

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

**DENEYSEL YANGI OLUŞTURULMUŞ GÖKKUŞAĞI**  
**ALABALIKLARINDA (*Oncorhynchus mykiss* WALBAUM, 1792) TİMOLÜN**  
**APOPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**Banu KUBULAY**

**Anabilim Dalı: Su Ürünleri**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Azime KÜÇÜKGÜL**

**ŞUBAT – 2016**

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

**DENEYSEL YANGI OLUŞTURULMUŞ GÖKKUŞAĞI  
ALABALIKLARINDA (*Oncorhynchus mykiss* WALBAUM, 1792) TİMOLÜN  
APOPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Banu KUBULAY  
(11876629)**

**Anabilim Dalı: Su Ürünleri**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Azime KÜÇÜKGÜL**

**ŞUBAT – 2016**

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

**DENEYSEL YANGI OLUŞTURULMUŞ GÖKKUŞAĞI**  
**ALABALIKLARINDA (*Oncorhynchus mykiss* WALBAUM, 1792) TİMOLÜN**  
**APOPTOZ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Banu KUBULAY**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 03/02/2016 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **oybirliği/ oyçokluğu** ile kabul edilmiştir.

**İmza:.....**

**İmza:.....**

**İmza:.....**

Doç. Dr. Azime KÜÇÜKGÜL  
(T.Ü)

Prof. Dr. Mustafa DÖRÜCÜ  
(T.Ü)

Yrd. Doç. Dr. Ünal İSPİR  
(İ.Ü)

**DANIŞMAN**

**ÜYE**

**ÜYE**

Bu tez, Enstitümüz Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Doç. Dr. Abdullah DİKİCİ  
Enstitü Müdürü  
İmza ve Mühür

Bu çalışma, Tunceli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

**Proje No: YLTUB015-12**

**NOT:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı "Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu"ndaki hükümlere tabidir

## ÖZET

Bu çalışmada, ön çalışmalarda dâhil olmak üzere toplam 400 gökkuşuğu alabalığı (ort. 16,57±1,79 cm uzunluk; 44,71±6,43 gr ağırlık) kullanıldı. Dört deneysel grup oluşturulan araştırmada, ilk grup kontrol grubu olup deney süresince tüm optimal koşullar sağlandı. İkinci gruptaki balıklar 25 µg/ml lipopolisakkarit (LPS) ile intraperitonel olarak (i.p.) enfekte edildi ve infeksiyon grubu olarak değerlendirildi. Üçüncü grup balıklar enfekte edilmemiş ve yalnızca timol destekli yem takviyesi (100µg/ml/1 kg yem) ile beslendi. Son grubu oluşturan balıklar ise LPS ile infeksiyon sonrası timol destekli yem ile beslendi. Deneme periyodu boyunca su sıcaklığı, pH, çözülmüş oksijen değerleri sırasıyla 15,5 °C, 8.01, 9.57 mg/L olarak belirlendi. Deneysel aşama 48 saat sonunda tamamlandı. Deneme süresi sonunda karaciğer doku örnekleri alındı ve apoptotik sitokinlerden kaspaz 3 (CAS-3), kaspaz 8 (CAS -8) ve tümör protein 53 (p53) gen ekspresyon seviyeleri araştırıldı. CAS-3, CAS-8 ve p53 genlerine spesifik dizayn ettirilen primerlerin en uygun yapışma (annealing) sıcaklıkları 55-60 °C arasında farklı ısı dereceleri uygulanarak, gradient PCR yöntemiyle saptandı. Timolün apoptotik etkinliği araştırıldı. Balıklarda, LPS ile oluşturulan infeksiyon sonunda göz cidarında, kuyruk bölgelerinde hemorajiler, renkte koyulaşmalar gözlemlendi.

Apoptoz indükleyici genlerinden olan CAS-3 ve CAS-8 karaciğer dokusu ekspresyon seviyelerinin LPS uygulanan grupta kontrol grubuna göre sırasıyla 4 ve 12,81 misli değişimlerle uyarıldığı tespit edildi. Yalnızca timol içeren grupta CAS-3 gen ekspresyon seviyesi için herhangi bir değişim gözlenmedi fakat CAS-8 ekspresyonu 1,58 misli değişimlerle uyarıldı. Timol pre-inkübasyonundan sonra LPS eklenen grupta ise sırasıyla CAS-3 ve CAS-8 gen ekspresyon seviyelerinin 8,51 ve 37,79 misli değişimlerle indüklendiği ortaya konuldu. p53 gen ekspresyonu ise kontrol grubuna göre LPS ile 1,47 misli uyarıldı, timol grubunda bu artış 1,1 misli değişimlerle baskılandı. Ancak, son grupta p53 gen ekspresyon seviyesinde 7,06 misli artış tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Gökkuşuğu Alabalığı, Kaspaz 3, Kaspaz 8, Lipopolisakkarit, Timol, Tümör Protein

## ABSTRACT

### **Investigation Effects of Tyhmol on Apoptosis in Experimentally Inflamed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)**

In this study, including preliminary studies total 400 rainbow trout (mean  $16.57 \pm 1.79$  cm of length and  $44.71 \pm 6.43$  g of weight) was used. In this research created the four experimental groups, the first group is the control group was provided optimal conditions during all experiments. The fish in the second group were intraperitoneally (i.p.) infected by 25 mg / ml of lipopolysaccharide (LPS) and was evaluated as infection group. The fish in the third group was not infected and only the feed supported thymol (100 $\mu$ g/ml/1 kg of feed) was fed. The fish included the last group was fed by the feed supported thymol after infection with LPS. Water temperature, pH, dissolved oxygen values during the experimental period were fixed as 15.5 ° C, 8.01, 9.57 mg/l respectively. The experimental stage was completed after 48 hours. The liver tissue samples were removed at the end of the trial period and caspase 3 (CAS-3), caspase 8 (CAS-8) and tumor protein (p53) gene expression levels from apoptotic cytokines were investigated. Optimal adhesion (annealing) temperatures of the primers designed specifically CAS-3, CAS-8 and p53 genes analyzed by gradient PCR with applying different temperatures between 55-60 °C. Apoptotic activity of thymol was investigated. Hemorrhages in the eye wall and the tail region of the fish and dark color in skin were observed at the end of infection caused by LPS.

The liver tissue expression levels of CAS-3 and CAS-8 from the apoptosis-inducing genes in LPS-treated group were stimulated by the 4 and 12.81-fold changes compared to the control group. In the group consisting of thymol, any change was not observed for CAS-3 gene expression level, but CAS-8 expression was stimulated by 1:58 fold change. In LPS-added group after thymol pre-incubation, CAS-3 and CAS-8 gene expression levels were determined that induced with 8.51 and 37.79 fold changes. P53 gene expression level was stimulated 1.47 fold changes in LPS-treated compared to the control group. This increase was suppressed by 1.1-fold changes in the thymol group. However, p53 gene expression level was detected a significant increase by 7.06-fold changes in the last group.

**Key Words:** Rainbow Trout, Caspase 3, Caspase 8, Lipopolysaccharide, Thymol, Tumor Protein

## **TEŐEKKÖRLER**

Bu çalışmada bana yol gōsteren bilgi ve tecrübesi ile aydınlatan, yardım ve ilgisini esirgemeyen kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Azime KÜÇÜKGÖL'e, deneysel ortamımızı kurmamıza olanak sağlayan Tunceli Öniversitesi Merkezi Su Ürünleri Araştırma Laboratuvarı Müdürlüğü'ne, laboratuvar analizleri konusunda sağladığı yardımlardan dolayı Mustafa Kemal Öniversitesi Veterinerlik Faköltesi öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Altuğ KÜÇÜKGÖL'e teőekkür eder saygılarımı sunarım.

**Banu KUBULAY**  
**TUNCELİ – 2016**

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa No

<b>ÖZET</b> .....	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>III</b>
<b>TEŞEKKÜRLER</b> .....	<b>IV</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>V</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>V</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b> .....	<b>VII</b>
<b>RESİMLER LİSTESİ</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Literatür Bilgisi.....	3
<b>2. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	<b>11</b>
2.1. Materyal.....	11
2.1.1. Balık .....	11
2.1.2. Lipopolisakkarit - LPS ( <i>E.coli</i> O55:B5 suşu endotoksini- Sigma/USA).....	11
2.1.3. Timol .....	12
2.1.4. Deneysel Düzenek .....	12
2.1.5. Balıklardan Doku Örneklerinin Alımı ile Homojenat Hazırlama.....	15
2.2. Yöntem .....	15
2.2.1. Sitokin Gen Ekspresyon Analizleri.....	15
2.2.1.1. RNA İzolasyonu .....	15
2.2.1.2. cDNA(komplementer- tamamlayıcı DNA) Sentezi.....	16
2.2.1.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR).....	17
2.2.2. İstatistiksel Analizler .....	20
<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>21</b>
3.1. LPS İnfeksiyon Modeli .....	21
3.2. Dokularda Sitokin mRNA Transkripsiyon Düzeyleri.....	24
<b>4. TARTIŞMA</b> .....	<b>29</b>
<b>5. ÖNERİLER</b> .....	<b>32</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	<b>33</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>42</b>

## ŞEKİLLER LİSTESİ

### Sayfa No

Şekil 3.1. LPS subletal konsantrasyonu (doz-zaman).....	21
Şekil 3.2. CAS-3 gen gradient PCR amplifikasyon eğrileri.....	24
Şekil 3.3. Karaciğerde CAS-3 mRNA transkripsiyon seviyeleri .....	25
Şekil 3.4. CAS-8 gen gradient PCR amplifikasyon eğrileri.....	26
Şekil 3.5. Karaciğerde CAS-8 mRNA transkripsiyon seviyeleri .....	26
Şekil 3.6. p53 gen gradient PCR amplifikasyon eğrileri .....	27
Şekil 3.7 Karaciğerde p53 mRNA transkripsiyon seviyeleri .....	27



## TABLULAR LİSTESİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Tablo 2.1.</b> LPS enfeksiyonu.....	12
<b>Tablo 2.2.</b> Deneme grupları.....	15
<b>Tablo 2.3.</b> PCR analizlerinde kullanılacak primer baz dizgeleri .....	18

## RESİMLER LİSTESİ

### Sayfa No

<b>Resim 1.1.</b> LPS'nin yapısı .....	5
<b>Resim 1.2.</b> Hücre ölüm reseptörlerinden bazılarının apoptozdaki rolünü göstermektedir ....	6
<b>Resim 1.3.</b> p53 proteininin apoptoz üzerine etkisini göstermektedir. ....	7
<b>Resim 1.4.</b> <i>Origanum vulgare</i> .....	8
<b>Resim 1.5.</b> Timolün kimyasal yapısı.....	9
<b>Resim 2.1.</b> LPS konsantrasyonunun intraperitonel uygulanımı.....	13
<b>Resim 2.2.</b> Deneysel düzenek .....	14
<b>Resim 2.3.</b> Deneysel düzenek .....	14
<b>Resim 2.4.</b> RNA izolasyonunun gerçekleştirildiği laboratuvar ortamı .....	16
<b>Resim 2.5.</b> Transkripsiyon analizlerinde kullanılan Real-Time System (Bio-Rad).....	18
<b>Resim 2.6.</b> Doku örneklerinin Real-Time System'e yerleştirilmesi.....	19
<b>Resim 2.7.</b> Amplikasyon sıcaklık değerleri .....	20
<b>Resim 3.1.</b> TSA besiyerinde üreme (orijinal) .....	22
<b>Resim 3.2.</b> LPS uygulanan balıkta renkte koyulaşma (orijinal).....	23
<b>Resim 3.3</b> LPS uygulanan balıkta operkulum çevresinde hemoraji (orijinal) .....	23

## 1. GİRİŞ

Su ürünlerine elverişli üretim sahaları ile Türkiye önemli bir potansiyele ve kapasiteye sahiptir (İşgören ve Elbek, 2006). Su ürünleri, deniz ve iç sularda yaşayan bitkisel ve hayvansal canlı topluluğu olup, onların işletilmeleri, yetiştiriciliğinin yapılması gibi alanları kapsayan multidisipliner bir alandır (Atay, 1997). Kültür balıkçılığında ülkemizde en çok gökkuşağı alabalığı kültürü yapılmaktadır. Alabalıklar soğuk, bol oksijenli suları seven, üretiminde bol miktarda suya gereksinim duyan canlılardır (Ungun, 1996; Gülyavuz ve Ünlüsayın, 1999). Balıklar, sudaki çözülmüş oksijeni kullanırlar. Türe göre değişen oksijen istekleri aynı zamanda balığın yaşına, suda biriken madde yoğunluğuna, sıcaklığa, besin miktarına ve içeriğine göre de değişim gösterebilmektedir (Atay, 1987). Su sıcaklığının artması ile balıklar daha fazla çözülmüş oksijene ihtiyaç duyarlar. Eğer çözülmüş oksijen yetiştirilen tür için ortamda yeterli değilse, oluşabilecek stres faktörleri birçok hastalığın ortaya çıkmasına neden olacaktır (Aras, 1992).

Hastalık, canlılarda iç ve dış etkenlerden meydana gelen zararlar sonucunda, normal fonksiyonların azalması, kaybolması veya canlının bu zarar sonucu ölmesi demektir. Hastalığın oluşumunda çevre, etken ve balığın savunma mekanizması önemli olmaktadır (Arda ve ark., 2002).

İnfeksiyöz hastalıklar, herhangi bir etkenin (bakteri, virüs, mantar veya parazit) vücuda girmesiyle oluşan bir bireyden diğerine geçmesiyle meydana gelen bulaşıcı hastalık anlamına gelmektedir. Balık yetiştiriciliğinde, balıkların birbirlerine yakın olması, sularda kirlenme ve kalitede (fiziksel, kimyasal, biyolojik ve diğer parametrelerde) optimal değerlerin üzerine çıkma gibi durumlar balıklarda infeksiyöz ve non-infeksiyöz hastalıklara neden olmaktadır. Koruyucu önlemler alınmazsa hastalık yayılarak ölümcül boyutlara ulaşmaktadır (Arda ve ark., 2002).

Gökkuşağı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) bakteriyel patojenleri üzerinde birçok çalışma yapılmış ve yoğun olarak araştırılmış *Yersinia ruckeri* enfeksiyonlarının ciddi kayıplara sebep olduğu ortaya koyulmuştur (Burka ve ark., 1997; Kum ve ark., 2004; Akinbowale ve ark., 2006). *Yersinia ruckeri* tarafından oluşturulan Yersinioziste septisemi, balıklarda durgunluk, deride kararma, yüzgeç tabanı ve anüste kanamalar, ekzoftalmus ve basınçlı kan damarları dikkati çekmektedir (Diler ve ark., 1998; Woo ve Bruno, 2003).

Gram negatif bakteriler etki mekanizmasını (*Y. ruckeri* vb.) hücre duvarının bir bileşeni olan lipopolisakkarit (LPS) ile oluşturmaktadır. Özellikle Lipid A katmanı bu etkiden sorumlu olup, bakteri hücresinin endotoksininin toksik komponenti oluşturmaktadır. Lipopolisakkarit, gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan, doğal bağışıklığı arttıran en önemli bakteri ürünüdür. Bir endotoksin olan lipopolisakkaritin toksik parçası lipid A, septik sürecin başlamasında ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır (Paterson ve Fryer, 1974; Baba ve ark., 1988)

Birçok enfeksiyöz etken yangının başlamasına sebep olmakta ve konak hücrede apoptozu uyarmaktadır. Apoptoz programlanmış hücre ölümü olup kaspaz 3 (CAS-3), kaspaz 8 (CAS-8) ve tümör protein 53 (p53) genlerinin transkripsiyon düzeylerinde değişimlere neden olarak gerek intrinsik gerekse ekstrinsik apoptoz sinyal iletim yollarını aktif hale getirmektedir (Boldin ve ark., 1996; Choi ve ark., 1998).

Patojenlere karşı hayvanlarda direnç gelişimi riskini artırması (Cabello, 2006; Moffitt ve Mobin, 2006; Benchaar ve ark., 2006, Navarrete ve ark., 2008) sebebiyle, gıda güvenliği açısından, başta AB ülkeleri olmak üzere Türkiye’de de antibiyotiklerin balıklarda büyüme performansını arttırıcı olarak yemlere ilavesi yasaklanmıştır (Shane, 2005; Anonim, 2007). Bu durum antibiyotiklere alternatif yeni yem katkı maddelerinin geliştirilmesine yönelik çalışmaları hızlandırmıştır. Araştırmacılar, özellikle doğal kaynaklı bitkilerin (kekik türleri gibi) yapısındaki ekstraktlar olan esansiyel yağlara (timol, euganol, karvakrol gibi) odaklanmışlardır.

Lamiaceae familyası üyesi olup kimyasal bileşenlerinde timol ve karvakrol içeren ülkemizde kekik olarak bilinen pekçok aromatik bitki türü bilinmektedir (Başer ve ark., 1994). Esansiyel yağların fenol bileşenleri olan, timol, karvakrol, eugenol ve terpineolün güçlü antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Friedman ve ark., 2002; Lee ve ark., 2005; Koul ve ark., 2008). Aeschbach ve ark. (1994) timol ve karvakrol önemli derecede antioksidan etkilerini ortaya koymuş ve doğal birer antioksidan madde olduğunu bildirmişlerdir. Karvakrol ve timol güçlü antibakteriyel özellikli fenolik bileşikler arasında yer almaktadır (Burt, 2004; Holley ve Patel, 2005).

Yapılan bu çalışmada, ülkemiz ticari kültür balıkçılığında ve Tunceli yöresinde de önemli ekonomik değere sahip olan gökkuşağı alabalıkları üzerinde LPS maruziyeti sonrası doğal antioksidan ve inflamasyon (yangı) giderici özelliği bilinen timolün tedavi amaçlı

biyolojik etkinlikleri CAS-3, CAS-8 ve p53 genlerinin transkripsiyon değişimlerinin tespiti çalışılmıştır.

### **1.1. Literatür Bilgisi**

Uzun yıllardır su ürünleri insanların en önemli besin kaynaklarından birini oluşturmaktadır. Besin bileşenlerinin araştırılması, önemli bir protein kaynağı olması, vücut dokularının korunması ve gelişmesi için gerekli tüm aminoasitleri içermesi ile balıklar insan sağlığı üzerinde olumlu etkilere sahiptir. Yapılan bir çalışmada et, balık, yumurta ve sütün aynı besleme değerinde protein içediği bulunmuştur (Love, 1982).

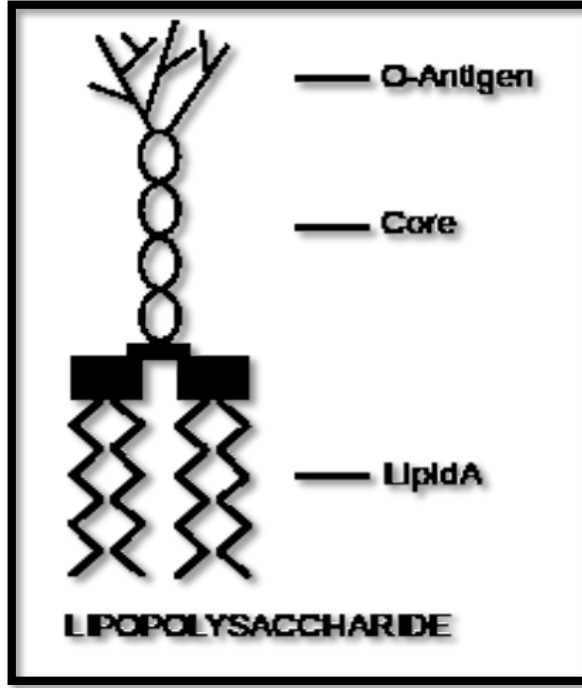
Alabalıklardan özellikle gökkuşağı alabalıkları kültür ortamındaki yetiştiriciliğinde hızlı gelişmeleri, yemden iyi yararlanabilmeleri, çevreye kolay uyum sağlayabilmeleri ve bazı hastalıklara karşı daha dayanıklı olabilmeleri gibi özelliklerinden dolayı tüm dünyada tercih edilen balıklar grubunu oluşturmaktadırlar (Hickling, 1971; elikkale, 1994; Aras ve ark., 2000; Timur ve Timur, 2003)

Son zamanlarda ülkemizde artan bir ivme kazanan kültür balıkçılığı, Karadeniz Bölgesi'nde de pek çok alabalık üretim çiftliğinin kurulmasına önderlik etmiştir. Yetiştiricilik ünitelerinde % 70 civarında alabalık yetiştiriciliği yapılmaktadır. Kültür balığı yetiştiriciliği yerel ekonomi katkısı yanında ülke ekonomisi içinde önem arz etmektedir. Fakat kültür balıkçılığında insan eliyle yetiştirilme zorunluluğu olması ile bilinçsiz yetiştiricilik, su parametrelerinde ani değişimler, hastalık problemleri gibi birçok neden ile elde edilen verim kalitesini düşürmektedir (Anonim 2005). Ancak balıkların içinde yaşadığı sucul ortamın sahip olduğu sıcaklık, pH, tuzluluk, çözünmüş O<sub>2</sub> miktarları gibi fiziksel ve kimyasal özellikler balığın bağışıklık sistemi üzerine direkt göstermekte ve bu nedenle hastalık durumlarında bağışıklık sisteminin zayıflaması sonucu ciddi problemler oluşabilmektedir. Bu hastalık tablosunun çoğunu oluşturan bakteriyel hastalıklar özellikle gram negatif özelliğe sahip mikroorganizmalar yoluyla toplu balık ölümlerine neden olmaktadır.

Kültüre edilen balık çiftliklerinde yetiştirilen türün optimal isteklerinin değişmesi ile bakteriyel hastalıkları ortaya çıkmaktadır (Timur ve Timur, 2003; Roberts, 2012; Austin ve Austin, 2012). Hızlı bir gelişme gösteren gökkuşağı alabalığı kültüründe ise özellikle gram negatif karakterdeki bakterilerden kaynaklanan hastalıklar sıklıkla görülmektedir.

Gram negatif bakterilerde hücreyi zorlu çevre şartlarına karşı koruyan hücre çeperi bazı enzimatik sistemleri de bünyesinde bulundurmaktadır (Lima de Faria, 1969; Koebnik ve ark., 2000). Gram negatif bakterilerde hücre çift katlı bir membran ile çevrilidir ve dış membran; tamamı sitoplazmada sentezlenen fosfolipidler, lipopolisakkaritler, lipoproteinler ve integral dış membran proteinlerinden (OMP) meydana gelmektedir (Bos ve Tomassen, 2004). Bakterilerde bulunan lipopolisakkaritler antijenik yapılardan sorumlu olup bağışıklık sisteminin gelişmesi üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır ve bu nedenle aşı geliştirme çalışmalarına temel teşkil etmektedir (Fulop ve ark., 1995; Sakai, 1999). Solem ve ark. (1995), *Aeromonas salmonicida*'ya ait lipopolisakkaritlerin Atlantik salmonu (*Salmo salar*)'nda immunostimulant olarak kullanılabilceğini bildirmişken, Acosta ve ark. (2004), *Vibrio anguillarum*'a ait bu antijenlerin aynı balık türünde antikor seviyesini arttırdığını ve aşı çalışmalarında kullanılabilceği rapor etmişlerdir.

Lipopolisakkarit gram negatif bakterilerin hücre duvarının bir komponentidir, bakteri öldüğünde ya da çoğaldığında ortaya çıkmaktadır (Sant'anna ve ark., 2008). LPS'nin gerçek toksit etkisinden Lipid A'nin sorumlu olduğu bilinmektedir (Baba ve ark., 1988; Paterson and Fryer, 1974). Lipopolisakkarit lipid A bileşeni birçok inflamatuvar öncü hücreyi aktive etmektedir (Salyers ve Whitt, 1994)

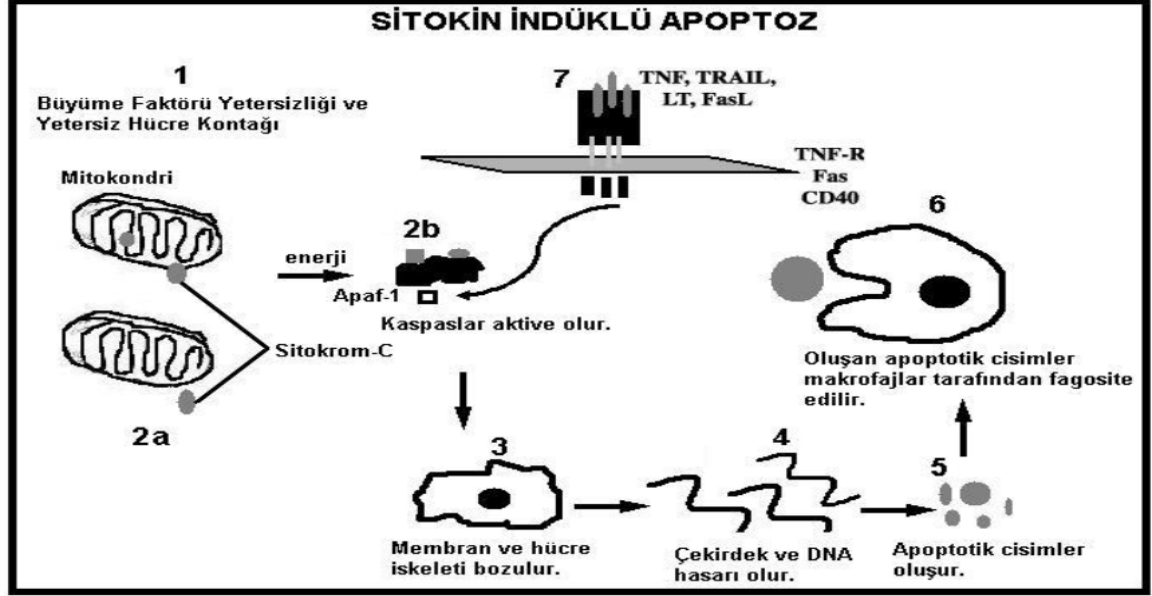


**Resim 1.1.** LPS'nin yapısı (URL-1, 2015)

Mikroorganizmaların, organizmada en önemli hedef hücreleri endotel hücreleri, glial hücreler, makrofajlar, lenfositler ve diğer parankimal hücrelerdir. Mikroorganizmanın değişik antijenik yapılarına veya toksinlerine bu hücreler enflamatuvar yanıt oluştururlar. Endotoksin molekülü hücre membranında kaldığı sürece biyolojik olarak inaktiftir, ancak hızlı hücre bölünmesi ve hücre yıkımı sırasında salıverilir (Ortatatlı ve ark., 1999)

Apoptoz istenmeyen hasarlı ve hastalıklı hücrelerin bertaraf edilmesini sağlayan bir savunma sistemidir (Degterev ve ark., 2003). Apoptozda mitokondrin oksidatif yanıtı olarak membran geçirgenliği artar ve hücrede programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozun ölüm sinyalleri uyarılmış olur (Jurgensmeir ve ark., 1998; Shimizu ve ark., 1999). Sitozele salınan cyt-c, apoptotik proteazı aktive eden faktör (APAF-1), prokaspaz-9 ve ATP' den oluşan bir kompleks yapı meydana getirerek apoptozum olarak bilinen sitozelde apoptozik cisimciklerin oluşumuna neden olur. Aktif kaspaz 3'ün aktivasyonunu takip eden prokaspaz 9 otoaktivasyonuna neden olur. Aktif kaspaz 3 tarafından aktive edilen DNAaz enzimlerini uyararak apoptoz sürecinin yine başlıca belirteçlerinden olan DNA kırıklarına neden olur (Choi ve ark., 1998). Bununla birlikte diğer bir apoptoz yolağında özellikle TNF- $\alpha$  uyarımlı FAS ligand aktivesi sonucu şekillenmektedir. Hücre içi aktif FASL molekülleri

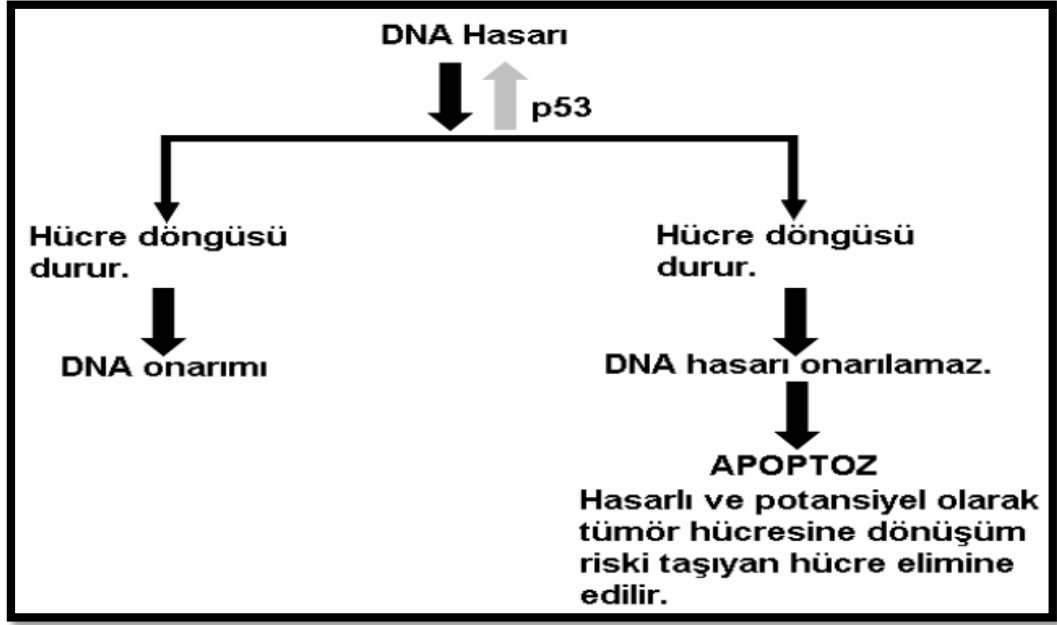
kaspaz-8 uyarımlarına bağılı olarak prokaspaz 3'ü aktive ederek apoptoz sürecini başlatır (Boldin ve ark., 1996; Hirata ve ark., 1998).



**Resim 1.2.** Hücre ölüm reseptörlerinden bazılarının apoptozdaki rolü (Leach, 1998).

Gram negatif bakterilerin hücre membranında bulunan LPS veya endotoksin, konak hücrede yangıyı uyarır (Benayoun ve ark., 2001; Knapp ve ark., 2006). Bununla birlikte hücrede oksidatif stresi uyarımlı apoptozun şekillenmesine neden olur (Rubenfeld, 2003). p53 geni tümör baskılayıcı genlerden biridir ve apoptozun düzenlenmesinde etkisi olan Bcl-2 gen ailesiyle ilişki halindedir. p53 geni transkripsiyonları sonucu proapoptotik olan bax ve BAK gibi proteinlerin aktivasyonunu sağlayarak hücre apoptozunu uyarır (Nakano ve Voudsen, 2001) LPS hücre içi yangı mediyatörlerinin uyarılmasını sağlayan transkriptör faktör NF-kB'yi uyarır. Bu uyarımlar p53 aracılı apoptoz sinyallerinin aktifleşmesini sağlar (Ryan ve ark., 2000).





**Resim 1.3.** p53 proteininin apoptoz üzerine etkisi (Altunkaynak ve Özbek, 2008)

Tıbbi ve aromatik bitkilerin pazar hacmi tüm dünyada hızlı bir artış göstermektedir. Evvelden yalnızca doğadan toplanmak suretiyle temin edilen tıbbi ve aromatik bitkiler talebin artmasıyla tarımına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır (Özguven ve ark., 2005). Aromatik bitkiler uzun yıllardır hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır. Son zamanlara kadar modern hayvan beslemede, aromatik bitkilerin büyüme uyarıcı ve antimikrobiyal olarak kullanımı pek dikkate alınmamıştır. Fakat büyümeyi uyarıcı antibiyotiklerin yasaklanmasından dolayı, günümüzde bitkisel ekstraktlar antibiyotiklere alternatif yem katkısı ve büyüme uyarıcı olarak önem kazanmaya başlamıştır. Coğrafi konum itibarıyla tıbbi ve aromatik bitki ticaretinde öncü olan Türkiye, ülke florasında zengin bir çeşitliliğe sahiptir. Bu tıbbi ve aromatik bitkiler antiseptik, antioksidan, sindirim uyarıcı, antimikrobiyal ve enzimatik etkiler göstermektedir (Yıldız ve Şener, 2003). Bitkisel ekstraktların faydalarını belirlemek ve gelecek için geçerli bir alternatif olabilmesi için çalışılmaktadır (Kamel, 2000).

Antibiyotiklere alternatif olarak düşünülen doğal bitkiler ve ürünleri (ekstrakt ve esansiyel yağ) uzun yıllardır birçok medeniyetçe kullanılmaktadır aynı zamanda sa yüzyıllardır bunlardan tıbbi amaçlarla yararlanılmaktadır. Bitkilerin yapısında yer alan alkaloidler, morfin, atropin ve kodein gibi modern ilaçların üretiminde, acımsı veya

aromatik bitkiler, sedative etkileri, antimikrobiyal özellikleri ve aynı zamanda sindirime yardımcı özsuların miktarını artırıcı, etkileri, saponin içeren bitkiler ise steroid benzeri etkileri, sarımsak ve turp ise antimikrobiyal etkileri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Anonymous, 2006).

Yapılan bir çalışmada Baydar (2005) kekik ekstratlarını çalışmış ve elde ettiği ekstratların zaman, ekstraksiyon yöntemi, hasat gibi işlemlere bağlı olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle ülkemizde antibiyotiklerin yerine alternatif olarak sunulan bitkisel ekstraktlar oldukça geniş bir kullanım potansiyeline ulaşmıştır ve ayrıca, organik tarımın yaygınlaşmaya başladığı ve güvenilir gıda maddeleri üretiminin önem kazandığı günümüz koşullarında, bu maddelerin hayvan ve insan sağlığı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi büyük önem arz etmektedir.

Lamiaceae familyası Türkiye'nin en zengin üçüncü familyası olup 45 cins olmak üzere toplam 731 takson ile temsil edilmektedir (Başer, 1994; Kocabaş ve ark., 2001). Bu familyanın önemli grubunu oluşturan ve dağların süsü anlamına gelen *Origanum* cinsleri aromatik olup, çoğunlukla baharat ve halk ilacı olarak kullanılabilir (Başer ve ark., 1994).

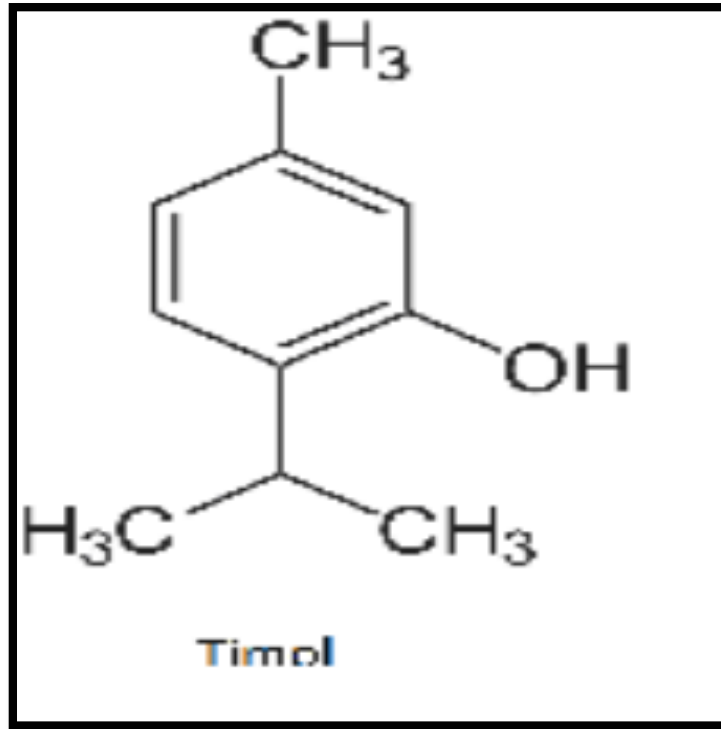


**Resim 1.4.** *Origanum vulgare* (URL-2, 2015).

Navarrete ve ark. (2010), gökkuşığı alabalığı üzerine yaptıkları 5 haftalık çalışmada esansiyel kekik yağı ve DNA'da ki bazı bölgelerin yerini değiştirerek oluşturdukları gruplarda mikrobiyal etkiyi araştırmışlardır. Gökkuşığı alabalıklarının intestinal bakteri popülasyonunda kekik yağının etkili olmadığını bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada, farklı çevrelerde ve yüksekliklerde yetişmiş kekiklerden elde edilen esansiyel yağlar incelenmiş ve yağların gram pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* ve *B. cereus*) ve gram negatif (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *S. thphimuim* ve *Pseudomonas aeruginosa*) bakterilere karşı antibakteriyel etki gösterdiği belirtilmiştir (Abutbul ve ark., 2004).

Origanum türleri uçucu yağlarında ana bileşenler olarak genellikle karvakrol ve timol taşır (Ravid ve Putievsky, 1986; Farag ve ark., 1989).

Timol (5-methyl-2-isopropylphenol) monoterpenler grubuna ait oksijenli bir aromatik bileşiktir (Şekil 2. 1). Timol fenolik zincirin farklı bir bölgesinde hidroksil gruba sahip olan karvakrola yapısal olarak çok benzemektedir (Lambert ve ark., 2001).



**Resim 1.5.** Timolün kimyasal yapısı (URL-3, 2015).

Timol, kekik (*Thymus vulgaris* L.) esansiyel yağının en önemli bileşenidir (Huma ve ark., 1999; Sanchez ve ark., 2004). Fenolik bileşenlere sahip olan timol birçok mikroorganizma (bakteri, küf ve mantar) için antibakteriyel etki göstermektedir. *In vitro* koşullarda yürütülen bir çalışmada *Salmonella sp.* ve *E. coli* karşı timolün güçlü bir antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir (Dusan ve ark., 2006; Michiels ve ark., 2007; Janczyk ve ark. 2008). Bagamboula ve ark. (2004) kekik ve fesleğen esansiyel yağları ve onların ana bileşenlerini (timol, p-cimen, karvakrol, linalol, estragol) *Shigella spp.* karşı agar difüzyon metodu ile belirlemişlerdir ve deneme gruplarının hepsinde *Shigella spp.* karşı inhibisyon etki gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Timol, eugenol ve nisin *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* ve *Listeria monocytogenes* suşlarına karşı antimikroyal aktivitesini MIC testi ile karşılaştıran Tippayatum ve Chonhenchob (2007) etkin bir antimikrobiyal etki saptamışlardır. Yapılan çalışmalarda % 78–82 timol içeren esansiyel yağların büyük ölçüde antioksidatif, antibakteriyel ve antifungal etki gösterdikleri bildirilmiştir (Frag ve ark., 1989; Sivropoulou ve ark., 1996). Araştırmacılar bu etkinlerin özellikle timol etken maddesinin gram negatif bakterilerin dış kabuğunu parçalaması ile lipopolisakkaritlerin serbest kalması ve ayrıca ATP için stoplazmik membranın geçirgenliğini arttırmasıyla sağladıklarını bildirmişlerdir (Juven ve ark., 1994; Helander ve ark., 1998; Soutos ve ark. 2009).

Kanal kedi balıkları üzerine yapılan bir diğer çalışmada balık yemlerine etkin dozlarda karvakrol, timol, karvakrol ve timol karışımı eklenerek deneme grupları oluşturulmuş ve büyüme performansları, hayatta kalma oranları ve yem dönüşüm oranı incelenmiştir. Deneme sonunda tüm gruplarda büyüme performansının, hayatta kalma oranının yüksek olduğu ve yem dönüşüm oranının azaldığı görülmüştür (Yıldız ve Şener, 2003). Yapılan bir diğer çalışmada gökkuşağı alabalıkları üzerinde LPS ile oluşturulan deneysel enfeksiyon sonrası, pro-inflamatuar sitokinlerdeki değişimlerle timolün etkinliği araştırılmıştır.

Bu çalışmada, kekik esansiyel yağının etken maddesi olan timolün antibakteriyel ve antioksidan etkinliğini araştırıldı. Bu amaç doğrultusunda *E. coli* LPS'si ile enfekte gökkuşağı alabalıklarının timol içeren yemle besleme sonrası, karaciğer dokusunda apoptozun uyarılmasını takiben oluşan hücre ölümlerinin tespiti çalışıldı. Özellikle apoptozun başlatılmasından ve devamından sorumlu olan CAS-3 ve CAS-8, aynı zamanda DNA tamir mekanizmasında görevli olan p53 gen düzeyleri karşılaştırmalı olarak incelendi ve RT-PCR metodu ile bu genlerdeki değişimler belirlendi.

## 2. MATERYAL ve YÖNTEM

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Balık

Çalışma materyali olarak kullanılan Salmonidae familyasından gökkuşuğu alabalığı (*O. mykiss*) ülkemiz iç sularında da sıklıkla yetiştiriciliği yapılan türlerin başında gelmektedir. Araştırma  $44.71 \pm 6.43$  g ortalama ağırlıklarına sahip olup 4 deneme grubu balık ile oluşturuldu. Her bir grupta 15 adet balık stoklanmış ve deneme grupları 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Stok havuzunda bulunan toplam 400 adet balıktan 264 adeti deneme gruplarının, 84 âdeti ise ön deneme gruplarının oluşturulmasında kullanıldı. Gökkuşuğu alabalığı Tunceli de bulunan yerel bir balık çiftlikten sağlanarak Tunceli Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Laboratuvarında hazırlanmış deney düzeneğine yerleştirildi ve iki hafta süreyle ortama adaptasyonları sağlandı.

Yapılan deneysel çalışmada bir enfeksiyon modeli oluşturulacağı için laboratuvarında kapalı sistem düzenek kurularak, herhangi bir enfeksiyon riski önlenildi. Deneme süresince su sıcaklığı, değerleri günlük olarak ölçüldü.

#### 2.1.2. Lipopolisakkarit - LPS (*E.coli* O55:B5 suşu endotoksini- Sigma/USA)

Deneysel dizayn için LPS enfeksiyon modeli oluşturuldu ve bu amaçla LPS (*Escherichia coli*, serotip O26:B6) (Sigma-Aldrich, St, Louis, CO) üç farklı konsantrasyonda (12.5, 25 ve 50 µg/ml) uygulanarak ön deneme düzenekleri hazırlandı. Ön deneme boyunca totalde 21 adet (n=7x3) balığa i.p. olarak LPS enjekte edildi. Kontrol grupları olarak çalışılan balıklar ise PBS ile enfekte edildi. Mortalite durumları 48 saat içinde izlenerek sublethal doz belirlendi (Tablo 2.1). Kontrol grupları ile karşılaştırılan 12,5 µg/ml deneme grubunda % 1,3 mortalite oranı saptandı. Diğer gruplarda ise 25 µg/ml için % 35, 50 µg/ml için % 75 mortalite gözlemlendi. Deneysel çalışma için sublethal doz 25 µg/ml olarak belirlendi.

**Tablo 2.1.** LPS enfeksiyonu

Mortalite Oranları (%)				
LPS Kons. ( $\mu\text{g/ml}$ )*	Grup (n=7)	Grup (n=7)	Grup (n=7)	Ortalama
12,5	1	2	1	1.3
25	32	39	34	35
50	70	80	75	75

\*48 saat sonunda ortalama değerler

### 2.1.3. Timol

Timol, toz halinde (ana stok miktarı, 1 g) olarak Sigma'dan sağlandı. Çalışmada kullanılan timol konsantrasyon oranı literatür taraması neticesinde 100 ppm (100 $\mu\text{g/ml}$ /1 kg yem) olarak belirlendi (Hashiem ve Abd El-Galil, 2012).

### 2.1.4. Deneysel Düzenek

Deneysel deneme düzeneği 4 grup ile oluşturuldu. Birinci grup kontrol grubu olarak sadece ticari balık yemi ile beslendi. İkinci grup enfeksiyon grubu olarak değerlendirildi ve *E. coli* lipopolisakkariti (ön çalışmalarla belirlenen sublethal doz değerine denk gelen konsantrasyondan 0,1 ml'lik doz, gökkuşağı alabalıklarına ventral yüzgeelerin orta noktasından i.p. enjekte edildi) ile enfekte edildi (Resim 2.1). Yemleme işlemine enfeksiyondan 1 gün sonra başlandı ve ticari balık yemi ile beslendi. Üçüncü grup balıklar enfekte edilmedi. Fakat timol destekli yem ile beslendi. Dördüncü grup ise enfekte balıklardan oluşturuldu ve timol destekli yemleme yapıldı. Deneme periyodu 48 saat sonunda

tamamlanarak akut değişimler saptandı (Resim 2.2 ve 2.3). Deneme süresi sonunda alınan karaciğer doku örneklerinden RNA eldesi sonucu Real Time-PCR yöntemiyle apoptotik sitokinlerin transkripsiyon düzeyleri ölçülerek timolün LPS ile oluşturulan enfeksiyon üzerinde antiinflamatuvar etkinlikleri karşılaştırmalı olarak ortaya konuldu.



**Resim 2.1.** LPS konsantrasyonun intraperitonel uygulanımı



**Resim 2.2.** Deneysel düzenek



**Resim 2.3.** Deneysel düzenek



**Tablo 2.2.** Deneme grupları

1.	<b>Grup</b> →	Kontrol grubu (C)
2.	<b>Grup</b> →	LPS ile enfekte grup (E)
3.	<b>Grup</b> →	Timol destekli diet grubu (T)
4.	<b>Grup</b> →	Enfekte balıkların timol destekli diet grubu (E+T)

### **2.1.5. Balıklardan Doku Örneklerinin Alımı ile Homojenat Hazırlama**

Denemelerin üçüncü gününde 2-Phenoxyethanol (0,4 ml/L) anestezi edilen ile balıklardan karaciğer doku örnekleri alındı (Lewbart, 2001). Örnekler soğuk PBS ile yıkanarak, poşetlenerek buz içerisine konuldu ve uygun koşullar sağlandı. Dokuların homojenizasyonu proteaz inhibitör (aprotinin, fenilmetansülfonilflorid (PMSF), leupeptin, sodyum florid (NaF) ile sağlandı. Daha sonra örnekler sitoplazmik içeriklerinden ayrıştırılarak ependorf tüplere konularak 12000 g, 4°C’de 10 dakika santrifüj edildi. Homojenatlardan elde edilen süpernatantlardaki protein düzeyleri Bradford metodu ile tespit edildi. Plazma ve homojenatlar analize kadar -86°C’de saklandı.

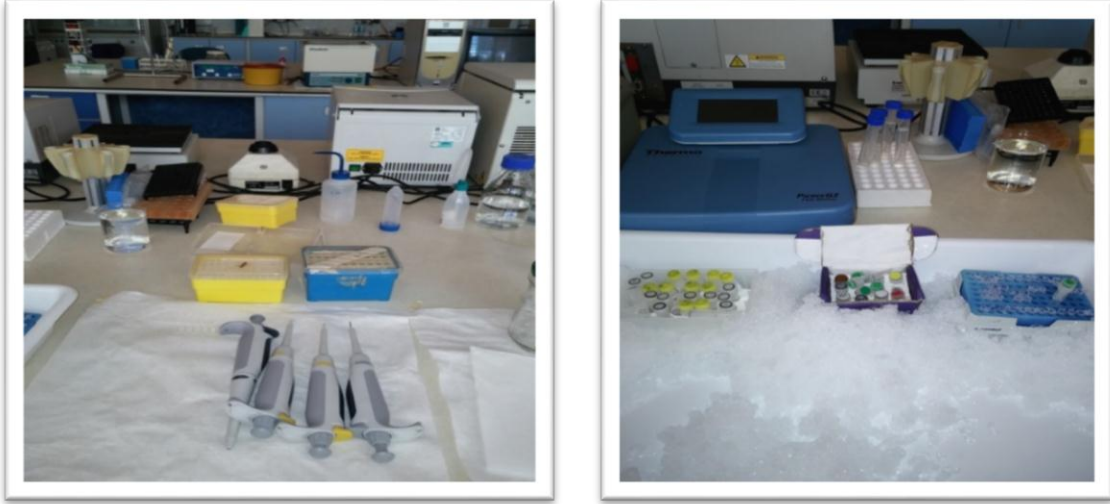
## **2.2. Yöntem**

### **2.2.1. Sitokin Gen Ekspresyon Analizleri**

#### **2.2.1.1. RNA İzolasyonu**

Moleküler analizlerde kullanılacak RNA eldesi için, yaklaşık 100 mg doku steril ependorflar (nükleaz free-ependorf) içerisine alınıp, üzerine 1 ml RNA izolasyon reaktifi (Trizol Reagent, Sigma-USA) konuldu ve vorteksle karıştırıldı. Homojenat oda ısısında 5 dakika bekletildikten sonra 12,000 g, 4° C’de 10 dakika santrifüj edilerek, açık renkli

süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı. Oda ısısında 5 dakika bekletildikten sonra herbir örneğin üzerine 0,2 ml kloroform ilave edilip, 15 saniye süreyle vortekste karıştırıldı. Oda ısısında 15 dakika bekletildikten sonra örnekler 12,000 g, 4°C’de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan üç fazdan üstteki renksiz faz (RNA içerir) yeni bir ependorf tüpe alınıp, üzerine 0,5 ml izoprapanol ilave edildi. Tüpler oda ısısında 5–10 dakika süreyle tutulduktan sonra 4°C 12,000 g 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Pelet üzerindeki süpernatant alınıp pelet RNA % 75’lik etil alkol ile yıkandı. Vorteks edilip, 7,500 g’de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra RNA 10–15 dakika süreyle havada kurutulup 50–100 µl su (DEPC water-dietilpirokarbonatlı su) RNA peleti üzerine ilave edilip, birkaç kez pipetlenerek çözünmesi sağlandı. Total RNA miktarı ve saflığı spektrofotometrede (OD260 ve OD280 nm absorbanslarda) ölçüldü. RNA/DNA oranı 1,7-2,0 aralığındaki örneklerin saflığı yüksek kabul edilip cDNA (komplementer DNA) sentezinde kullanıldı.



**Resim 2.4.** RNA izolasyonunun gerçekleştirildiği laboratuvar ortamı (malzemeler, örneklerin hazırlanması, muhafazası vb. )

### 2.2.1.2. cDNA(komplementer- tamamlayıcı DNA) Sentezi

Elde edilen total RNA’dan hazır cDNA sentez kiti ile (Fermentas-USA); otoklav edilmiş 0,5 ml eppendorf tüplere 2 µg/ml total RNA, 1 µl oligo (dT)18 primer konulup 12 µl’ye DEPC uygulanmış su ile tamamlandı. Karışım 3–5 saniye 13,000 g’de santrifüj edilip termal sayıklarda 70°C’de 5 dakika reaksiyona tabi edildi. Süre sonunda karışım buz

içinde soğutulup, santrifüj edildi ve tüpün dibinde toplanması sağlandı. Tüpün üzerine 5x reaksiyon tampon çözeltisi, ribolock ribonülease inhibitör (20 U/ $\mu$ l) ve 10  $\mu$ l dNTP karışımı konulup karıştırıldı ve 10 saniye santrifüj edilerek ve termal saykırda 37°C’de 5 dakika tutuldu. Tüplere 1  $\mu$ l revertAid m-multi-v reverz transkriptaz ilave edildi. Termal saykırda 42°C’de 60 dakika süre ile RNA’lar cDNA'ya dönüştürüldü. cDNA sentezinin tamamlanması için tüpler 70°C’de 10 dakika inkübe edildikten sonra PCR metodu için kullanımına hazır hale getirildi ve örnekler kullanılıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

### **2.2.1.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR)**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi, genetik materyaller (DNA ve RNA) üzerinde seçilmiş bir bölgenin *in vitro* şartlar altında ilgili gen bölgelerine spesifik oligonükleotid primerler ve *Taq* polimeraz enzim kullanılarak bir otomatik termal saykırda çoğaltılması metodudur. PCR reaksiyonunda temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır. Birincisi denatürasyon (DNA çift zincirinin açılması), ikincisi primerlerin spesifik oldukları gen bölgesine yapışması (annealing) ve üçüncüsü ise zincir uzaması (extention)’dır. Spesifik olmayan yapışmaların olmaması için döngü sayısı genellikle 30–40 olacak şekilde sınırlandırılır. Real Time PCR sisteminde Syber Green (Fermentas, Germany) boyası çift iplikcikli DNA parçasına bağlanarak elektriksel impuls ile birlikte floresan ışımaya yapar ve bu ışımaya sistemin lazer dedektörü tarafından alınarak bilgisayar ortamında grafik formatına çevrilir. Ölçülen floresans şiddeti PCR ürününün miktarı ile doğru orantılıdır.

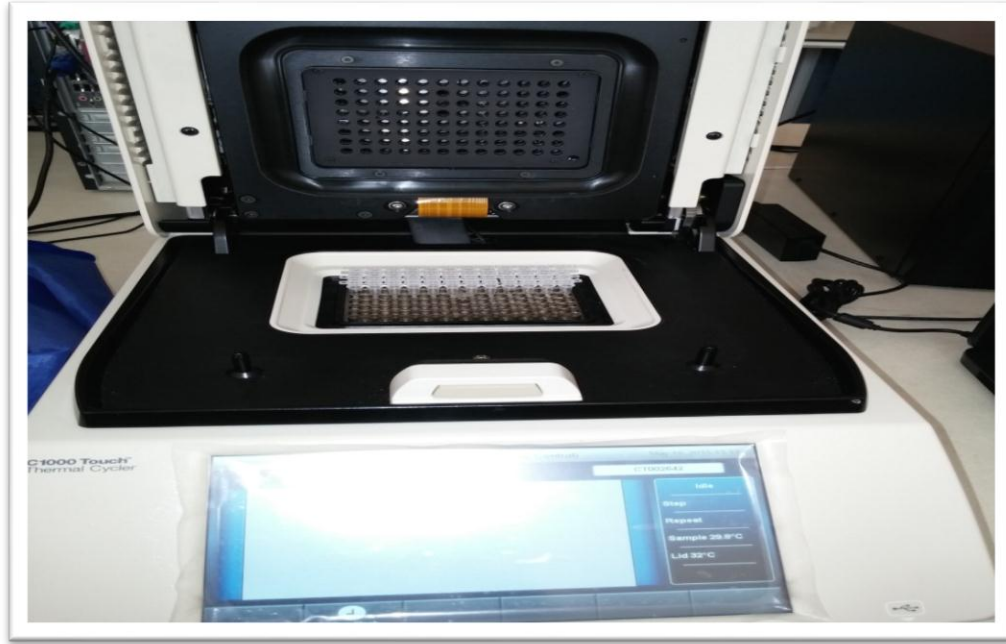
Reaksiyonda 100 ng düzeyinde CAS-3, CAS-8 ve P53 spesifik primerleri literatürde belirtilen baz dizgeleri sentezlettirilerek kullanıldı (Tablo 2.3.). Bu genlerin ekspresyon seviyeleri Real Time-PCR sistemi kullanılarak tespit edildi (Şekil 2.6 ve 2.7).

**Tablo 2.3.** PCR analizlerinde kullanılacak primer baz dizgeleri (*Oncorhynchus mykiss* spesifik)

Transkript	Primer sekansları	
CAS-3	Reverse Forward	5' CCGACTCCAACCTCCAACACTA 3' 5' TTGCTGGAGAGTGCTGTGGAAGAA 3'
CAS-8	Reverse Forward	5' TCA CTG TCC TCA AAC GTG 3' 5' GCT GTT CAA CGG AAA ACC TGT TT 3'
P53	Reverse Forward	5'-CTG AAG GGT GAA ATA TTC TCC- 3' 5'-TGC CCT ATG AGC CGC CTG AG - 3'
GAPDH	Reverse Forward	5' TCCTC,GATGC,CGAAG,TTGTC,G 3' 5' ATGTC,AGACC,TCTGT,GTTGG 3'



**Resim 2.5.** Transkripsiyon analizlerinde kullanılan Real-Time Sistem (Bio-Rad)

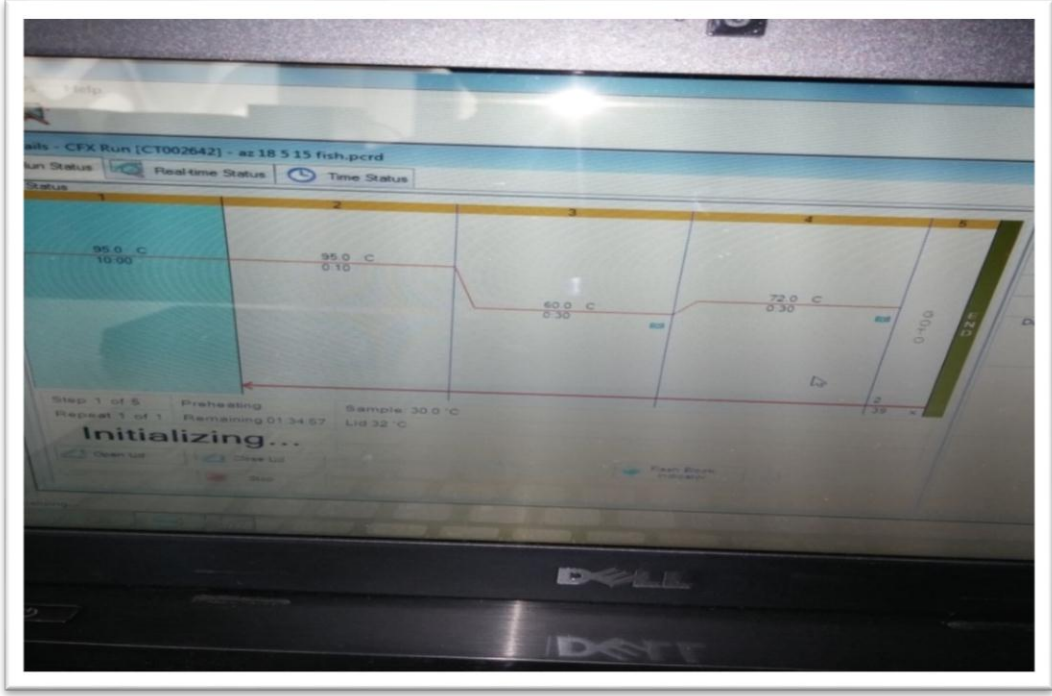


**Resim 2.6.** Doku örneklerinin Real-Time Sisteme yerleştirilmesi

Amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait kopya eşiği (Ct) değerleri karşılaştırılarak, hedef genlerin mRNA transkripsiyon düzeylerinin nisbi değişimleri  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metodu ile hesaplandı (Paffl, 2001). Daha sonra gruplar arasındaki farklar relatif misli değişimler cinsinden tablolarda verildi (Şekil 12).

$$\Delta\Delta C_t = (C_t \text{ hedef gen} - C_t \text{ GAPDH}) \text{ denek grubu} - (C_t \text{ hedef gen} - C_t \text{ GAPDH}) \text{ kontrol grubu}$$

Her örnek için kontrol gen olarak kabul edilen GAPDH geni (house-keeping gen) düzeltme için kullanılarak transkripsiyon seviyesi istenilen genlerdeki transkripsiyon seviyeleri hesaplanarak kaydedildi. Real Time PCR sisteminde Syber Green (Fermentas, Germany) boyası çift iplikçikli DNA parçasına bağlanarak elektriksel impuls ile birlikte floresan ışımaya yapar ve bu ışımaya sistemin lazer dedektörü tarafından alınarak bilgisayar ortamında grafik formatına çevrilir. Ölçülen floresans şiddeti PCR ürününün miktarı ile doğru orantılıdır. Daha sonra gruplar arasındaki farklar misli (katı) cinsinden tablolarda verildi.



**Resim 2.7.** Amplikasyon sıcaklık değerleri

## 2.2.2. İstatistiksel Analizler

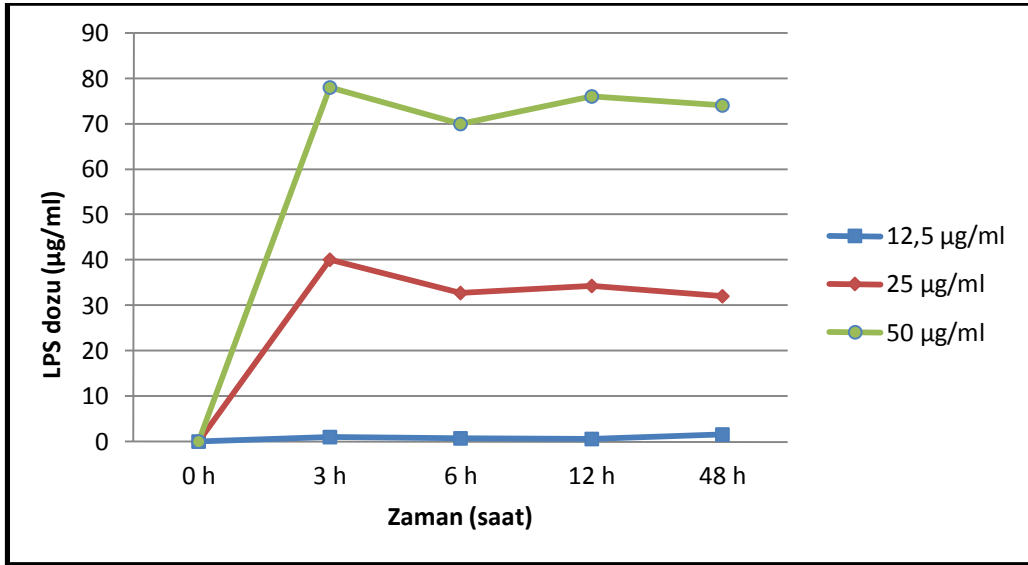
Araştırmada elde edilecek veriler, SPSS 9.05 (Statistical Package for Social Sciences) programında, One-way ANOVA varyans analizi yöntemi kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar Duncan testi ile belirlendi.  $p < 0.05$  ve altı istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Değerler ortalama  $\pm$  standart hata (S.E) şeklinde verildi.

### 3. BULGULAR

Çalışmada Salmonidae familyasından gökkuşacağı alabalığı (*O. mykiss*) kullanıldı. Deneysel balıkların ortalama uzunluğu  $16,57 \pm 1,79$  cm, ortalama ağırlığı ise  $44,71 \pm 6,43$  gr olarak belirlendi. Toplam 264 balık ile yürütülen çalışmada deneme boyunca su sıcaklığı, pH, çözülmüş oksijen değerleri  $15.5$  °C, 8.01, 9,57 mg/L olarak saptandı.

#### 3.1. LPS İnfeksiyon Modeli

Ön çalışmalarla sublethal doz belirlemek için *E. coli* lipopolisakariti üç farklı konsantrasyonda (12.5, 25 ve 50 µg/ml) uygulandı. Mortalite oranları günlük olarak izlenerek kaydedildi. 48 saat sonra deneysel grupların herbiri kontrol grubu ile karşılaştırıldı ve elde edilen veriler ise şekil 3.1’de gösterildi. İlk grupta (12,5 µg/ml) % 1,3 mortalite oranı saptandı. Diğer gruplarda ise 25 µg/ml için % 35, 50 µg/ml için % 75 mortalite oranları gözlemlendi. Sublethal doz olarak 25 µg/ml, deneysel infeksiyon dozu olarak belirlendi (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. LPS sublethal konsantrasyonu (doz-zaman)

Balıklardan LPS enjeksiyonu sonrası böbrek örnekleri alındı ve nutrient (NA) ve triptik soy agar (TSA) besi yerlerine ekimleri yapıldı ve uygun inkübasyon süresi sonunda koloni morfolojileri incelendi (Resim 3.1).



**Resim 3.1.** TSA besiyerinde üreme (orijinal)



LPS uygulandı sonunda balıklarda meydana gelen postmortem değişiklikler fotoğraflarak gsterildi (Resim 3.2 ve 3.3).



**Resim 3.2.** LPS uygulanan balıkta renkte koyulaşma (orijinal)

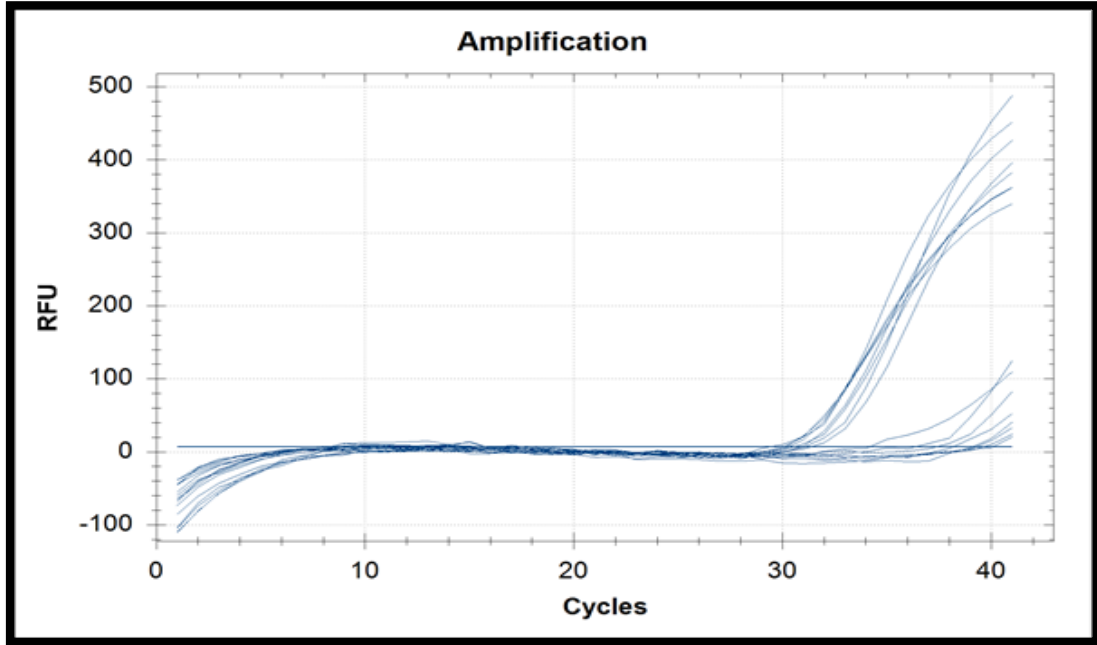


**Resim 3.3** LPS uygulanan balıkta operkulum çevresinde hemoraji (orijinal)

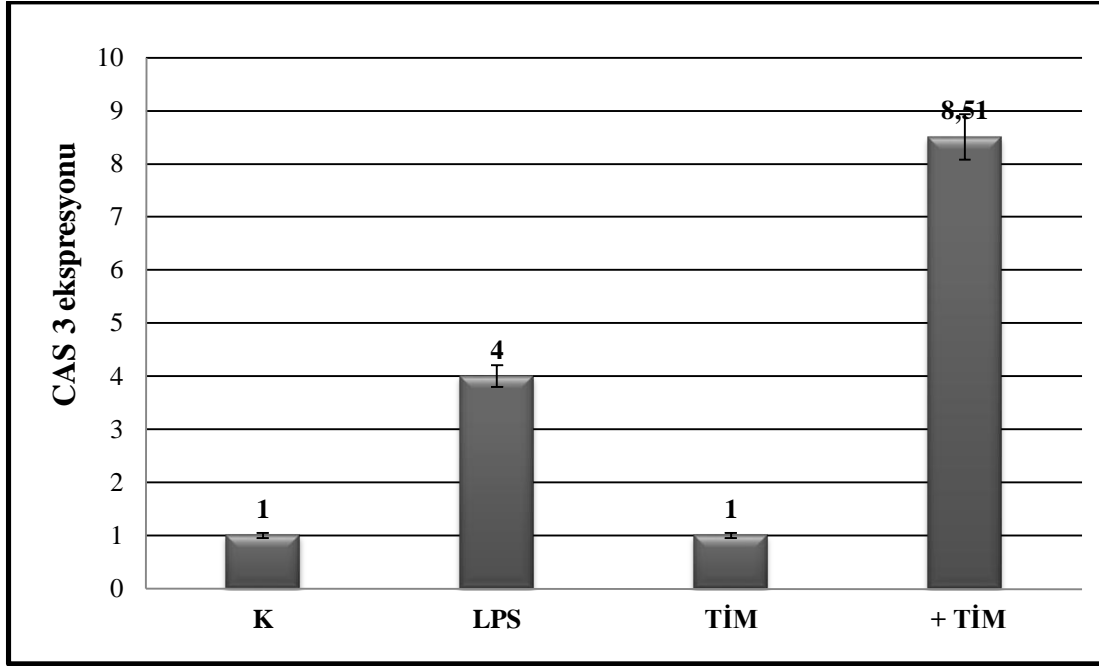
### 3.2. Dokularda Sitokin mRNA Transkripsiyon Düzeyleri

Bu çalışmada, 25 µg/ml *E. coli* LPS'si ile enfekte edilen balıklardan enfeksiyonun 3. gününde karaciğer ve böbrek örnekleri alınarak bu örneklerde RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. Real time PCR analizleriyle apoptoz belirteçlerinden olan kaspaz ailesinden CAS-3, CAS-8 ve p53 gen ekspresyon düzeyleri belirlendi. CAS-3, CAS-8 ve p53 genlerine spesifik dizayn ettirilen primerlerin en uygun yapışma (annealing) sıcaklıkları 55-60 °C arasında farklı ısı dereceleri uygulanarak, gradient PCR yöntemiyle saptandı.

Gradient PCR uygulandığında CAS-3 ve CAS-8 genleri için en iyi primer yapışma ısılarının sırasıyla 60,2 ve 60,1 °C olduğu tespit edildi (Şekil 3.2 ve 3.4). Apoptoz indükleyici genlerinden olan CAS-3 karaciğer dokusu ekspresyon seviyeleri LPS uygulanan grupta kontrol grubuna göre 4 misli değişimlerle uyarırken timol eklenen grupta değişim tespit edilmedi. Bununla birlikte timol preinkübasyonundan sonra LPS eklenen grupta ise bu gen ekspresyonu 8,51 misli değişimlerle indüklendiği ortaya konuldu (Şekil 3.3).

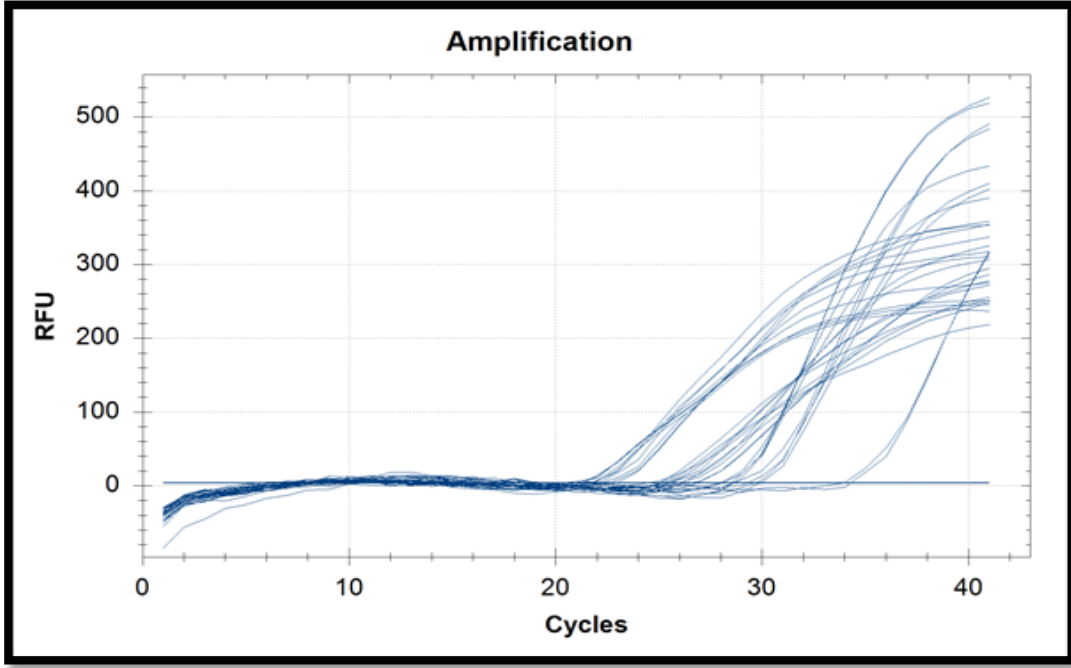


Şekil 3.2. CAS-3 gen gradient PCR amplifikasyon eğriler

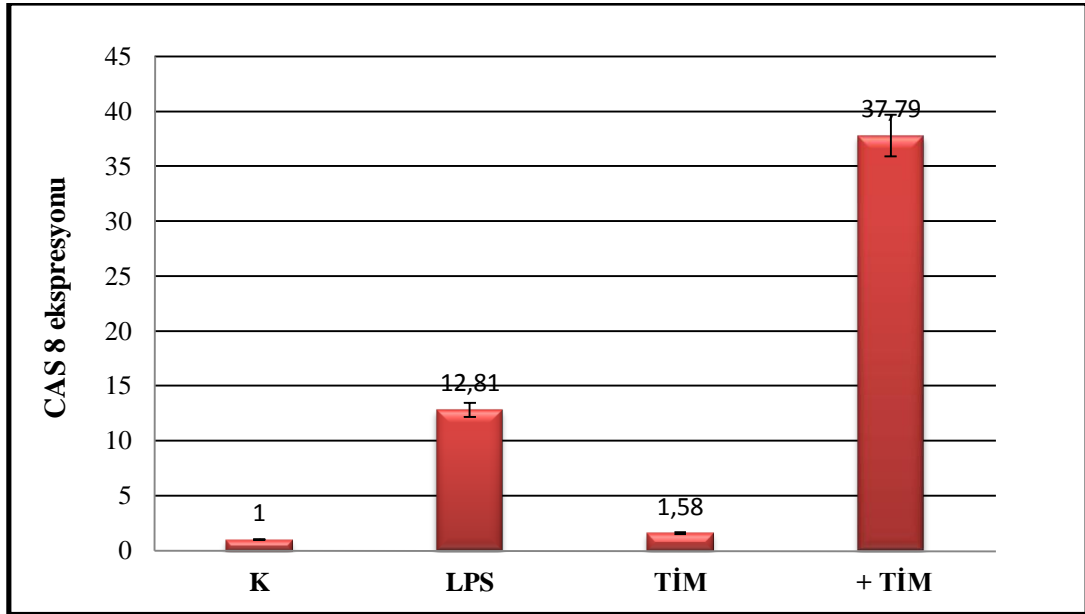


Şekil 3.3. Karaciğerde CAS-3 mRNA transkripsiyon seviyeleri

Araştırmada fas ligand uyarımlı CAS-8 ekspresyonu kontrol grubuna göre sırasıyla LPS ve Timol gruplarında 12,81 ve 1,58 misli değişimlerle uyarıldığı tespit edildi. Bununla birlikte timol ön uygulaması yapıldıktan sonra LPS enjeksiyonu CAS-8 ekspresyonunu 37,79 kat (misli değişim) indüklediği de şekil 3.5'te gösterildi.



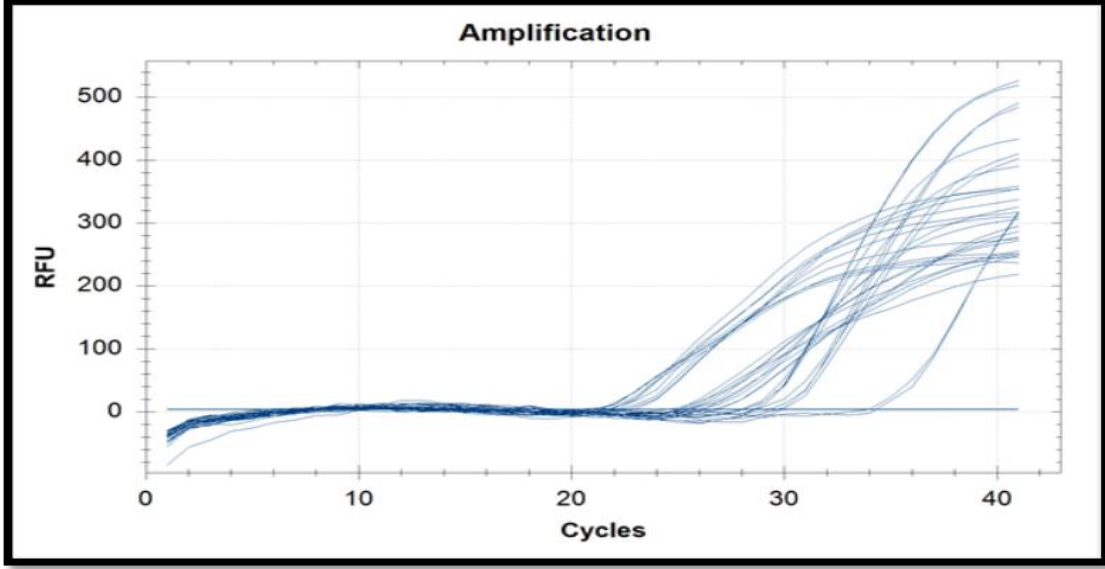
Şekil 3.4. CAS-8 gen gradient PCR amplifikasyon eğrileri



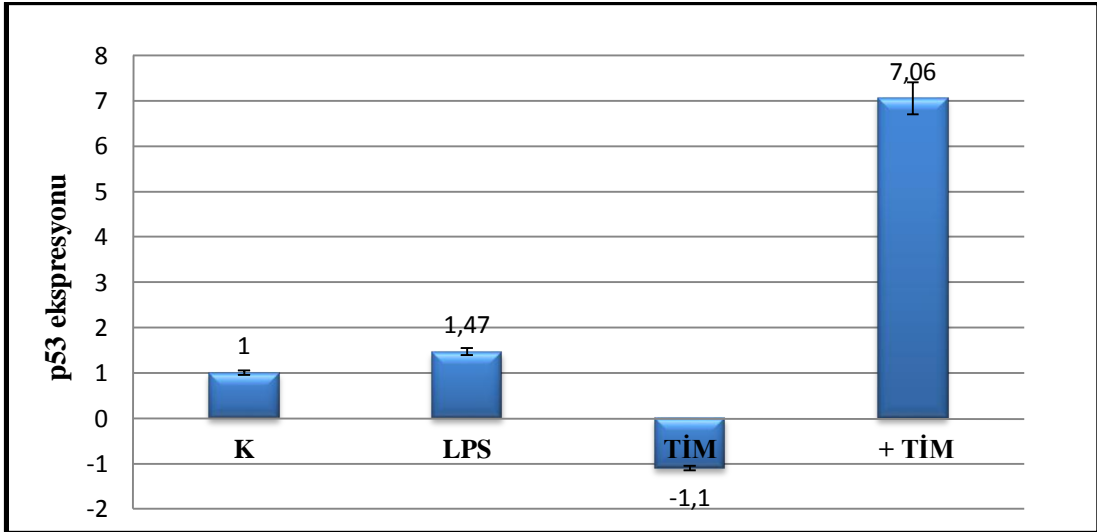
Şekil 3.5. Karaciğerde CAS-8 mRNA transkripsiyon seviyeleri

p53 geni için en iyi primer yapışma ısısının 60,5 °C olduğu tespit edildi (Şekil 3.6). p53 gen ekspresyonu ise LPS tarafından kontrol grubuna göre 1,47 kat uyarılırken, timol'ün

1,1 kat baskıladığı bulundu. Ancak timol preinkübasyonu sonrası LPS eklenen grupta ise 7,06 kat ekspresyon artışı tespit edildi (Şekil 3.7).



Şekil 3.6. p53 gen gradient PCR amplifikasyon eğrileri



Şekil 3.7 Karaciğerde p53 mRNA transkripsiyon seviyeleri

Elde edilen verilere göre uygulanan konsantrasyonlarda LPS karaciğer dokusunda apoptozu uyararak hücre ölümlerine neden oldu. Bununla birlikte en dikkat çekici bulgunun

ise timolün CAS-3 ve CAS-8 ekspresyonlarında tek başına kullanımlarında değiştirmezen, LPS gibi toksik bir maddenin hücrelerde meydana getirdiği hasarın uyarımıyla etkilenen hücrelerde anlamlı derecede hücre apoptozunu indüklediği tespit edildi. Yine araştırmadan elde edilen diğer bir sonuca göre hasarsız hücrelerde inaktif olan p53 geninin timol tarafından ekspresyonunun baskılanması sağlıklı hücrelerde koruyucu etkinliğinin olduğunu, ancak LPS uyarımına bağlı şekillenen hasar durumunda ise etkisiz kalarak DNA tamir mekanizmasını yeterli düzeyde sağlayamadığı gösterildi.

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

En hızlı büyüyen gıda üretim sektörlerinden birisi olan su ürünleri yetiştiriciliği açlığın önlenmesi, dengeli ve sağlıklı beslenme, istihdam, döviz girdisi sağlanması, kırsal kalkınmaya katkısı gibi nedenlerle önemli bir sektördür. Kırsal alanlarda, iç sularda üretim tesislerinin %50'sini alabalık işletmeleri oluşturmaktadır. İşletmelerde oluşabilecek stres faktörlerine (su kalitesinde bozulmalar, yoğun stok, hastalıklara direnç vb.) karşı tolerans aralıklarının geniş olması yönüyle ülkemizde 1967'den beri soğuk su balıkları yetiştiriciliğinde baskın tür olarak gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792) yetiştiriciliği yapılmaktadır (Gülyavuz ve Ünlüsayın, 1999).

Alabalık yetiştiriciliğinde en önemli sorunlardan birisi olan hastalık problemleri patojenik mikroorganizmaların balıkların koruyucu bariyerlerini (mukus, epidermis) geçmesi, özellikle bağışıklık sistemlerini zayıflatması ile ortaya çıkmaktadır. Balıklar suda yaşayan canlılar olması sebebi ile içinde yaşadıkları suya bağımlı canlılardır. Bu nedendir ki suda oluşabilecek her türlü stres faktörü (su isteklerinin optimal şartların dışına çıkması, yoğun stok vb.) balık tarafından algılanmakta ve sağlığı (fizyolojik dengede bozulma) doğrudan etkilemektedir (Roberts, 2012; Austin ve Austin, 2012)

Lipopolisakkarit, Gr - bakterilerin dış membran komponenti olup endotoksik etkiden sorumludur (Van Amersfoort ve ark., 2003). Lipopolisakkaritin patolojik etkisi endotelial hücreler ve makrofajlar arasındaki ilişki sonucu olmaktadır. Lipopolisakkarit, doğrudan bağışıklık sistemini aktive eder. Bu olay hücre duvarının lizisi ile sonuçlanabilir (Pastoret ve ark., 1998; Ellis, 1999). Yapılan bir çalışmada zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarına *E. coli* LPS (0111:B4)'i lethal ve sublethal konsantrasyonda uygulanmış ve LPS'ye bağlı immün aktivasyon araştırılmıştır. Lethal konsantrasyonda (150 µg/ml) larvalarda mortaliteler tespit edilmişken, sublethal konsantrasyona (50 µg/ml) direnç geliştirilmiştir (Novoa ve ark., 2009). Gökkuşacağı alabalıklarından izole edilen Gram-negatif karakterdeki bakterilerin identifikasyonu ve bu izolatların LPS profillerinin tespiti üzerine yapılan bir çalışmada ise, LPS uygulanımı sonrası hasta balık örneklerinin dış bakı muayenesinde genel olarak deride pul kaybı, yüzgeçlerde erime, vücut yüzeyinde hemoraji ve ülserlerle seyreden bakteriyel hemorajik septisemi tablosu gözlenmiştir (Akaylı ve ark., 2015). Lipopolisakkarit doz-zaman çalışmalarında elde ettiğimiz veriler (pul kaybı, kuyruk ve sırt kısmında meydana

gelen hemorajik odaklar ile gözlerde gözlenen kızarıklıklar) Akaylı ve ark. (2015)'nin çalışmaları ile benzerlik göstermektedir.

Türkiye'nin birçok bölgesinde intensif balık yetiştiriciliğinin artmasıyla paralel seyir izleyen hastalık problemleri bu sektörün gelişimini kısıtlayan en büyük sorunlardan birisidir. Özellikle yoğun stok, çevresel isteklerin uygunsuzluğu veya ani değişimi, suda oluşabilecek her türlü stres faktörü yetiştiricilik ünitelerinde balık hastalıklarının birincil etkenlerini oluşturmaktadır. Bu durumlar neticesinde görülen balık ölümleri, büyümede yavaşlama gibi problemler ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle balık yetiştiriciliğinde hastalıklara karşı etkin tedavi yöntemlerinin belirlenmesi önemlidir.

Balık yetiştiriciliğinde bakteriyel enfeksiyonların sağaltımında veya kontrolünde yemlere ve sulara katılarak yada enjeksiyon yolu ile antibiyotik (antibakteriyel ilaçlar) kullanımının eskiden beri yaygın olduğu bilinmektedir (Schnick ve ark., 1997). Fakat bu antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımı çevre, balık ve insan sağlığı açısından birçok olumsuz etkiye neden olmaktadır. Son yıllarda artan hastalıklara karşı sentetik yapıli ilaçlar ve terapotik maddelerin yetersiz kalması ve yan etkilerinin saptanması, infeksiyöz etkenlerin tedavisi için kullanılacak doğal, güvenilir ve ucuz ürünlerin kullanılma zorunluluğunu arttırmıştır. Birçok bilim insanı, bu nedenle özellikle bitkilerden elde edilen doğal maddelerin kullanımının balık hastalıklarının tedavisinde etkili olduğuna dikkat çekmektedir (Toroğlu ve Çenet, 2006).

Ekonomik olarak önemli olan kekik (*Origanum vulgare*) ülkemizde de birçok yörede yetişmektedir (Baytop, 1963). Kekikleri diğer bitkilerden ayıran en büyük özellik uçucu yağında bulunan timol ve karvakroldur. Fenolik maddelerden olan timol antiseptik özelliğiyle önemli bir etken maddedir. Keklik yağının başlıca bileşenleri olan timol ve karvakrolün inhibe edici etkisi hücre zarı geçirgenliğinin zarar görmesinden kaynaklanmaktadır. Bu maddeler pH ve inorganik iyon dengesini etkilemektedir (Lambert ve ark., 2001). Sari ve ark. (2006) yüksek oranda timol içeren *Oreganum glandulosum* türünün güçlü bir antioksidan olduğu, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. hirae*, *C. albicans*, *C. tropicalis* gibi bakteri ve funguslara karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Yanishlieva ve ark. (1999) yapmış oldukları çalışmada, timol'ün lipidlerde karvakrolden daha iyi bir antioksidan olduğunu tespit etmişlerdir. Gökkuşığı alabalıkları üzerinde yapılan bir çalışmada oluşturulan bir grupların dietlerine 550 ppm *Origanium vulgare* esansiyel yağı eklenmiştir. Çalışma sonucunda esansiyel yağ ilave edilen yemle



beslenen gruptaki büyümenin ve yem dönüşüm oranının kontrol grubuna göre daha iyi bir seviyede olduğu görülmüştür (Turi ve ark., 2009).

Apoptozis mitokondri aracılı içsel ya da ölüm reseptörleri aracılı dışsal uyarımlar aracılığı ile inaktif kaspazların aktive edilmesiyle uyarılmakta ve birçok infeksiyöz hastalığın patogenezinin bir bölümünü kapsamaktadır (Ashkenazi ve Dixit, 1998; Reed, 2000). Apoptoz bakteri gibi tek hücreli organizmalarda hücre ölümünün tek yoludur. Farklı virüs ve bakteriler immüne hücrelerin özellikle makrofajların apoptotik ölümünün aktivasyonu ile savunma mekanizmalarından kaçarak bir yaşam stratejisi geliştirmektedirler (Gao ve Kwaik, 1999; Gaddy ve Lyles, 2005; Hong ve ark., 2005; Santi ve ark., 2005; Carrero ve Unanue, 2006; Miyairi ve Byrne, 2006; Rojas ve ark., 2010).

Son yıllardaki araştırmalar, balık hastalıklarının patogenezinde apoptotik hücre ölümünün ve bunda rol oynayan kaspazların büyük öneme sahip olduğunu göstermektedir. (Hirata ve ark., 1998; Shimizu ve ark., 1999). Balıklarda enzimler ve apoptotik proses hakkındaki verileri kapsayan bu çalışmalarda özellikle kaspaz 3 geni zebra balıklarında (*Danio rerio*) çalışılmıştır (Yabu ve ark., 2001; Chakraborty ve ark., 2006; Eimon ve Ashkenazi, 2010). Ayrıca deniz çipurası (*Dicentrarchus labrax* L.), dere kaya balığı (*Gobio gobio*) ve alabalık (*Oncorhynchus mykiss*), salmon (*Salmo salar*) ve çipura (*Sparus auratus*) gibi bazı teleost türlerde de çalışmalar yapılmıştır (Reis ve ark., 2007; Nadzialek ve ark., 2010). Yapılan *in vitro* bir çalışmada, salmon balıklarının sistemik enfeksiyonu olan riketsial septisemi hastalığında apoptozisin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenerek makrofajlarda apoptozisin indüklendiği saptanmıştır (Rojas ve ark., 2010). Bir diğer çalışmada Soto ve ark. (2010) *Francisella asiatica* ile enfekte tilapialarda (*Oreochromis spp.*) baş böbrek makrofajlarında apoptozisi bildirmişlerdir. Levrekler üzerinde yapılan bir çalışmada ise *Vibrio anguillarum* ile enfeksiyon sonrası immün yanıt mekanizması apoptotik kaspazlar yönünden incelenmiştir. Kaspaz salınımında düşüşler saptayan araştırmacılar kaspazların aktivasyonu ile immün yanıtın güçlendiğini ve intrasellüler mikroorganizmaların yayılımını sınırlandırabildiği bildirmişlerdir (Sepulcre ve ark., 2007). Lipopolisakarit ile infekte balıklardan temin ettiğimiz böbrek doku örneklerinde CAS-3 ve CAS-8 ekspresyon seviyelerinde izlenen değişimler Sepulcre ve ark. (2007) çalışmalarıyla benzerlikler göstermektedir.

## 5. ÖNERİLER

Balık hastalıklarının tedavi ve kontrolünde çeşitli yöntemler ve özellikle kimyasal ürünler kullanılarak yapılmaktadır. Kimyasal kullanımlar, balık üreticilerinin pahalı olması nedeniyle ekonomik bulunmamaktadır. Bazı balık işletmelerinin aşırı ve bilinçsiz kimyasal kullanımı çevreyi ve ekolojik dengeyi olumsuz etkilediğinden, tıbbi bitkilerden faydalanılması buna bir çözüm getirebilir. Esansiyel yağların ana bileşiminden biri olan timolün balık patojenlerine karşı antimikrobial etkisini ortaya koymayı amaç edinen bu çalışmamızda, enfektif ajan olarak kullanılan *E. coli* LPS enfeksiyonu sonrası timol destekli yemleme yapıldı ve gökkuşağı alabalıklarında pro-inflamatuar gen ekspresyonlarındaki değişimler ortaya konuldu. Lipopolisakkarit enfeksiyonu ile oluşan yangısal durum timol destekli yemleme ile baskılandığı CAS-3, CAS-8 ve p53 karaciğer ekspresyonu seviyelerindeki inhibasyonlarla elde edildi.

Bu çalışma konu ile ilgili yapılan literatür taramalarında bir örnek teşkil etmektedir. Bakteriyel balık hastalıklarının tedavisinde doğal ürünlerin antibakteriyel, antioksidan etkinliği ile ilgili daha detaylı çalışmaların yapılması literatürde yer alan boşlukların doldurulmasına önderlik edecektir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abutbul S., Golan-Goldhirsh A., Barazani O., Zilberg D.,** 2004. Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis sp.*). *Aquaculture*, 238(1-4): 97-105.
- Acosta, F., Lockhart, K., Gahlawat, S.K., Real, F., Ellis, A.E.,** 2004. Mxexpression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to *Listonella anguillarum* bacterin, lipopolysaccharide and chromosomal DNA. *Fish&Shellfish Immunology*, 17: 255-263
- Aeschbach, R., Loliger, J., Scott, B.C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., Aruoma, O.I.,** 1994. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chemical Toxicology*, 26: 31-36.
- Akaylı, T., Çanak, Ö., Ürkü, Ç.,** 2015. Kültür gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'ndan izole edilen gram-negatif patojenlerin lipopolisakkarit profilleri. *Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research*, 1(2): 80-89.
- Akinbowale, O.L., Peng, H., Barton, M.D.,** 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *J. Appl. Microbiol.*, 100: 1103-1113.
- Altunkaynak, B. Z., Özbek, E.,** 2008. Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir?. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6 (2): 93 -104
- Anonim,** 2005. Kültür balıkları üretimi. Devlet İstatistik Enstitüsü Başkanlığı 2003 yıllık raporu.
- Anonim,** 2006. Extraction of the essential oil of lavender. [http://www.routes-lavande.com/about\\_lavender/stills.html](http://www.routes-lavande.com/about_lavender/stills.html).
- Anonim,** 2007. Türkiye İstatistik Kurumu (TUIİK). <http://www.tuik.gov.tr>.
- Aras, N.M., Kocaman, E.M., Aras, M.S.,** 2000, Genel su ürünleri ve kültür balıkçılığının temel esasları, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Yayınları, No: 216, Erzurum.
- Arda, M., Seçer, S., Sarıeyyüpoğlu, M.,** 2002. Balık hastalıkları. Medisan Yayınevi, Ankara, p. 1-36.
- Atay, D.,** 1987. İç su balıkları ve üretim tekniği. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara. p. 467
- Atay, D., Bayrak, M., Coşkun, F., Gözgözoğlu, E., Dede, H.,** 1997. Su ürünleri komisyon raporu. Türk Ziraat Yüksek Mühendisleri Birliği ve Vakfı, Ankara.

- Ashkenazi, A., Dixit, V.M.**, 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281: 1305–130.
- Austin, B., Austin, D.A.**, 2012. Bacterial fish pathogens: Disease of farmed and wild fish. 5th edition. Springer, New York. 978- 94-007-4884-2.
- Baba, T., Imamura, J., Izawa, K.**, 1988. Immune protection in carp, *Cyprinus carpio* L. after immunization with *Aeromonas hydrophila* crude LPS. *J Fish Dis*, 11: 237–244.
- Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M., Debevere, J.**, 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiol.*, 21: 33-42.
- Başer, K.H.C.**, 1994. Essential oils of Lamiaceae from Turkey: Recent results. *Lamiales Newsletter*, 3: 6-11.
- Başer, K.H.C., Özek, T., Kürkçüoğlu, M., Tümen, G.**, 1994. The essential oil of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* of Turkish origin. *J. Essent. Oil Res.*, 6 (1): 31-36.
- Baydar, H.**, 2005. Tıbbi, aromatik ve keyf bitkileri bilimi ve teknolojisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No: 51
- Baytop, T.**, 1963. Türkiye'nin tıbbi ve zehirli bitkileri. İ.Ü. Yayınları, İstanbul No:1039, Tıp Fakültesi, No:59, p. 351.
- Benayoun, L., Letuve, S., Druilhe, A.**, 2001. Regulation of peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  expression in human asthmatic airways: relationship with proliferation, apoptosis, and airway remodeling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(8): 1487-1494.
- Benchaar, C., Duynisveld, J.L., Charmley, E.**, 2006. Effects of monensin and increasing dose levels of a mixture of essential oil compounds on intake, digestion and growth performance of beef cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, 86: 91-96.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., Wallach, D.**, 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD interacting protease, in fas/Apo-1-and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, 85: 803-815.
- Bos, M.P., Tomassen, J.**, 2004. Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Current opinion in Microbiology*, 7: 610-616.
- Burka, J.F., Hammell, K.L., Horsberg, T.E., Johnson, G.R., Rainnie, D.J., Speare, D.J.**, 1997. Drugs in salmonid culture - a review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 20: 333-349
- Burt, S.**, 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foodsa review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94: 223–253
- Cabello, F.C.**, 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ. Microbiol.*, 8: 1137- 1144.

- Carrero, J., Unanue, E.,** 2006. Lymphocyte apoptosis as an immune subversion strategy of microbial pathogens. *Trends in Immunology*, 27( 11): 497-503.
- Chakraborty, S., Nandi, S., Sinha, S., Gera, V.,** 2006. Zebrafish caspase-3: Molecular cloning, characterization, crystallization and phylogenetic analysis. *Protein & Peptide Letters*, 13(6): 633- 640.
- Choi, S.I., Ju, W.K., Choi, E.K., Kim, J., Lea, H.Z., Carp, R.I., Wisniewski, H.M., Kim, Y.S.,** 1998. Mitochondrial dysfunction induced by oxidative stress in the brains of hamsters infected with the 263K scrapie agent. *Acta Neuropathol*, 96: 279–286
- Çelik, E., Çelik, G.Y.,** 2007. Bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyol Derg*, 5 (2): 1-6.
- Çelikkale, M.S.,** 1994. İçsu balıkları yetiştiriciliği, K.T.Ü. Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi, Trabzon, p. 419.
- Degterev, A., Boyce, M., Yuan, J.,** 2003. A decade of caspases. *Oncogene*, 22: 8543-8567.
- Diler, Ö., Demirkan, T., Altun, S., Çalkuşu, F.,** 1998. Fethiye Bölgesi’ndeki bazı alabalık işletmelerinde görülen Yersiniosis’in mevsimsel dağılımı üzerine bir araştırma. *Doğu Anadolu III. Su Ürünleri Sempozyumu*, Erzurum. p. 207-220.
- Dusan, F., Marian, S., Katarina, D., Dobroslava, B.,** 2006. Essential oils - their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicology in Vitro*, 20(8): 1435-1445.
- Ellis, A.E.,** 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol*, 9: 291-308.
- Eimon, P.M., Ashkenazi, A.,** 2010. The zebrafish as a model organism for the study of apoptosis. *Apoptosis*, 15: 331-349
- Farag, R.S., Daw, Z.Y., Abo-Raya, S.H.,** 1989. Influence of some spice essential oils on aspergillus parasiticus growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *J. Food Sci.*, 54: 74-76.
- Friedman, M., Henika, P.R., Mandrell, R.E.,** 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.*, 65: 1545-1560.
- Fulop, M., Manchee, R., Titball, R.,** 1995. Role of lipopolysaccharide and a major outer membrane protein from *Francisella tularensis* in the induction of immunity against tularemia. *Vaccine*, 13(13): 1220- 1225.
- Gaddy D.F., Lyles D.S.,** 2005. Vesicular stomatitis viruses expressing wild-type or mutant M proteins activate apoptosis through distinct pathways. *J Virol.*, 79: 4170–4179.

- Gao, L.Y., Abu Kwaik, Y.,** 1999. Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity. *Infect Immun.*, 67: 862-870.
- Gülyavuz, H., Ünlüsayın, M.** 1999. Su ürünleri işleme teknolojisi. Şahin Matbaa, Isparta, p. 366.
- Hashiem, M., Abd El-Galil, M.A.A.,** 2012. Fish microbiology dept. National Institute of Oceanography and Fisheries, Hurghada, Egypt. <sup>2</sup>Fish Dis. Dept., Faculty of Veterinary Medicine., Sohag Univ., Egypt. *Journal of American Science*, 8(4): 442-447.
- Helander, I. M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattilasandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L.G.M., Von Wright, A.,** 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 3590–3595.
- Hickling, C.F.,** 1971. Fish culture. Faber and Faber, London, p. 317.
- Hirata, H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, K., Sasada, M.,** 1998. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas –induced apoptosis. *J.Exp.Med.*, 187: 587-600.
- Holley, R.A., Patel, D.,** 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22: 273-292
- Hong, J.R., Huang, L.J., Wu, J.L.,** 2005. Aquatic birnavirus induces apoptosis through activated caspase-8 and -3 in a zebrafish cell line. *Journal of Fish Diseases*, 28(3): 133-140.
- Huma, F., Jaffar, M. And Masud, K. A.,** 1999. Modified potentiometric method for the estimation of phenol in aqueous systems. *Turk. J. Chem.*, 23: 415–422.
- İşgören, D., Elbek, A.G.,** 2006. Genel ekonomi ders kitabı. Su Ürünleri Fakültesi Yayın No: 73, Dizin: 35, İzmir.
- Janczyk, P., Trevisi, P., Souffrant, W., Bosi, P.,** 2008. Effect of thymol on microbial diversity in the porcine jejunum. *Int J Food Microbiol*, 126: 258–261
- Jurgensmeir, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q.,** 1998. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 95: 4997-5002.
- Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H.,** 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76: 626–631.
- Kamel, C.,** 2000. A novel look at a classic approach of plant extracts. Feed Mix, Special, pp. 19-21.

- Knapp, S., Florgun, S., Golenbock, D.T., Van Der, T.,** 2006. Pulmonary lipopolysaccharide (LPS) binding protein inhibits the LPS induced lung inflammation in vivo. *Journal of Immunology*, 176: 3189-3195.
- Kocabaş, Y.Z., Karaman, S.,** 2001. Essential oils of Lamiaceae family from South East Mediterranean Region (Turkey). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4: 1221-1222
- Koebnik, R., Locher, K.P., Van Gelder, P.,** 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology*, 37(2): 239-253
- Koul, O., Walia, S., Dhaliwal, G.S.,** 2008. Essential oils as green pesticides: Potential and constraints. *Biopestic. Int.* 4(1): 63–84
- Kum, C., Gökbulut, C., Akar, F., Kırkan, Ş., Sekkin, S.,** 2004. Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Enterococcus seriolicida* izolasyonu ve etkili antibakteriyel sağaltım seçeneğinin belirlenmesi. *Vet. Hek. Dern. Derg.*, 75: 47-53.
- Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.J.E.,** 2001. A study of minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 9: 453-462.
- Leach, A.P.,** 1998. Apoptosis: molecular mechanism for physiologic cell death. *Clin Lab Sci.*, 11(6): 346-9.
- Lee, S.J., Umamo, K., Shibamoto, T., Lee, K.G.,** 2005. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum L.*) and thyme leaves (*Thymus vulgaris L.*) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 91: 131–137.
- Lewbart, G. M. S.,** 2001. Anesthesia, analgesia, and surgery in pet fish, Atlantic Coast Veterinary Conference, 9-11 October 2001 Atlantic City, New Jersey, Proc. pp.1-6
- Lima De Faria, A.,** 1969. Hand book of molecular cytology. North-Holland Publications, Londra.
- Love, R.M.,** 1982. Basic facts about fish. In: Fish handling & Processing (Eds. A. Aitken, I.M. Mackie, J.H. Merritt & M.L. Windsor), Chap 2. Ministry of Agriculture, Fisheries & Food. Torry Research Station, Edinburgh. pp. 2-19
- Michiels, J., Missotten, J., Fremaut, D., De Smet, S., Dierick, N.,** 2007. In vitro doseresponse of carvacrol, thymol, eugenol and transcinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. *Livestock Science*, 109: 157-160.
- Miyairi, I., Byrne, G.I.,** 2006. Chlamydia and programmed cell death. *Current Opinion in Microbiology*, 9(1): 102-108.

- Moffitt, C.M., Mobin, S.M.A.,** 2006. Profile of microflora of the posterior intestine of chinook salmon before, during, and after administration of rations with and without erythromycin. *N. Am. J. Aquacult.*, 68: 176-185
- Nadzialek, S., Pigneur, L.M., Wéron, B., Kestemont, P.,** 2010. Bcl-2 and caspase-3 mRNA levels in the testes of gudgeon, *Gobio gobio*, exposed to ethinylestradiol (EE2). *Aquatic Toxicology*, 98(3): 304-310.
- Nakano, K., Vousden, K.H.,** 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell.*, 7(3): 683-94.
- Navarrete, P., Mardones, P., Opazo, R., Espejo, R., Romero, J.,** 2008. Oxytetracycline treatment reduces bacterial diversity of intestinal microbiota of Atlantic salmon. *J Aquat Anim Health*, 20: 177–183.
- Navarrete, P., Toledo, I., Mardones, P., Opazo, R., Espejo, R., Romero, J.,** 2010. Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on intestinal bacterial microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and bacterial isolates. *Aquaculture Research*, 41: 667–678.
- Novoa, B., Bowman, T. V., Zon, L., Figueras A.,** 2009. LPS response and tolerance on the zebrafish (*Danio rerio*). *Fish and Shellfish Immunology*, 26(2): 326-331.
- Ortatath, M., Özgüven, V., Şengül, A.,** 1999. Sepsis ve ağır infeksiyonların tanı ve takibinde yeni bir marker: Prokalsitonin. *Flora*, 4: 151-155.
- Özgüven, M., Sekin, S., Gürbüz, B., Şekeroğlu, N., Ayanoglu, F., Erken, S.,** 2005. Tütün, tıbbi ve aromatik bitkiler üretimi ve ticareti. *Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi*, Ankara.
- Pastoret, P.P., Griebel, P., Bazin, H., Govaerts, A.,** 1998. Handbook of vertebrate immunology. Academic Press, OH, USA.
- Paterson, W.D., Fryer, J.L.,** 1974. Immune response of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* to *Aeromonas salmonicida* cells administered intraperitoneally in Freund's complete adjuvant. *J. Fish Res. Bd. Canada*, 31: 1751–1755
- Pfaffl, M.W., Hageleit, M.,** 2001. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechn. Lett.*, 23: 275–282.
- Ravid, U., Putievsky, E.,** 1986. Carvacrol and thymol chemotypes of east Mediterranean wild labiate herbs. In: Progress in Essential Oil Research (Ed. E.J. Brunke), Walter de Gruyter, Berlin, Germany. pp. 163–167.
- Reed, J. C.,** 2000. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol.*, 157: 1415-1430.
- Reis, M.I.R., Nascimento, D.S., Do Vale, A., Silva, M.T., Dos Santos, N.M.S.,** 2007. Molecular cloning and characterization of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) caspase-3 gene. *Molecular Immunology*, 44(5): 774-783.



- Roberts, R.J.**, 2012. Fish pathology 4th edition. Wiley-Blackwell, 978-1444332827
- Rojas, V., Galanti, N., Bols, N.C., Jiménez, V., Paredes, R., Marshall, S.H.**, 2010. Piscirickettsia salmonis induces apoptosis in macrophages and monocyte-like cells from rainbow trout. *Journal of Cellular Biochemistry*, 110(2): 468-476
- Rubinfeld, G.D.**, 2003. Epidemiology of acute lung injury. *Critical Care Medicine*, 31: 276-284.
- Ryan, K.M., Ernst, M.K., Rice, N.R., Vousden, K.H.**, 2000. Role of NF- $\kappa$ B in p53 mediated programmed cell death. *Nature*, 404: 892-897.
- Sakai, M.**, 1999. Current sea status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.
- Salyers, A.A., Whitt, D.D.**, 1994. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. ASM Press. Washington, D.C., USA. pp. 260-268.
- Sanchez, M. E., Turina, A., Del, V., Garcia, D.A., Nolan, M.V., Perillo, M.A.**, 2004. Surface activity of thymol: implications for a potential pharmacological activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 34: 77-86.
- Sant'anna, A., Spolidorio, L., Ramalho, L.**, 2008. Analysis of the association between formalin and endotoxin in the subcutaneous tissue of mice. *Braz Dent J.*, 19: 40-45.
- Santi, N., Sandtrø, A., Sindre, H., Song, H., Hong, J.R., Thu, B., Wu, J.L., Vakharia, N. And Evensen, Ø.**, 2005. Infectious pancreatic necrosis virus induces apoptosis in vitro and in vivo independent of VP5 expression. *Virology*, 342: 13-25.
- Sari, M., Biondi, M. D., Kaa'beche, M., Mandalari, G., D'arrigo, M., Bisignano, G.**, 2006. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum*. *Desf. Flavour and Fragrance Journal*, 21: 890-898.
- Schnick, R.A., Alderman, D.J., Armstrong, R., Le Gouvello, R., Ishihara, S., Roth, M.**, 1997. World wide aquaculture drug and vaccine registration progress, *Bull Eur Ass Fish Pathol.*, 17 (6): 251-260.
- Sepulcre, M.P., López-Castejón, G., Meseguer, J., Mulero, V.**, 2007. The activation of gilthead seabream professional phagocytes by different PAMPs underlines the behavioural diversity of the main innate immune cells of bony fish. *Mol Immunol.*, 44: 2009-2016
- Shane, S.**, 2005. Antibiotic alternatives in Turkey production. *World Poult.*, 19: 14-15.
- Shimizu, S., Narita, M., Tsujimoto, Y.**, 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, 399: 483-487.

- Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S.,** 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 1202–1205.
- Solem, S.T., Jorgensen, J.B., Robertsen, B.,** 1995. Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology*, 5: 475-491.
- Soto, E., Fernandez, D., Thune, R., Hawke, J.P.,** 2010. Interaction of *Francisella asiatica* with tilapia (*Oreochromis niloticus*) innate immunity. *Infection and Immunity*, 78: 2070-2078.
- Soultos, N., Tzikas, Z., Christaki, E., Papageorgiou, K., Steris, V.** 2009. The effect of dietary oregano essential oil on microbial growth of rabbit carcasses during refrigerated storage. *Meat Science*, 81 (3):474-478.
- Timur, G., Timur, M.,** 2003, Balık hastalıkları, İstanbul Üniversitesi Yayınları, No: 4426, İstanbul
- Tippayatun, P., Chonhenchob, V.,** 2007. Antibacterial activities of ehyamol, eugenol and nisin against some food spoilage bacteria. *Kasetsart Journal of Natural Science*, 41: 319-323.
- Toroğlu, S., Çenet, M.,** 2006. Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar. *KSÜ Fen ve Müh Derg.*, 9 (2): 12-20.
- Turi, L.D., Ragni M., Jambrenghi, A.C., Lastilla, M., Vicenti A., Colonna, M.A., Giannico F., Vonghia G.,** 2009. Effect of dietary rosemary oil on growth performance and flesh quality of farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Nat. Congr. Ital. J. Anim. Sci.*, 8: 857-859.
- Ungun, K.İ.,** 1996. Göllerimiz- sorunları ve kültür balıkçılığı. *Su Ürünleri Vakfı İktisadi İşletmesi Dergisi*, 6: 9-15.
- URL-1,** 2015. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Endotoksin>.
- URL-2,**2015. <http://www.garten.cz/a/cz/3018-origanum-vulgare-dobromysl-obecna-2015>.
- URL-3,** 2015. <https://sh.wikipedia.org/wiki/Timol-2015>.
- Yabu, T., Kishi, S., Okazaki, T., Yamashita, M.,** 2001. Characterization of zebrafish caspase-3 and induction of apoptosis through ceramide generation in fish fathead minnow tailbud cell and zebrafish embryo. *Biochemical Journal*, 360: 39-47.
- Yıldız, M., Şener, E.,** 2004. Levrek (*Dicentrarchus Labrax* L.) başlangıç yemlerinde balık yağı yerine kullanılan farklı bitkisel yağların karaciğer yağı kompozisyonuna etkisi, *Türk Veteriner Hayvancılık Dergisi*, 27: 709-717.

**Van Amersfoort, E.S., Van Berkel, T.J., Kuiper, J., 2003.** Receptors, mediators and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev.*, 16(3): 379-414.

**Woo, P.T.K., Bruno, D.W., 2003.** Fish disease and disorders, Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections. CABI Publishing, Oxfordshire, UK

## **ÖZGEÇMİŞ**

1988 yılı Elazığ doğumluyum. İlköğrenimimi Elazığ, orta ve lise öğrenimimi yine Elazığ da tamamladım. Fırat Üniversitesi Keban Meslek Yüksekokulu ön lisans eğitimimi 2008-2010 yılları arasında tamamladım. Tunceli Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi lisans eğitimime 2011 yılında başladım ve 2013 yılında mezun oldum. Aynı yıl Tunceli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans eğitimime başladım ve halen devam etmekteyim.

**Banu KUBULAY**