 50(11), 3097-3106.
- Zhang, J.-M., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation and pain. *International anesthesiology clinics*, 45(2), 27.
- Zhang, W., Zhao, J., Ma, Y., Li, J., & Chen, X. (2022). The effective components of herbal medicines used for prevention and control of fish diseases. *Fish & shellfish immunology*.
- Zheng, Z., Yingeng, W., Qingyin, W., Nannan, D., Meijie, L., Jiangbo, Q., & Lan, W. (2012). Study on the immune enhancement of different immunoadjuvants used in the pentavalent vaccine for turbot. *Fish & shellfish immunology*, 32(3), 391-395.
- Zhou, H.-R., Harkema, J. R., Yan, D., & Pestka, J. J. (1999). Amplified proinflammatory cytokine expression and toxicity in mice coexposed to lipopolysaccharide and the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol). *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 57(2), 115-136.
- Zhu, F. (2020). A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. *Aquaculture*, 526, 735422.
- Zou, J., & Secombes, C. J. (2011). Teleost fish interferons and their role in immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1376-1387.