

T.C.
TUNCELI ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YANGI OLUŞTURULMUŞ GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA
KARVAKROL'ÜN BİYOETKİNLİĞİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
İbrahim GÜLŞAFK

Anabilim Dalı: Su Ürünleri

DANIŞMAN
Doç. Dr. Azime KÜÇÜKGÜL

HAZİRAN – 2015

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

**YANGI OLUŞTURULMUŞ GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA
KARVAKROL'ÜN BİYOETKİNLİĞİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
İbrahim GÜLŞAFK
(Enstitü No: 121101107)**

Anabilim Dalı: Su Ürünleri

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Azime KÜÇÜKGÜL**

HAZİRAN – 2015

T.C.
TUNCELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YANGI OLUŞTURULMUŞ GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA
KARVAKROL'ÜN BİYOETKİNLİĞİ

İbrahim GÜLŞAFK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

Bu tez 24/06/2015 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **oybirliği/ oyçokluğu** ile kabul edilmiştir.

İmza:.....

İmza:.....

İmza:.....

Doç. Dr. Azime KÜÇÜKGÜL
(T.Ü)

Prof. Dr. Mustafa DÖRÜCÜ
(F.Ü)

Yrd. Doç. Dr. Önder AKSU
(T.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 gökkuşığı alabalığı (ort. 16,57 cm uzunluk, 44.71 gr ağırlık) kullanıldı. Dört deneysel grup oluşturulan çalışmada, 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 enfeksiyon grubu olarak değerlendirildi. Üçüncü grup balıklar enfekte edilmedi ve yalnızca karvakrol destekli yem takviyesi (100µg/ml/1 kg yem) ile beslendi. Son grubu oluşturan balıklar ise LPS ile enfeksiyon sonrası karvakrol destekli yem ile beslendi. Deneme periyodu boyunca su sıcaklığı, pH, çözülmüş oksijen değerleri sırasıyla 15,5 °C, 8.01, 9.57 mg/L olarak sabitlendi. Deneysel aşama 48 saat sonunda tamamlandı. Deneme süresi sonunda karaciğer ve böbrek doku örnekleri alındı ve proinflatuar sitokinlerden interferon gama (IFN-γ) ve interlökin 1 beta (IL-1β) gen ekspresyon seviyeleri araştırıldı. IFN-γ, IL-1β genlerine spesifik dizayn ettirilen primerlerin en uygun yapışma (annealing) sıcaklıkları 55-60 °C arasında farklı ısı dereceleri uygulanarak, gradient PCR yöntemiyle analiz edildi. Karvakrolun antiinflatuar etkinliği araştırıldı. LPS ile oluşturulan enfeksiyon sonunda balıklarda göz cidarında, kuyruk bölgelerinde hemorajiler, pullarda dökülmeler gözlemlendi. Elde edilen veriler göstermiştir ki, LPS ile enfekte edilen gruptan elde edilen karaciğer ve böbrek dokusu IL-1β ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna kıyasla sırasıyla % 53 ve % 12,9 oranında uyarılmıştır. Enfeksiyonu takiben karvakrol destekli yemleme yapılan grupta ise bu artışların sırasıyla % 13 ve % 85 baskılandığı tespit edilmiştir. Enfeksiyon içeren grupta akut faz proteinlerinden olan IFN-γ karaciğer ve böbrek ekspresyonu seviyeleri ise kontrol grubuna göre 2, 87 ve 4, 87 misli değişimlerle uyarılmış, ancak karvakrolün bu artışları sırasıyla 4,78 ve 8,11 misli değişimlerle baskılandığı gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Gökkuşığı Alabalığı, Lipopolisakkarit, Karvakrol, İnterferon Gama, İnterlökin 1 Beta

ABSTRACT

Effects of Carvacrol on Antioxidant Some Enzymes in Infection of *Yersinia ruckeri*

In this study, including preliminary studies total 400 rainbow trout (mean 16.57 cm of length and 44.71 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 carvacrol (100µg/ml/1 kg of feed) was fed. The fish included the last group was fed by the feed supported carvacrol 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 and kidneys tissue samples were removed at the end of the trial period and interferon-gamma (IFN- γ) and interleukin 1 beta (IL-1 β) gene expression levels from pro-inflammatory cytokines were investigated. Optimal adhesion (annealing) temperatures of the primers designed specifically IFN- γ and IL-1 β genes analyzed by gradient PCR with applying different temperatures between 55-60 °C. Anti-inflammatory activity of carvacrol was investigated. Hemorrhages in the eye wall and the tail region of the fish and loss of fish scales were observed at the end of infection caused by LPS. The obtained data have shown that liver and kidney tissues IL-1 β expression levels obtained from the group infected by LPS were compared to the control group and were stimulated 53 % and 12.9 %, respectively. These increases in the group of feeding supplemented carvacrol following infection were inhibited the rate of 13 % and 85 %, respectively. IFN- γ liver and kidney expression levels to be acute phase proteins in the group-included infection were compared by the control group and were stimulated 2.87 and 4.87 fold changes, respectively, however these increases were inhibited by 4.78 and 8.11 fold changes.

Key Words: Rainbow Trout, LPS, Carvacrol, Interferon gamma, Interleukin 1 Beta

TEŐEKKÖRLER

Çalışma süresince her konuda yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle herdaim yanımda olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Azime KÜÇÜKGÖL'e, TUNIBAP nolu münferit proje olarak destekleyen Tunceli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve çalışmanın yürütülmesine imkân sağlayan Su Ürünleri Fakóltesi Dekanlığı'na ve Munzur Araştırma Merkez Müdürlüğü'ne, deneysel analizlerin gerçekleştirilmesinde imkan ve olanaklarından faydalandığımız Mustafa Kemal Üniversitesi Veterinerlik Fakóltesi Dekanlığı'na, yardım ve destekleri için Sayın Yrd. Doç. Dr. Altuė KÜÇÜKGÖL'e teőekkür ederim.

Ayrıca her daim destekleri ile yanımda olan aileme teőekkürü bir borç bilirim.

İbrahim GÖLŐAFAK

TUNCELİ – 2015

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜRLER	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
TABLolar LİSTESİ	VI
RESİMLER LİSTESİ	VII
1. GİRİŞ	1
1.1. Literatür Bilgisi.....	3
2. MATERYAL ve YÖNTEM	12
2.1. Materyal.....	12
2.1.1. Balık.....	12
2.1.2. Lipopolisakkarit - LPS (E.coli O55:B5 suşu endotoksini- Sigma/USA).....	13
2.1.3. Karvakrol.....	13
2.1.4. Deneysel Düzenek.....	13
2.1.5. Balıklardan Doku Örneklerinin Alımı ile Homojenat Hazırlama.....	15
2.2. Yöntem	16
2.2.1. Sitokin Gen Ekspresyon Analizleri.....	16
2.2.1.1. RNA İzolasyonu.....	16
2.2.1.2. cDNA(komplementer- tamamlayıcı DNA) Sentezi.....	17
2.2.1.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PCR).....	18
2.2.2. İstatistiksel Analizler.....	21
3. ANALİZ ve BULGULAR	22
3.1. LPS İnfeksiyon Modeli.....	22
3.2. Dokularda Sitokin mRNA Transkripsiyon Düzeyleri.....	24
4. TARTIŞMA	29
5. ÖNERİLER	32
KAYNAKLAR	33
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 3.1. LPS sublethal konsantrasyonu (doz-zaman)	22
Şekil 3.2. IL-1 β gen gradient PCR amplifikasyon eğrileri.....	25
Şekil 3.3. IL-1 β mRNA transkripsiyon seviyeleri-Karaciğer dokusu.....	25
Şekil 3.4. IL-1 β mRNA transkripsiyon seviyeleri-Böbrek dokusu.....	26
Şekil 3.5. IFN- γ gen gradient PCR amplifikasyon eğrileri.....	27
Şekil 3.6. IFN- γ mRNA transkripsiyon seviyeleri-Karaciğer dokusu.....	27
Şekil 3.7. IFN- γ mRNA transkripsiyon seviyeleri-Böbrek dokusu.....	28

TABLULAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Deneysel LPS infeksiyon modeli.....	13
Tablo 2.2. Deneme grupları.....	15
Tablo 2.3. PCR analizlerinde kullanılacak primer baz dizgeleri (<i>Oncorhynchus mykiss</i> spesifik).....	18

RESİMLER LİSTESİ

Sayfa No

Resim 1.1. Lipopolisakkaritin yapısı.....	5
Resim 1.2. Sitokinlerin transkripsiyon mekanizmaları.....	6
Resim 1.3. <i>Origanum spp</i>	8
Resim 1.4. Karvakrolün kimyasal yapısı.....	9
Resim 2.1. Denemede kullanılan balık materyali (<i>Oncorhynchus mykiss</i> Walbaum, 1792).....	12
Resim 2.2. LPS konsantrasyonun intraperitonel uygulanımı.....	14
Resim 2.3. Deneysel düzenek.....	14
Resim 2.4. Deneysel düzenek.....	15
Resim 2.5. RNA izolasyonunun gerçekleştirildiği laboratuvar ortamı.....	17
Resim 2.6. Transkripsiyon analizlerinde kullanılan Real-Time System (Bio-Rad).....	19
Resim 2.7. Doku örneklerinin Real-Time Systeme yerleştirilmesi.....	19
Resim 2.8. Amplikasyon sıcaklık değerleri.....	20
Resim 3.1. TSA besiyerinde üreme.....	23
Resim 3.2. LPS uygulanan balıkta gözlenen pul dökülmeleri.....	23
Resim 3.3. A-LPS uygulanan balıkta gözlenen hemorajik kuyruk; B-Gözde görülen hemorajik odaklar.....	24

1. GİRİŞ

Ülkemizde özellikle alabalık yetiştiriciliği hızlı bir ivme kazanmış ve birçok bölge için geçim kaynağı olacak boyutuna ulaşmıştır. Ülkemizde ve dünyada soğuk sularda yetiştiriciliği yapılan en yaygın tür Gökkuşuğu Alabalığıdır (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). Birçok türü bulunan alabalıklar özellikle akarsuların kaynağa yakın, çözünmüş oksijeni bol, düşük su sıcaklığı olan berrak kesimlerinde kendilerine yaşam alanı bulurlar. Üretim aşamalarının bilinmesi, yapay yeme uyum göstermeleri, toplumda lezzetinin kabul görmesi üretim ve tüketimin ön plana çıkmasına neden olmaktadır. Ancak, balık yetiştiriciliğini olumsuz etkileyen faktörlerin başında enfeksiyöz hastalıklar gelmektedir.

Enfeksiyöz hastalıklar, hastalık yapıcı herhangi bir etkenin (virüs, bakteri, mantar yâda parazit) vücuda girmesiyle ortaya çıkan hastalık olgusunun bir bireyden diğerine geçmesi sebebiyle bulaşıcı hastalık olarak tanımlanmaktadır. Balık yetiştiriciliğinde enfeksiyöz hastalıklar, balıkların buldukları ortam nedeniyle sürekli mikroorganizmalarla ve birebirleriyle çok yakın temasta bulunmaları, suların çabuk kirlenmesi ve su kalitesinin (fiziksel, kimyasal, biyolojik ve diğer fizyolojik parametrelerin) optimal değerlerin dışına çıkması gibi nedenlerle ortaya çıkmaktadır.

Ülkemiz doğal su kaynaklarında ve yetiştiricilik ünitelerinde olduğu gibi yöremiz sucul habitatında da hakim tür olan gökkuşuğu alabalığı (*O. mykiss*)'nda yapılan mikrobiyolojik çalışmalarda, *Yersinia ruckeri* enfeksiyonunun oldukça yoğun insidense sahip olduğu gösterilmiştir (Kılıç ve ark., 2007; İspir ve ark., 2004; Şeker ve ark., 2012). *Y. ruckeri* olumsuz çevre koşullarında hastalığa neden olmakta ve Yersiniozis veya Enterik Kızılağız Hastalığı'nı oluşturmaktadır (Rucker, 1966). *Y. ruckeri*, balıklarda deri lezyonları, ülserasyonlar, hemorajiler ve doku yıkımlarıyla beraber, karaciğer ve böbrek nekrozları ile karakterize hemorajik septisemi hastalığına neden olmaktadır (Austin ve ark., 1985). *Y. ruckeri* gibi gram negatif bakterilerin etki mekanizması hücre duvarının bir bileşeni olan lipopolisakkarit (LPS) ile oluşturmaktadır. Özellikle Lipid A katmanı bu etkiden sorumlu olup, bakteri hücresinin endotoksininin toksik komponenti oluşturmaktadır.

Enfeksiyöz hastalıklar, tedavilerinin güç ve pahalı olması nedeniyle intensif balık yetiştiriciliğinde büyük ekonomik sorunlar yaratabilmekte ve işletme ekonomisinin olumsuz yönde etkilenmesine yol açmaktadır. Bu nedenle balık hastalıklarının erken teşhisi, etkili tedavisi ve gerekli kontrol önlemlerinin alınması, kültür balığı yetiştiriciliğinde büyük önem taşımaktadır (Alpbaz, 1995; Tanrıkul ve ark., 1996; Rad, 1999; Arda ve ark., 2002).

Balıklarda gelişen infeksiyöz hastalıklarda ortaya çıkan reaksiyonlardan birisi de inflamasyon (yangı)' dur. İnflamasyon (yangı veya iltihaplanma), canlı dokunun her türlü canlı, cansız yabancı etkene veya içsel/dışsal doku hasarına verdiği sellüler (hücresele), humoral (sıvısal) ve vasküler (damarsal) bir seri vital yanıtıdır. Sitokinler ise yangının başlaması ve devamından sorumlu polipeptidlerdir. Sitokin sekresyonu; bakteriyel ürünler, immün kompleksler, toksinler ve fiziksel etmenlerce uyarılabilirler. Balıklarda immün sistemde rolü olduğu bilinen sitokinler ise IFN α ve β , IL-1, IL-8, TNF- α 'dır. Bunlardan en önemlisinin TNF α olduğu kabul görmekte ve bu sitokinin balık hastalıklarına karşı immunostimulan olarak kullanılabilceği öngörülmektedir. Yapılan bir çalışmada çipura balıklarına (*Sparus aurata*) oral yoldan, maya (*Pichia pastoris*) ve rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilen TNF- α verilmiş ve koruyuculuğu araştırılmıştır. Çalışma sonucunda respiratory burst aktivitesinin TNF- α verilen grupta arttığı ve TNF- α 'nın istenmeyen bir yan etkisinin olmadığı saptanmıştır (Streitenberger ve ark., 2011).

Sucul canlıların çeşitli patojenlerden korunması, büyümeyi uyarması ve elde edilen ürün miktarının artırılması için uzun yıllar antibiyotiklerden geniş ölçüde yararlanılmıştır. Ancak patojenlere karşı hayvanlarda direnç gelişimi riskinin artırması (Cabello, 2006; Moffitt ve Mobin, 2006; Benchaar ve ark., 2008, Navarrete ve ark., 2008) nedeniyle, gıda güvenliği açısından, başta AB ülkeleri olmak üzere Türkiye'de de antibiyotiklerin balıklarda büyüme performansını artırıcı olarak yemlere katılması yasaklanmıştır (Shane, 2001; 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.

Önemli bir uçucu yağ bitkisi olması ve Türkiye'nin dünya ihtiyacının çok büyük bir bölümünü karşılaması nedeniyle kekik ekonomimiz için önemli bir bitkidir. Bu öneminden dolayı kekik bilim adamları için önemli bir araştırma bitkisi olmuş, konu ile ilgili birçok araştırma yapılmış ve yapılmaya devam edilmektedir. Türkiye'de "kekik" olarak tanımlanan ve bu amaçla kullanılan *Lamiaceae* familyasından pek çok aromatik bitki türü bulunmaktadır. Özellikle bu doğal bitkilerin yapılarında bulunan esansiyel yap komponentlerinden karvakrol güçlü antibakteriyel özellikli fenolik bileşikler arasında yer alır (Burt, 2004; Holley ve Patel., 2005). Bundan dolayı bu bileşiklerin faaliyet mekanizmaları ve antimikrobiyal ve antioksidan etkileri benzer olmaktadır (Gutiierrez ve ark., 2008).

Bu tezde, ülkemiz ticari kültür balıkçılığında ve Tunceli yöresinde de önemli ekonomik değere sahip olan gökkuşağı alabalıkları üzerinde lipopolisakkarit (endotoksin)

maruziyeti sonrası doğal antioksidan ve yangı giderici özelliği bilinen karvakrolun tedavi amaçlı biyolojik etkinlikleri IL-1 β , TNF- α ve IFN- α transkripsiyon değişimlerinin tespiti çalışılmıştır

1.1. Literatür Bilgisi

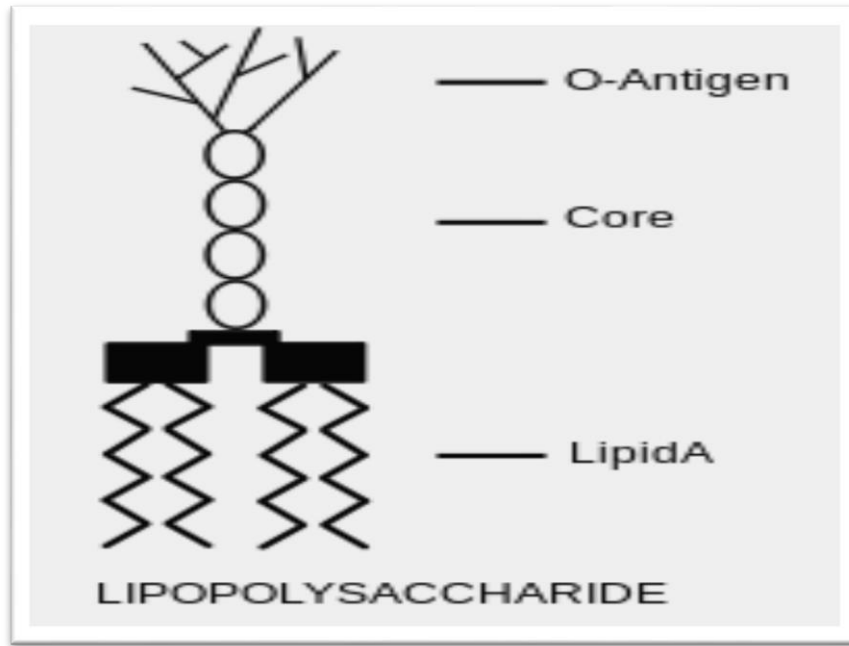
Türkiye ekonomisinde balık önemli bir yer tutmaktadır. Diğer etlere göre (kırmızı et, tavuk eti) ucuz bir tüketim maddesi olması, etinin lezzetli olması, besinsel içeriğinin zengin olması özellikle insanlarda sentezlenmeyen ve gelişim için önemli olan yokluğunda ise birçok hastalığa kapı aralayan omega-3 ve omega-6 yağ asitlerini bünyesinde barındırması gibi nedenlerle balık tercih edilmektedir. Başta Karadeniz olmak üzere diğer denizlerimizde de avcılık yoluyla elde edilen balık tüketime sunulmaktadır. Fakat yıldan yıla görülen birçok olumsuz faktör avcılıktan gelen balık miktarını düşürmüş bu nedenle kültür yoluyla balık üretimi miktarı artmış ve dağılım alanlarını genişletmiştir. Yetiştiricilik ünitelerinden elde edilen balık türlerinden alabalık birinci sırayı almaktadır. Özellikle yetiştirilme kolaylığı, ortama adaptasyonu, etinin lezzetli olması, yem değerlendirme kapasitesinin daha iyi olması ve hastalıklara karşı daha dirençli olması gibi birçok özelliği ile gökkuşaağı alabalığı tercih edilmektedir.

Kültür balığı yetiştiriciliği yerel ekonomi katkısı yanında ülke ekonomisi içinde önemlidir. 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 etkilenmektedir. Doğal ortamlarına göre daha sınırlı bir alanda bulunan balıklar buna rağmen, değişken ısılı canlılar olup buldukları ortama adapte olabilmekte ve güçlü bağışıklık sistemleri sayesinde birçok hastalığı elemine edebilmektedirler. Ancak sıcakkanlıların aksine balıkların içinde yaşadığı sucul ortamın sahip olduğu sıcaklık, pH, tuzluluk, çözünmüş O₂ miktarları gibi fiziksel ve kimyasal özellikler, balığın bağışıklık sistemi üzerine direkt etkisi vardır. Bu nedenlerle 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 sebebiyet verebilmekte % 80-90 oranında bir mortalite oluşturabilmektedir.

Ülkemizin tümüne yayılan ve üretim miktarı her yıl artan gökkuşaağı alabalığı kültüründe de üretim miktarını kısıtlayan bir faktör olarak Gram negatif-Gr (-) karakterdeki bakterilerden kaynaklanan hastalıklara sıklıkla rastlanmaktadır. Gram (-) bakterilerdeki hücre çeperi, zorlu çevre şartlarına karşı hücreyi koruma, hücreye şeklini verme ve seçici geçirgen bir bariyer olarak görev yapmanın yanı sıra bazı enzimatik sistemler de bünyesinde

bulundurur (Lima de Faria, 1969; Koebnik ve ark., 2000). Gram (-) bakterilerde hücre çift katlı bir membran ile çevrilidir ve dış membran; tamamı sitoplazmada sentezlenen fosfolipidler, lipopolisakkaritler, lipoproteinler ve integral dış membran proteinlerinden (OMP) oluşmaktadır (Bos ve Tomassen, 2004). Bakterilerin antijenik yapılarını oluşturan lipopolisakkaritlerin balıkların spesifik ve spesifik olmayan bağışıklık sisteminin gelişmesi üzerinde önemli etkileri olup bu yapıların belirlenmesi aşı geliştirme çalışmalarına temel teşkil eder (Fulop ve ark., 1995; Sakai, 1999). Solem ve ark. (1995) *A. salmonicida*'ya ait LPS'lerin Atlantik salmonu (*Salmo salar*)'nda immunostimulant olarak kullanılabileceğini belirtilirken, Acosta ve ark. (2004) *V. anguillarum*'a ait bu antijenlerin aynı balık türünde antikor seviyesini arttırdığını ve aşı çalışmalarında kullanılabileceği bildirilmiştir.

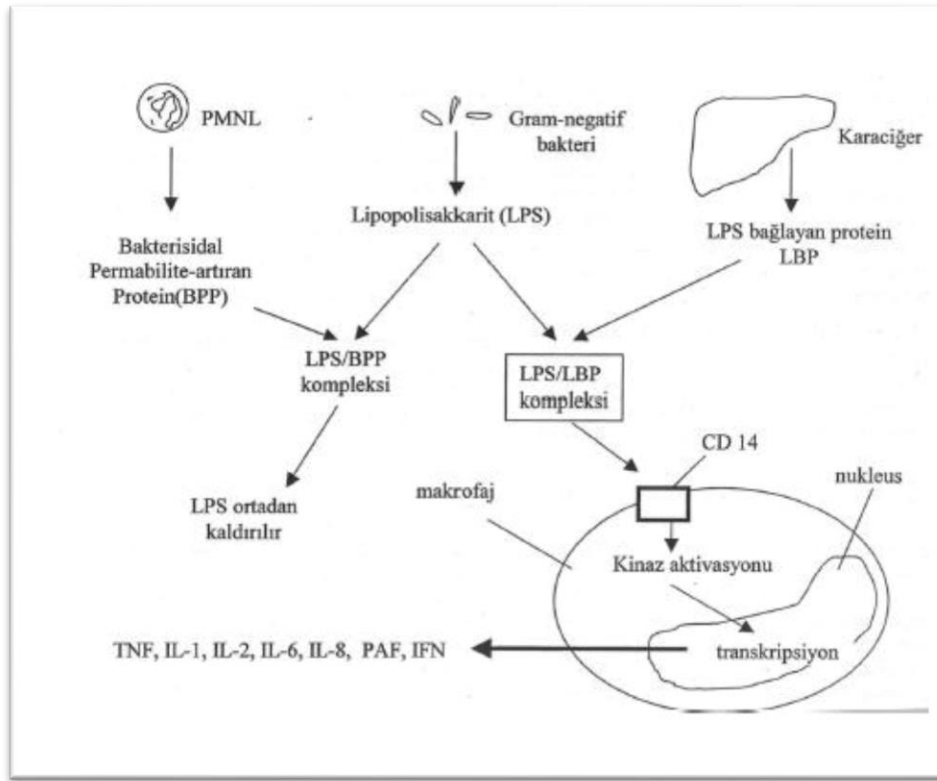
Gr (-) bakterilerin hücre duvarının bir komponenti olan LPS, temel olarak proteinden ibaret olan saflaştırılmış bakteriyel oluşumlardır (Şekil 1.1). Bakteri öldüğünde yada çoğaldığında ortaya çıkmaktadır. LPS, Lipid A ve polisakkarit olarak ayrıştırıldığında gerçek toksik etkiden Lipid-A'nin sorumlu olduğu görülmektedir (Paterson and Fryer, 1974; Baba ve ark., 1988). LPS'nin lipid A bileşeni birçok inflamatuvar öncü hücreyi aktive eder (Salyers ve Whitt, 1994).



Resim 1.1. Lipopolisakkaritin yapısı (URL-1)

Kültür balığı yetiştiriciliğinde mikroorganizmaların, organizmada en önemli hedef hücreleri endotel hücreleri, glial hücreler, makrofajlar, lenfositler ve diğer parankimal hücrelerdir. Mikroorganizmanın değişik antijenik yapılarına veya toksinlerine bu hücreler inflamatuvar yanıt oluştururlar. Endotoksin molekülü hücre membranında kaldığı sürece

biyolojik olarak inaktiftir, ancak hızlı hücre bölünmesi ve hücre yıkımı sırasında salıverilir ve LPS (lipopolisakkarit) bağlayan protein (LBP) ile birleştikten sonra monosit ve makrofajlara CD14 reseptörü aracılığı ile bağlanırlar (Ortatatlı ve ark., 1999). Bu bağlanma sonucunda sitoplazmik sinyal sistemi işlemeye başlar ve dakikalar içinde tümör nekroz faktör (TNF), interlökin (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-8, platelet aktive edici faktör (PAF) ve interferon gamma gibi sitokinlerin transkripsiyonu gerçekleşir (Resim 1.2). Organizmaya ait toksin veya antijenik yapıların bizzat etkisi veya bu sitokinler aracılığı ile enfeksiyon hastalığı semptomları ortaya çıkar. Sitokinler başlıca 3 etkiye sahiptirler. Birincisi sistemik akut faz reaksiyonlarını tetikleyici etkileridir. Aktive olmuş makrofajlardan salınan IL-1 ve TNF- α akut faz proteinlerinin kan değerlerindeki artışı, ateş oluşumu ve iştah kaybından sorumludurlar. İkincisi; endotelial etkilerdir. Lökositlerin adezyonuna, prokoagulan aktivitesine ve TAF aktivasyonuna etki ederler. Üçüncüsü; fibroblastik etkileridir. Kollagen sentezi ve fibroblast proliferasyonunu arttırlar (Drenth ve ark., 1995).



Resim 1.2. Sitokinlerin transkripsiyon mekanizmaları (URL-2)

Yapılan çalışmalarda, TNF- α 'nın akut inflamasyonda ve antitümöral bağışıklıkta en önemli sitokin olduğunu göstermektedir. Nötrofil ve endotel hücrelerini uyararak adezyon ve kemotaksisin gerçekleşmesini sağlar. TNF- α , monositler, makrofajlar, T hücreler, B hücreler, mast hücreler, fibroblast, keratinosit, kupfer hücreleri, düz kas, sinovyal örtü hücreleri, alveolar hücreler ve bazofiller gibi birçok hücre tipinden salgılanmaktadır (Gardner ve ark.,

2003). İL-18; IL-1 ailesinin bir üyesi olup, yangının başlamasında önemli etkiye sahiptir. İmmun ve inflamatorik hastalıkların gelişim sürecinde ekspresyonu artar. Chandrasekar ve ark. (2003) kardiyomyositlerde H₂O₂ uyarımlı oksidatif strese NF- κ B aktivasyonuna bağlı olarak İL-18 mRNA transkripsiyonunun uyarıldığını göstermişlerdir. Reaktif oksijen türleri yangı başlamasında etkili olan TNF- α gen transkripsiyonuna neden olur. TNF- α hücre sel sinyal yollarından İK-B'nin NF- κ B'den ayrılmasına ve bunun sonucu olarakta NF- κ B'nin hücre çekirdeğine geçişi gerçekleşerek gen ekspresyonu şekillenir (Rimal ve ark., 2005).

Balık yetiştiriciliğinde uzun süredir tedavi amaçlı kullanılan antibiyotikler, mikroorganizmaların zamanla direnç kazanması, rezidü oluşumu gibi nedenlerden dolayı yerini doğal ürünlere bırakmış ve bunların kullanımını yaygınlaştırılmıştır.

Doğada bol miktarda bulunan aromatik bitkiler yüzyıllarca hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılmıştır. Antibiyotiklere alternatif olarak düşünülen ve doğal büyüme uyarıcılar içerisinde incelenen kaynaklardan bitkisel ekstraktların ve bitki özünden elde edilen esansiyel yağlarının kullanımı, binlerce yıl önceye, eski Mısır, Çin, Hint ve Yunan medeniyetlerine kadar uzanmaktadır. Doğada yapısında bulunan mikro düzeyde aktif madde içeriği ile makro düzeyde etkinliğe sahip birçok bitki türü bulunmakta ve yüzyıllardır bunlardan daha çok tıbbi amaçlarla yararlanılmaktadır. Örneğin bitki 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 öz suların miktarını artırıcı, etkileri, saponin içeren bitkiler ise steroid benzeri etkileri, sarımsak ve turp ise antimikrobiyal etkileri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Anonymous, 2006b).

Bitkisel ekstraktların kendilerine özgü bilinen esas etkilerinden birisi bunların antimikrobiyal aktiviteleridir. Gerçekten de hayvansal ve/veya yem kaynaklı patojenlere karşı birçok ekstraktın antibakteriyel, antifungal ve antiviral etkilerinin kanıtı olabilecek laboratuvar çalışmalarından oluşan oldukça fazla bilimsel kaynak mevcuttur. MIC (bakteri üreme ve gelişmesini önleyici bir indeks; Minimum İnhibitör Konsantrasyon) çalışmaları bu ekstraktların, ticari olarak temin edilen bazı antibiyotiklere bazen çok yakın veya benzer değerler gösterdiğini bildirmektedir. Bütün bu kanıtlarla birlikte, uygulamada birçok farklı bitki ekstraktları yüksek konsantrasyonlarda karıştırılarak etkileri antibiyotiklerle mukayese edilmelidir. Çoğu ekstrakt, birçok sayıda aktif madde içerdiğinden dolayı bu mantıksaldır. Bunların gözlenen antimikrobiyal etkileri kimyasal yapıları ile bağlantılıdır. Önemli bir faktör olarak bu aktif maddeler bitkiler âleminde değişik konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Kamel, 2000).

Anadolu'da "Mercanköşk" adıyla bilinen *Origanum* türleri, tüm dünyada eski çağlardan beri ilaç ve baharat olarak kullanılan bitkilerdir. Dünya piyasasında önemli bir yere sahip olan "Türk Oreganosu" Batı ve Güney Anadolu'da yaygın olarak yetişen *Origanum onites* L.'den elde edilmektedir (Ravid ve Putievsky, 186; Lawrence, 1984). "Kekik" olarak belirtilen drog, ülkemizde *Origanum*'lar dâhil "Kekik" olarak tanınan tüm bitkileri içine almaktadır (Resim 1.3). *Origanum* genusuna ait olan türler üzerinde daha önce edinilen literatür incelemelerinden de görüldüğü gibi balık patojenlerine karşı antimikrobiale etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Cabello 2006, Kajita ve ark., 1990, Navarrete ve ark. 2008).



Resim 1.3. *Origanum* spp.

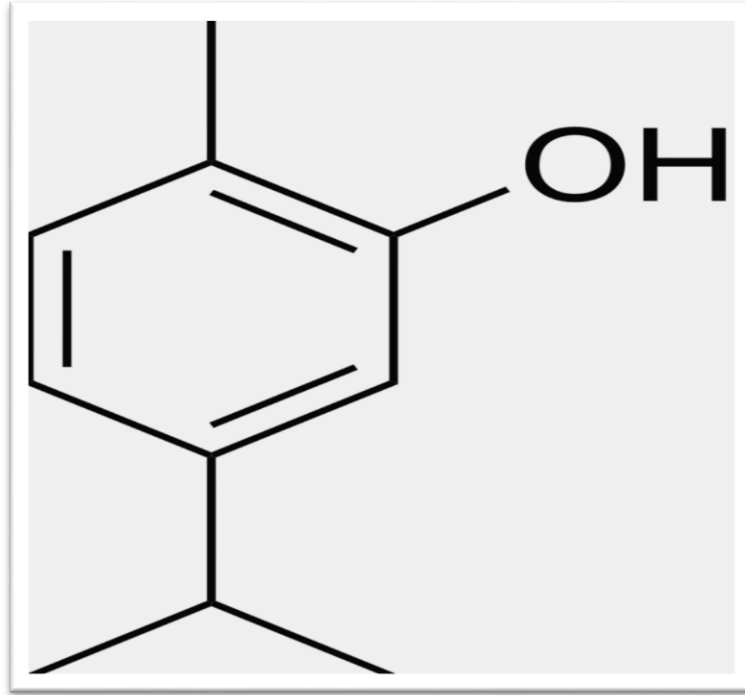
Yapılan bir çalışmada, *Origanum* türlerinin esansiyel yağ içeriklerinin her bitkinin kalitatif bileşiklerinin total miktarlarına göre değişim gösterdiği bildirilmiştir. Buna göre *O. calcaratum* gibi türler % 0,5'den daha az esansiyel yağ içeriği gösterdiği için zayıf (Karousou, 1995), *O. microphyllum* (mercan köşk) gibi türler % 0.5-2 arasında esansiyel yağ içeriğine sahip olduğu için orta (Karousou, 1995), *O. vulgare* subsp. *hirtum* (Yunan kekiği) ve *O. onites* (İzmir kekiği) gibi türler ise % 2'den daha fazla esansiyel yağ içerdiği için zengin olarak gruplandırılmıştır (Kokkini ve ark., 1991; Vokou ve ark., 1988 ve 1993).

Ekici ve ark. (2011) yaptıkları bir çalışmada, kekik (*Origanum vulgare*), melisa (*Melissa oleum*), karabaş (*Lavandulae romanae oleum*), biberiye (*Rosmarinus officinalis*) ve zencefil (*Zingiber officinale*) bitkisel uçucu yağlarının kimyasal bileşimlerini *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, *Flavobacterium psychrophilum* ve *Lactococcus garvieae* üzerinde *in vitro* ortamda antibakteriyel etkileri

yönünden incelenmişlerdir. Kekik ve melisa uçucu yağlarının diğer bitkisel yağlara oranla daha güçlü bir antimikrobiyal etki gösterdiğini, ayrıca kekik yağının spektrumunun geniş bir etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Origanum genusunun kimyasal bileşenleri ile ilgili literatür incelemelerine göre linalool, terpinen-4-ol, and sabinene hydrate, karvakrol ve/veya timol gibi fenolik bileşenler içerdiği bildirilmiştir (Fischer ve ark., 1987; Kokkini ve ark., 1991; Ruberto ve ark., 1993) Origanum türleri uçucu yağlarında ana bileşenler olarak genellikle karvakrol ve timol taşır (Ravid ve Putievsky, 1986; Şarer ve ark., 1985; Farag ve ark., 1989).

Karvakrol (2-methyl-5-(1-methylethyl) phenol] önemli antibakteriyel, antifungal ve insektisit özelliğe sahip monoterpenik bir fenoldür (Lee ve Jin, 2008). Antimikrobiyal aktivitesi olan belirli esansiyel yağların ana bileşiklerinden biri olan düşünülen fenolik bir kimyasal olan karvakrol, kekik otu ve kekik yağlarının ana bileşenidir (Resim 1.4).



Resim 1.4. Karvakrolün kimyasal yapısı (URL-3)

Karvakrol lezzet artırıcı ve/veya antimikrobiyal olarak çeşitli ürünlerde sıklıkla kullanılır (Liolios, 2009). Karvakrol, diğer esansiyel yağ komponentleri ile karşılaştırıldığında spesifik bir antimikrobiyal aktiviteye sahip bir komponenttir. (Arrebola ve ark., 1994; Sökmen ve ark., 2004). Hemen hemen bütün gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (Dorman ve ark., 2000; Friedman ve ark., 2002). Karvakrol antimikrobiyal etkisinin yanı sıra antifungal (Chami ve ark., 2005; Tampieri ve ark., 2005), antitoksijenik (Ultee ve ark. 2001), insektisidal (Ahn ve ark. 1998; Panella ve ark. 2005) ve

antiparasidik (Lindberg ve ark., 2000) aktiviteye sahiptir. Temel bileşen olarak karvakrol içeren bütün esansiyel yağlar antiviral aktivite gösterirken (Allahverdiyev ve ark., 2004; Garcia ve ark., 2003) karvakrol tek başına düşük antiviral aktivite göstermektedir (Sökmen ve ark., 2004).

Karvakrolun besiyerinde *Bacillus cereus* tarafından üretilen toksini engellediği bulunmuştur (Ultee, 1999). Karvakrol üzerine son zamanlarda yapılan kapsamlı araştırmalara rağmen karvakrolün bakterilere karşı etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bileşiğin hidrofobik karakteri, bu bileşiğin ilk hedefinin bakteriyel membran olmasının olası olduğunu gösterir. Buna ek olarak, karvakrolun öncelikle proton itici gücü etkisiyle bakteriyel membranı parçaladığını ve hem pH gradientini hemde membran boyunca elektron akışını bozduğunu göstermektedir (Baydar ve ark., 2004; Beer ve ark., 2007). Karvakrolün iki önemli karakteristik özelliği hidroksil grubu ve delokalize benzen halkasıdır. Veldhuizen ve ark. (2006), yapmış oldukları çalışmada karvakrolün alifatik grupları uzaklaştırıldığında antimikrobiyal özelliğinin azaldığını ortaya çıkarmışlardır. Karvakrolün geniş spektrumda gram negatif veya pozitif bakterilere karşı antibakteriyel etkilere sahip olduğu görülmüştür (Burt ve Reinders, 2003; Sağdıç ve Özcan, 2003; Solomakos ve ark., 2008). Karvakrol bakteriyel membranda tahribata yol açan biyosidal bileşik olarak düşünülür. Karvakrol bakteriyel hücre membranlarına girerek hücre içerisinde antimikrobiyal aktivite gösterirler (Ultee ve ark., 1999; Cristani ve ark., 2007; Cao ve ark., 2008).

Bacillus cereus bakterisi ile yapılan bir çalışmada, karvakrolun *B. cereus* hücre membranı ile etkileşime girdiği ve bu membranın iki katmanlı fosfolipit yapısını yok ettiği görülmüştür (Ultee ve ark., 2000a). Kordalı ve ark. (2008), Türkiye’de yetişen *Origanum acutidents* türünden hidrodistilasyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağ ve onun ana bileşeni olan karvakrol (% 87), p-cymene ve timol’un antifungal, fitotoksik ve insektisel etkilerini araştırmışlardır. *Origanum acutidents* türünden elde edilen p-cymene’in düşük antifungal özellik göstermesine rağmen karvakrol’un ve timol’ün 17 fitopatojenik mantarın gelişmesini tamamen engellediğini ve ticari fungusit olan benomyl’den daha yüksek oranda etkili olduğunu bulmuşlardır. P-cymene’in hiçbir fitotoksik etki göstermediğini ancak karvakrol ve timol’ün aynı zaman da *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album* ve *Rumex crispus* tohumlarının çimlenmesini tamamen engellediğini ve fitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Özellikle uçucu yağda yüksek oranda bulunan karvakrol’ un fungusit, herbisit ve insektisit özelliklere büyük katkı yaptığı sonucuna varılmıştır. Karvakrolun aynı zamanda antikanserojen bir bileşik olarak faaliyet gösterdiği bilinir. Karvakrolun bu özelliğinden dolayı gıda koruyucu katkı maddesinden kozmetiğe kadar ürünlerde birçok uygulama alanına sahip

olduğu belirtilmiştir (Lee ve ark., 2008). Mahmoud ve ark. (2004), yapmış oldukları çalışmada % 1'lik karvakrol ve % 1'lik timol'a daldırılıp 5 °C' de depolanan sazan filetolarının raf ömürlerinin 8 gün uzadığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada gökkuşağı alabalıkları üzerinde Lipopolisakkarit (LPS) ile oluşturulan deneysel infeksiyon sonrası, pro-inflamatuar sitokinlerdeki misli değişimlerle karvakrolün etkinliği araştırılmıştır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Balık

Balık materyali olarak, Türkiye iç sularında en yüksek oranda bulunan ve önemli derece ekonomik değere sahip *Salmonidae* familyasından gökkuşuğu alabalığı (*O. mykiss*) kullanıldı (Resim 2.1). Ayrıca, bu tür üniversitemizin bağlı bulunduğu Tunceli ili ve çevre işletmelerinde de balık popülasyonuna hâkim bir türdür. Araştırma, ortalama ağırlıkları 45-60 gr arasında değişen 4 deneme grubunun her birinde 15 adet olmak üzere 3 tekrarlı yapılan çalışmalarda (toplam 180 balık) ve ön deneme çalışmaları (220 balık) da dâhil toplamda 400 balıkla yürütüldü. Çalışmada balık materyali olarak kullanılan gökkuşuğu alabalığı Tunceli de bulunan yerel bir balık çiftlikten temin edildi. Temin edilen alabalıklar Tunceli Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Laboratuvarında hazırlanmış deney düzeneğine yerleştirilerek ortama adaptasyonları sağlandı ve deney düzeneği için toplam 6 adet akvaryum ve 10 adet fiberglas tank kullanıldı.

Deneyisel çalışmada bir enfeksiyon modeli oluşturulacağı için laboratuvarında kapalı sistem düzenek kurularak herhangi bir enfeksiyon riski önlendi. Deneme süresince su sıcaklığı, pH, çözülmüş oksijen değerleri günlük olarak ölçüldü.



Resim 2.1. Denemede kullanılan balık materyali (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)

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

DeneySEL LPS enfeksiyon modelin oluşturmak için; LPS (*Escherichia coli*, serotip O26:B6) (Sigma, USA) üç farklı konsantrasyonda (12.5, 25 ve 50 µg/ml) uygulanarak ön deneme düzenekleri hazırlandı. Her bir grupta bulunan toplam 21 adet (n=7x3) balığa i.p. olarak enjekte edildi. Kontrol grupları PBS ile enfekte edildi. Mortalite oranları 48 saatlik zaman diliminde izlendi ve sublethal doz belirlendi (Tablo 2.1). Tüm gruplar kontrol grupları ile karşılaştırıldığında ilk 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. DeneySEL çalışma için sublethal doz olarak 25 µg/ml deneySEL enfeksiyon dozu olarak belirlendi.

Tablo 2.1. DeneySEL LPS enfeksiyon modeli

LPS Kons. (µg/ml)*	Mortalite Oranları (%)			
	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. Karvakrol

Karvakrol, sıvı olacak şekilde (ana stok miktarı, 1 g/ml) Sigma'dan temin edildi. Çalışmada kullanılan karvakrol konsantrasyon oranı literatür taraması neticesinde 100 ppm (100µg/ml/1 kg yem) olarak belirlendi (Hashiem ve Abd El-Galil, 2012).

2.1.4. DeneySEL Düzenek

DeneySEL düzenek 3 tekrarlı olarak 4 grup ile oluşturuldu. İlk grup kontrol grubu olarak sadece ticari balık yemi beslendi. İkinci grup enfeksiyon grubu olarak değerlendirildi ve *E.coli* lipopolisakkariti (ön çalışmalarla belirlenen LD₅₀ doz değerine denk gelen konsantrasyondan 0,1 ml'lik doz, gökkuşuğu alabalıklarına ventral yüzgeçlerin orta noktasından i.p. enjekte edildi) ile enfekte edildi (Resim 2.2). Yemleme işlemine enfeksiyondan 1 gün sonra başlandı ve ticari balık yemi ile beslendi. Üçüncü grup balıklar enfekte edilmedi fakat karvakrol destekli yem ile beslendi. Dördüncü grup ise enfekte balıklardan oluşturuldu ve karvakrol destekli yemleme yapıldı. Deneme periyodu 48 saat sonunda tamamlanarak akut değişimler saptandı (Resim 2.3 ve 2.4). Deneme süresi sonunda alınan karaciğer, böbrek doku örneklerinden RNA eldesi sonucu Real Time-PCR yöntemiyle

yangısal sitokinlerin transkripsiyon düzeyleri lerek karvakrolun LPS ile oluşturulan enfeksiyon üzerinde antiinflamatuvar etkinlikleri karşılaştırmalı olarak ortaya konuldu.



Resim 2.2. LPS konsantrasyonun intraperitonel uygulanımı



Resim 2.3. Deneysel düzenek



Resim 2.4. Deneysel düzenek

Tablo 2.2. Deneme grupları

1. Deneme Grubu: Kontrol grubu (C)
2. Deneme Grubu: LPS ile enfekte grup (E)
3. Deneme Grubu: Karvakrol destekli diet grubu (K)
4. Deneme Grubu: Enfekte balıkların karvakrol destekli diet grubu (E+K)

2.1.5. Balıklardan Doku Örneklerinin Alımı ile Homojenat Hazırlama

Her bir deneme sonunda 0,4 ml/L fenoksietanol (2-Phenoxyethanol) anestezisi altındaki balık bireylerinden çalışmanın 3. günlerinde karaciğer doku örnekleri uygun koşullar altında alınıp soğuk PBS ile yıkanarak poşetlenerek buz içerisine konuldu. Dokular proteaz inhibitör (aprotinin, fenilmetansülfonilflorid (PMSF), leupeptin, sodyum florid (NaF) karışımını içeren uygun homojenizasyon çözeltisi içinde homojenize edildi. Sitoplazmik içerik ayrıştırılan örnekler ependorf tüplere konulup 12000 g, 4°C’de 10 dakika santrifüj edilerek 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 şu şekilde yapıldı. 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 absorbanlarda) ölçüldü. RNA/DNA oranı 1.7–2.0 aralığındaki örneklerin saflığı yüksek kabul edilip cDNA (komplementer DNA) sentezinde kullanıldı.



Resim 2.5. RNA izolasyonunun gerçekleştirildiği laboratuvar ortamı

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 eppentorf 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 13000 g'de santriüj edilip termal saykırda 70°C'de 5 dakika reaksiyona tabi edildi. Süre sonunda karışım buz içinde soğutulup, santrifüj edilerek tüpün dibinde toplanması sağlandı. Tüpün üzerine 5x reaksiyon tampon çözeltisi, ribolock ribonülease inhibitör (20 U/µl) ve 10 µl dNTP karışımı konulup karıştırıldı ve 10 saniye santrifüj edilerek ve termal saykırda 37 ° C'de 5 dakika tutuldu. Tüplere 1 µl 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 İL-1β ve IFN-γ spesifik primerleri literatürde belirtilen baz dizgeleri sentezlettirilerek kullanıldı (Tablo 2.3.). Bu genlerin ekspresyon seviyeleri Real Time-PCR sistemi kullanılarak tespit edildi (Resim 2.6 ve 2.7).

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

Transkript	Primer sekansları
IL-1β	5' CCGACTCCAACCTCCAACACTA 3' 5' TTGCTGGAGAGTGCTGTGGAAGAA 3'
IFN-γ	5' TCA CTG TCC TCA AAC GTG 3' 5' GCT GTT CAA CGG AAA ACC TGT TT 3'
GAPDH	5' TCCTC,GATGC,CGAAG,TTGTC,G 3' 5' ATGTC,AGACC,TCTGT,GTTGG 3'



Resim 2.6. Transkripsiyon analizlerinde kullanılan Real-Time System (Bio-Rad)

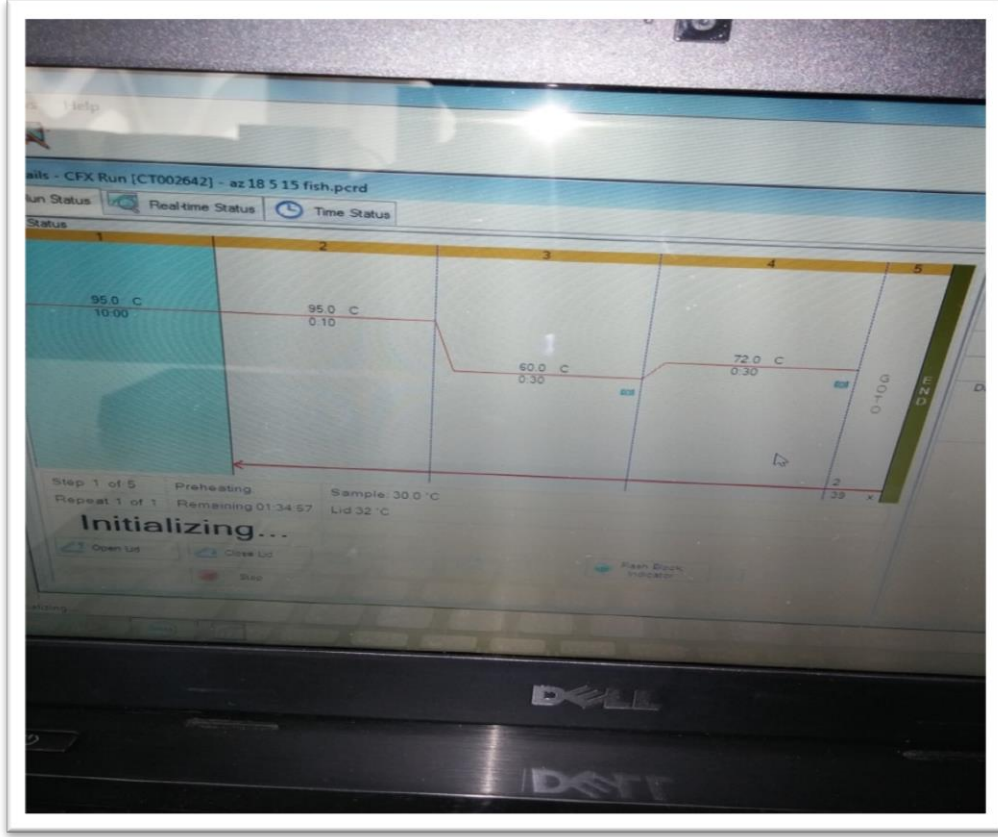


Resim 2.7. Doku örneklerinin Real-Time Systeme yerleştirilmesi

Amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait kopya eşiği (Ct) değerleri karşılaştırılarak, hedef genlerin mRNA transkripsiyon düzeylerinin nisbi değişimleri 2^{-DDCt} metodu ile hesaplandı (Paffl, 2001). Daha sonra gruplar arasındaki farklar relatif misli değişimler cinsinden tablolarda verildi (Resim 2.8).

$$DDCT = (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{denek grubu}} - (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{control grubu}}$$

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 yarar 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 2.8. Amplikasyon sıcaklık değerleri

2.2.2. İstatistiksel Analizler

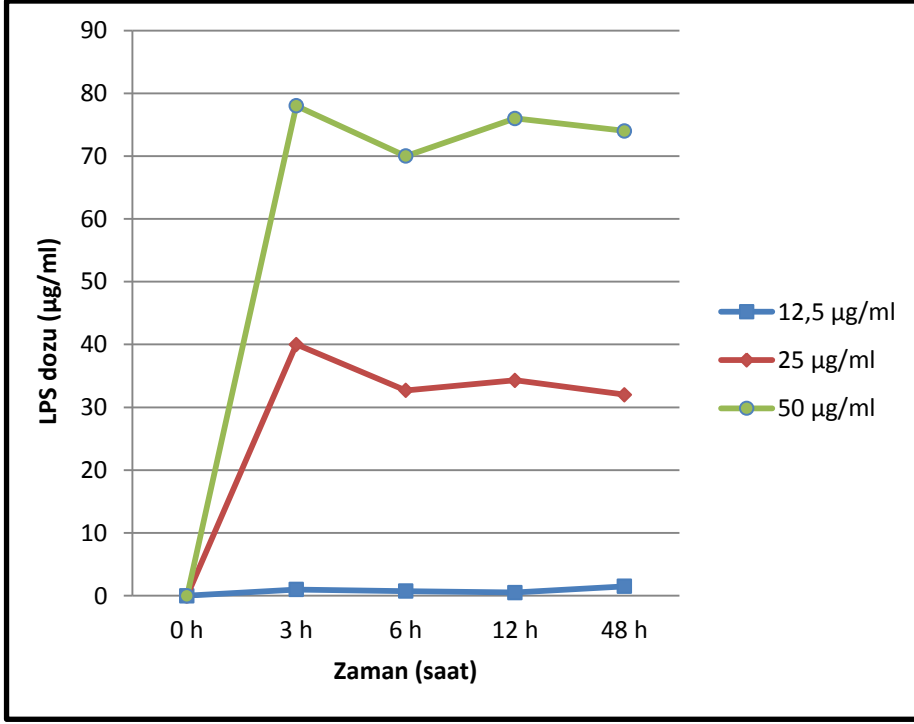
Araştırmada elde edilecek veriler, SPSS 9.05 (Statistical Package for Social Sciences) programında, One-way ANOVA varyans analizi yöntemi kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar Duncan testi ile belirlendi. $p < 0.05$ ve altı istatistiksel olarak önemli kabul edildi. Değerler ortalama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

3. ANALİZ ve BULGULAR

Çalışmada *Salmonidae* familyasından gökkuşuğu alabalığı (*O. mykiss*) kullanıldı. Deneysel balıkların ortalama uzunluğu 16,57 cm, ortalama ağırlığı ise 44,71 gr olarak belirlendi. Toplam 400 balık ile yürütülen çalışmada deneme boyunca su sıcaklığı, pH, çözünmüş oksijen değerleri günlük olarak ölçüldü. Sırayıyla 15,5 °C, 8.01, 9,57 mg/L olarak belirlendi.

3.1. LPS İnfeksiyon Modeli

E. coli lipopolisakkaritinin deneysel balıklar üzerindeki sublethal dozunu belirlemek için üç farklı konsantrasyon (12.5, 25 ve 50 µg/ml) uygulandı. 48 saatlik süre sonunda her bir konsantrasyonda mortalite oranları tespit edildi ve kaydedildi. Tüm gruplar kontrol grupları ile karşılaştırıldığında ilk grupta (12,5 µg/ml) 48 saat sonunda % 1,3 mortalite oranı saptandı. Diğer gruplarda ise 25 µg/ml için % 35, 50 µg/ml için % 75 mortalite oranları gözlemlendi. Deneysel çalışma için sublethal doz olarak 25 µg/ml deneysel infeksiyon dozu olarak belirlendi (Şekil 3.1.).



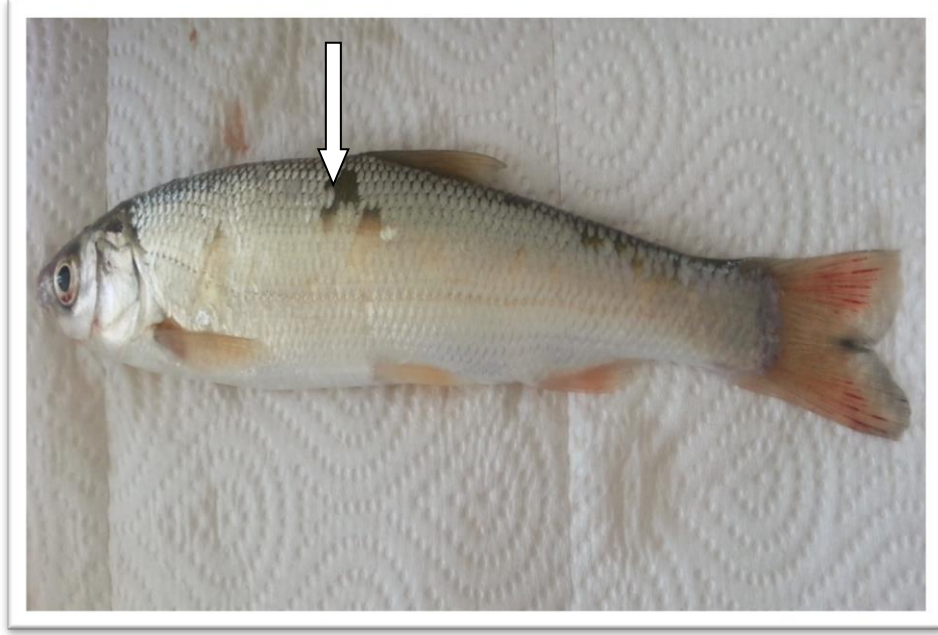
Şekil 3.1. LPS sublethal konsantrasyonu (doz-zaman)

LPS ile enfekte edilen balık örneklerinden otopsi sonunda alınan karaciğer, beyin, kalp örneklerinin nutrient ve triptik soy agar besiyerlerine ekimleri sağlandı uygun inkübasyon süresi sonunda koloni morfolojileri incelendi (Resim 3.1.).

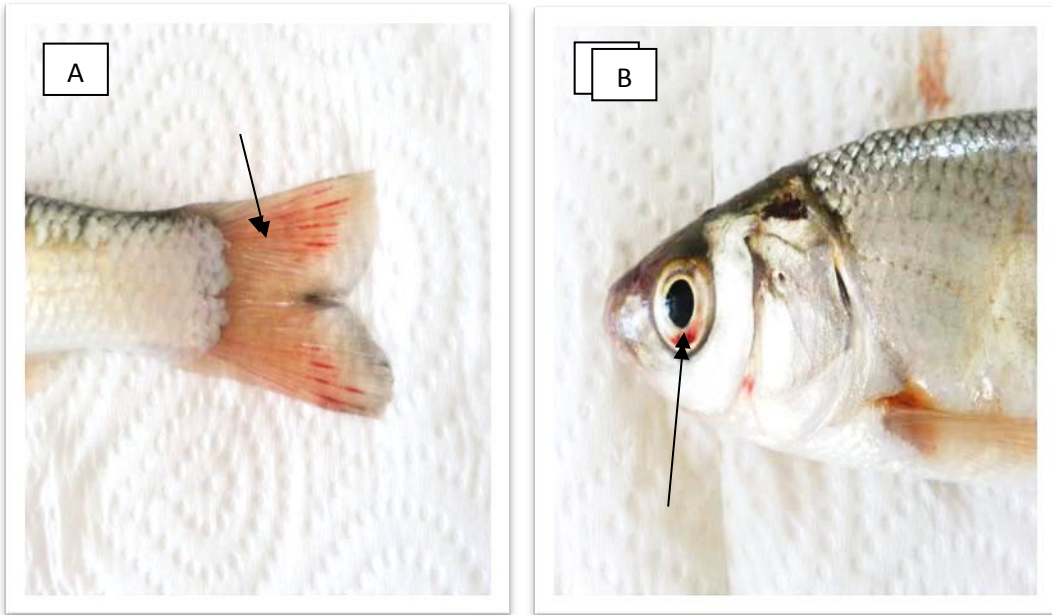


Resim 3.1. TSA besiyerinde üreme (orijinal)

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



Resim 3.2. LPS uygulanan balıkta gözlenen pul dökülmeleri (orijinal)



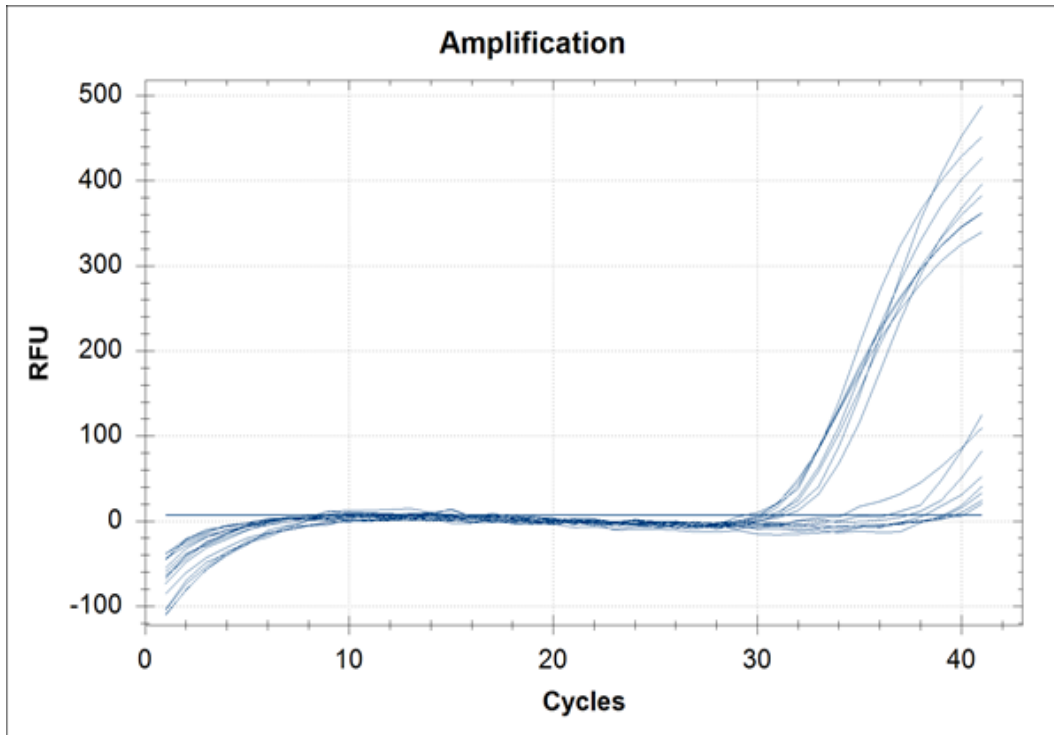
Resim 3.3. A-LPS uygulanan balıkta gözlenen hemorajik kuyruk; B-Gözde görülen hemorajik odaklar (orijinal)

3.2. Dokularda Sitokin mRNA Transkripsiyon Düzeyleri

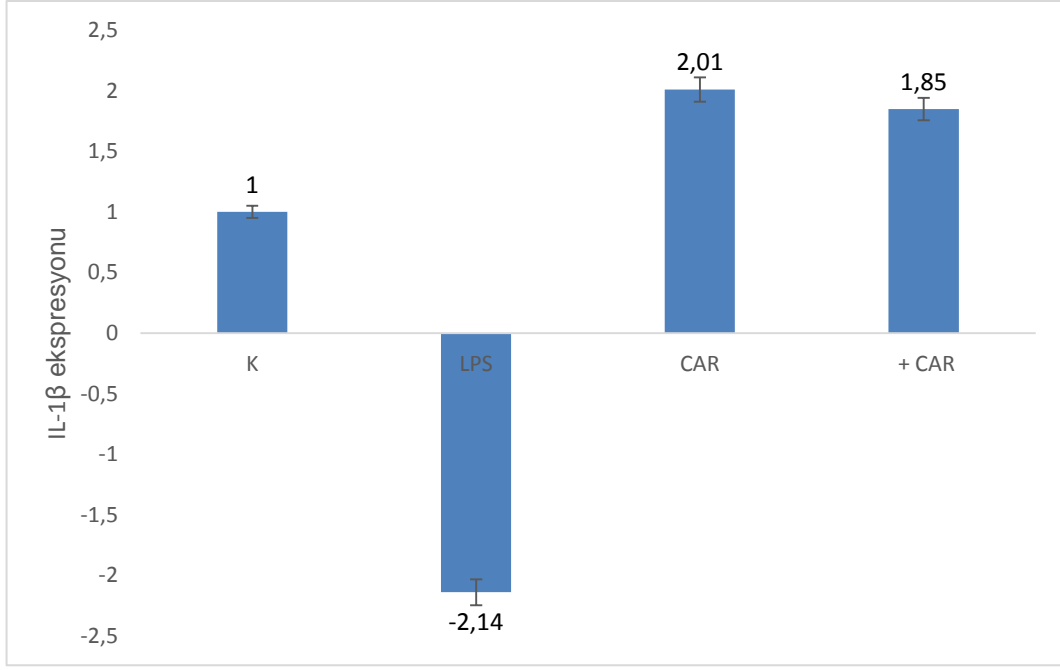
Bu çalışmada, 25 µg/ml *E. coli* LPS'si ile enfekte edilen balıklardan enfeksiyonun 3. gününde karaciğer ve böbrek örnekleri alınarak bu örneklerde RNA

izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. Real time PCR analizleriyle proinflamatuvar sitokinlerden IFN- γ ve IL-1 β gen ekspresyon seviyeleri araştırıldı. IFN- γ , IL-1 β genlerine spesifik dizayn ettirilen primerlerin en uygun yapışma (annealing) sıcaklıkları 55-60 $^{\circ}$ C arasında farklı ısı dereceleri uygulanarak, gradient PCR yöntemiyle analiz edildi.

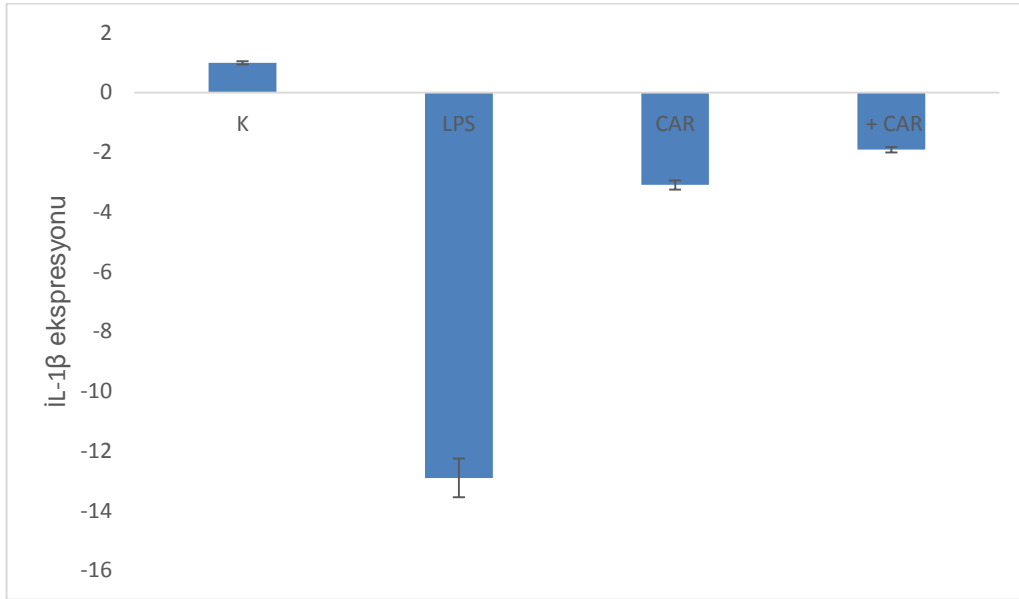
Gradient PCR uygulandığında IL-1 β geni için en iyi primer yapışma ısısının 60,3 $^{\circ}$ C olduğu tespit edildi (şekil 3.2.). Proinflamatuvar sitokinlerden olan IL-1 β karaciğer dokusu ekspresyon seviyeleri LPS uygulanan grupta kontrol grubuna göre yaklaşık %53 oranında uyardığı, LPS uygulamasına ilaveten karvakrol uygulanan grupta ise bu artışın %13 oranında baskıladığı tespit edildi (şekil 3.3). Böbrekte ise IL-1 β ekspresyonu LPS uygulana grupte 12,9 misli değişimlerle uyardığı ancak karvakrolün bu artışları % 85 oranında baskıladığı tespit edildi (şekil 3.4).



şekil 3.2. IL-1 β gen gradient PCR amplifikasyon eğrileri

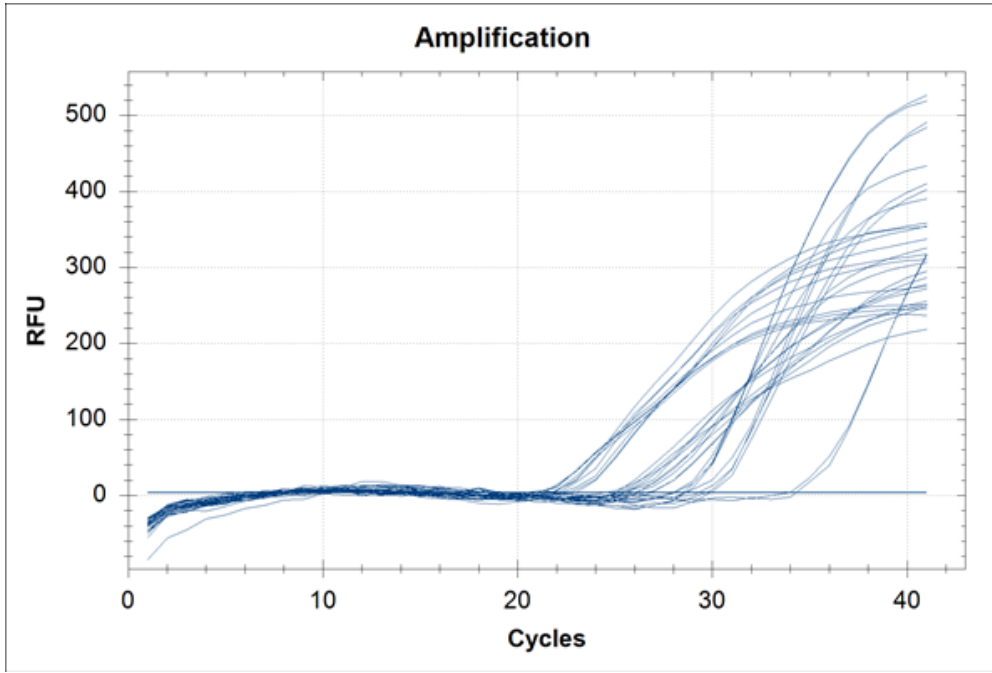


Şekil 3.3. IL-1 β mRNA transkripsiyon seviyeleri-Karaciğer dokusu

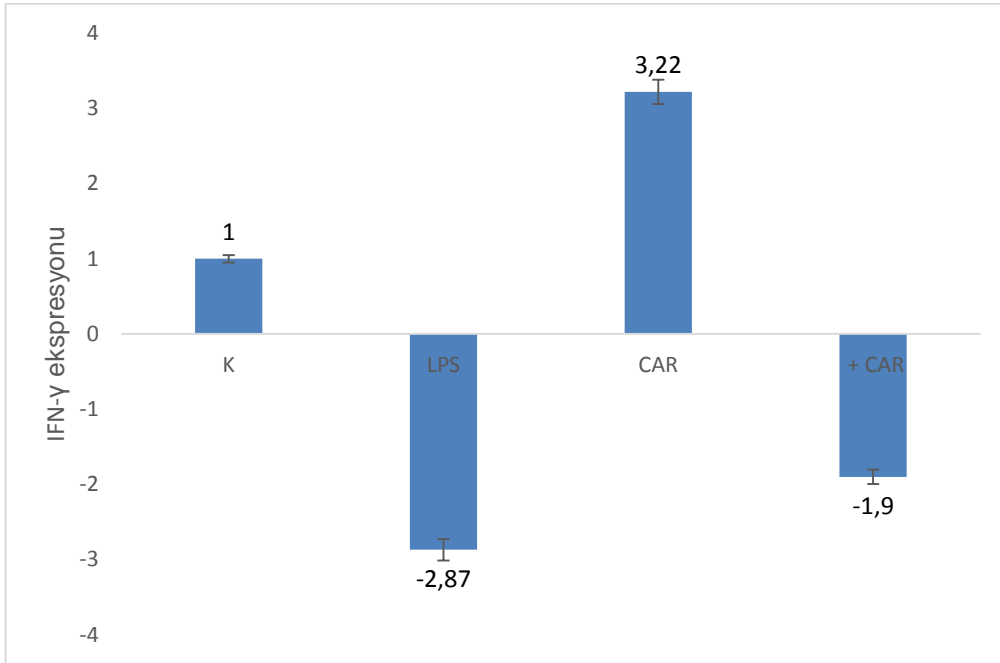


Şekil 3.4. IL-1 β mRNA transkripsiyon seviyeleri-Böbrek dokusu

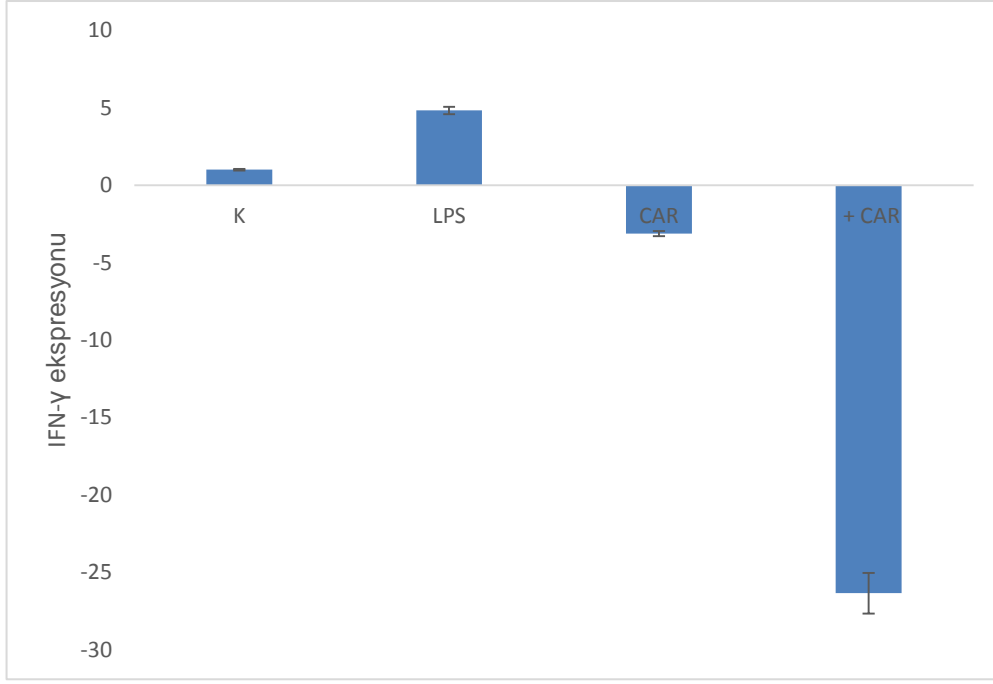
IFN- γ geni için en iyi primer yapışma ısısının 60,5 $^{\circ}$ C olduğu tespit edildi (Şekil 3.5.). Akut faz proteinlerinden olan IFN- γ karaciğer ekspresyonu seviyeleri, LPS uygulanan grupta kontrol grubuna göre 2,87 kat misli değişimlerle uyardığı, ancak LPS uygulanan gruba karvakrol eklenen grupta bu artışların 4,78 kat misli değişimlerle baskılandığı tespit edildi (Şekil 3.6). Bununla birlikte IFN- γ böbrek ekspresyonu seviyeleri LPS uygulanan gruba göre 4,82 kat misli değişimlerle uyarılırken, LPS'e maruz bırakılıp karvakrol eklenen grupta bu artışların 8,11 kat misli değişimlerle baskılandığı görülmüştür (Şekil 3.7).



Şekil 3.5. IFN- γ gen gradient PCR amplifikasyon eğrileri



Şekil 3.6. IFN- γ mRNA transkripsiyon seviyeleri-Karaciğer dokusu



Şekil 3.7. IFN- γ mRNA transkripsiyon seviyeleri-Böbrek dokusu

TARTIŞMA

Doğal ürünler, insanlar arasında binlerce yıldır birçok hastalığın tedavisinde kullanıla gelmiştir. Bu doğal ürünler arasında önemli yere sahip kekik ülkemizde *Origanum*lar olarak bilinen tüm bitkileri kapsamaktadır. Kekik esansiyel yağların fenol bileşenleri olan, timol, karvakrol, eugenol ve terpineol'un güçlü antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Friedman ve ark., 2002; Lee ve ark., 2005; Koul ve ark., 2008). Aeschbach ve ark. (1994) timol ve karvakrol ve 6-gingerol'un önemli derecede antioksidan etkilerinin olduğunu ve sentetik antioksidan katkı maddelerinin yerine kullanılabilecek doğal birer antioksidan madde olduğunu belirtmişlerdir.

Bakteriyel lipopolisakkarit (LPS) Gr (-) bakterilerin en dış hücre duvar membranı olup bakterinin virulansından sorumludur (Paterson ve Fryer 1974; Baba ve ark., 1988). Düşük dozlarda LPS, balıklarda B ve T lenfositlerin ve makrofajların fagositik aktivitesinin artmasını sağlaması ile immün savunma mekanizmasını aktive ederek yararlı olabilmekte ve aşılama çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (O'Donnell ve ark., 1994; Velji ve ark., 1990; Iwama ve Nakanishi, 1996; Fulop ve ark., 1995; Sakai, 1999). Balıklar, LPS (50 mg/L) ile intraperitonel olarak ve banyo tarzında aşılanmış, sonrasında 9.8×10^6 cell/ml konsantrasyonda *Yersinia ruckeri* enfekte edilmişlerdir. 45 günlük deneme periyodunun sonunda balıkların yaşam oranları saptanmıştır. LPS grubunun ölüm oranlarının kontrol grubuna göre daha düşük seviyelerde olduğu bildirilmiştir (İspir ve Dörücü, 2014). Gökkuşluğu alabalıklarından izole edilen Gram-negatif karakterdeki bakterilerin identifikasyonu ve bu izolatların LPS profillerinin tespiti üzerine yapılan bir çalışmada, LPS uygulaması 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). LPS 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.

Balıkların çeşitli stresörlere verdiği yanıtlardan birisinde inflamasyondur. İnflamasyonun vasküler ve hücrel yanıtı, plazma hücrelerinden çıkan ve inflamatuvar bir uyararla meydana gelen kimyasal faktörlerle ortaya çıkmaktadır. Bu gibi kimyasal medyatörler bir arada veya sırayla etki ederek inflamatuvar yanıtın oluşmasını etkilerler. Özellikle LPS gibi inflamatuvar ajanlar sitokin gen ekspresyonlarını arttırmaktadır (Maeda, 1998). Sitokin ailesinin interlökin-1 (IL-1) ailesi dört üyeden (IL-1, IL-18, IL-1 β , IL-1 α) oluşmaktadır (Dinarello, 1997). IL-1, TGF (transforme büyüme faktörü), TNF (tümör nekrozis faktörü) ve interferon (IFN) gibi bazı memeli sitokinlerinin balık sistemlerinde

biyolojik aktivite göstermeleri, balıklarda bu moleküller için reseptörler bulunduğunu ortaya koymuştur (Magnadottir ve ark., 2005). Özellikle birçok araştırmacı spesifik olarak salmonid immün sistemde rol oynayan alabalıkların sitokin ve diğer immünite ile ilişkili genlerin tanımlamasını çalışmışlardır (Secombes ve ark. 2001, Wang ve ark. 2002, Laing ve ark. 2002, Zou ve ark. 2003). *In vitro* bir çalışmada, alabalıklar *Aeromonas salmonicida* bakterisi ile enfekte edilmiş ve bu bakteriye karşı IL-1 β geninin stimüle edildiği bu stimülasyonun ise fagositik ve bakterisidal aktivitenin artışıyla meydana geldiği bildirilmiştir (Peddie ve ark. 2002). Chen ve ark. (2005), kanal kedi balıklarının dalak ve baş böbreğinde IL-8 genini belirlemişler, bu ekspresyonun *Edwardsiella ictaluri* ile enfeksiyondan sonra 3-5 misli arttığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda infeksiyon modeli oluşturmak için *E. coli* LPS (25 μ g/ml) kullanılarak balıklara enjekte edilmiş proinflamatuvar sitokinlerden IFN- γ ve IL-1 β gen mRNA transkripsiyon seviyeleri, böbrek ve karaciğer dokularında karşılaştırmalı olarak incelenerek akut değişimler belirlenmiştir. Bulgularımız göstermiştir ki enfekte karaciğer ve böbrek dokudan izole edilen IFN- γ gen ekspresyon seviyelerinde 3-5 misli artışlar saptanmış iken; enfekte karaciğer dokudan izole edilen IL-1 β 2 misli, böbrek dokudan izole edilen ise 12 misli artışlar rapor edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, Chen ve ark. (2005) ve Peddie ve ark. (2002) ile benzerlik göstermektedir. Gen ekspresyon seviyeleri misli değerlerde elde edilen farklar ise stres uyarının (LPS, bakteri enfeksiyonu, düşük sıcaklık vb.) doz-zamana bağlı değer farklarından, denemede kullanılan türsel farklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Son zamanlarda yapılan araştırmalar göstermiştir ki bakteri yada bakteri endotoksinleri-LPS) gibi inflamatuvar ajanların sitokin gen ekspresyonlarının inhibisyonunu sağlamada çeşitli doğal ürünlerin esansiyel yağlarının koruyucu etkinlikleri bulunmaktadır (Küçükgül ve ark., 2014a; Küçükgül ve ark., 2014b). Yapılan bir çalışmada *A. hydrophila* ile enfekte gökkuşağı alabalıkları 2 ay süreyle %1 ve %2 oranlarında bakla, mango ve ısırgan destekli yem ile beslenmiş ve üç sitokin (IL-1 β , IL-8 ve TGF- β 1) seviyelerindeki değişimler araştırılmıştır. Sonuçlar göstermiştir ki; % 1 bakla katkılı yemlemenin tüm gruplarda söz konusu genleri regüle ettiği, fakat % 2 bakla destekli gruplarda herhangi bir değişimin olmadığı bildirilmiştir. Isırgan destekli yemlemenin tüm gruplarda IL-1 β , IL-8 ve TGF- β 1 genlerini regüle ettiği saptanmışken; Mango destekli yemlemenin ise herhangi bir etki göstermediği bildirilmiştir (Awad ve Austin 2009). Kaya ve Özbilge (2011) tarafından yapılan bir çalışmada Kayseri ve çevresinden toplanan propolisin etanolik ekstraktının, LPS ile uyarılmış makrofajlarda pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. LPS uygulanan hücre grubunda, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeylerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmış, LPS ve propolis uygulanan hücre grubunda yalnız LPS

uygulanan hücre grubuna göre her üç sitokin düzeyinde de anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Kaya ve Özbilge, 2011). Yapılan bir diğer çalışmada Carvacrol ve Satureja Khozestanica (SKEO)'ün etkisi LPS ile regüle edilmiş makrofajlarda iNOS gen ekspresyon seviyeleri üzerinde denemiştir. Sonuçlar göstermiştir ki, SKEO bu genin ekspresyonu karvakrole göre daha fazla inhibe etmiştir (Jalalvand ve ark., 2013). Bu çalışmada ise *E. coli* LPS (25 µg/ml) ile enfekte edilen gökkuşuğu alabalıkları kekik esansiyel yağının ana komponenti olan karvakrol (100 ppm/1 kg yem) destekli yem ile beslenmiş, pro-inflamatuar sitokinlerdeki değişimlerin saptanmıştır. Elde edilen verilere göre, LPS ile enfekte edilen gruptan elde edilen karaciğer ve böbrek dokusu IL-1β ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna kıyasla sırasıyla % 53 ve % 12,9 oranında uyarıldığı gözlenmiştir. Enfeksiyonu takiben karvakrol destekli yemleme yapılan grupta ise bu artışların sırasıyla % 13 ve % 85 baskılandığı tespit edilmiştir. Enfeksiyon içeren grupta akut faz proteinlerinden olan IFN-γ karaciğer ve böbrek ekspresyonu seviyeleri ise kontrol grubuna göre 2, 87 ve 4, 87 misli değişimlerle uyarılmış, ancak karvakrolün bu artışları sırasıyla 4,78 ve 8,11 misli değişimlerle baskılandığı gözlenmiştir. Elde ettiğimiz bulgular Kaya ve Özbilge (2011) ve Jalalvand ve ark. (2013)'nin çalışmalarıyla benzer özellikler göstermektedir. Pro-inflamatuar sitokinlerindeki misli değişimlerdeki artış yada inhibisyon değerlerindeki farklar ise tür, gen ekspresyon değerlerindeki değişimlerden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, LPS doz-zamana bağlı değişimlerde bir diğer farklılık kaynağı olarak düşünülmektedir.

ÖNERİLER

E. coli LPS enfeksiyonu sonrası karvakrol destekli yemleme yapılan gökkuşığı alabalıklarında karvakrolün etkinliğini proinflamatuvar gen ekspresyonlarındaki değişimlerle ortaya koyan bu çalışmada, LPS enfeksiyonu ile oluşan yangısal durum karvakrol destekli yemleme ile baskılandığı IL-1 β ve IFN- γ karaciğer ve böbrek ekspresyonu seviyelerindeki inhibisyonlarla elde edilmiştir.

Karvakrol, gökkuşığı alabalıklarında özellikle enfeksiyon durumlarında inflamasyonun beliteçlerinden olan sitokinler üzerinde etkin rol oynamıştır. Fakat karvakrolün koruyucu etkinliği yâda tedavi etkinliği ile ilgili daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- 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 and 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.
- 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.
- Ahn, Y.J., Lee, S.B., Lee, H.S., Kim, G.H.,** 1998. Insecticidal and acaricidal activity of carvacrol and β -thujaplicine derived from *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* sawdust. *Journal of Chemical Ecology*, 24: 81-90.
- Akaylı, T., Çanak, Ö., Ürkü, Ç.,** 2015. Kültür gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’ndan izole edilen gram-negatif patojenlerin lipopolisakkarit profilleri. *Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research*, 1(2): 80-89.
- Allahverdiyev, A., Duran, N., Ozguven, M., Koltas, S.,** 2004. Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L against herpes simplex virus type-2. *Phytomedicine*, 11: 657–661.
- Alpbaz, A.** 1995. Pratik Alabalık Yetiştiriciliği. E. Ü. Basımevi, İzmir.
- Anonim,** 2007. Yem Katkıları ve Premikslerin Üretimi, İthalatı, İhracatı, Satışı ve Kullanımı Hakkında Tebligde Degisiklik Yapılmasına Dair Teblig. Tarım ve Köyisleri Bakanlıgından. 3 Mayıs 2007. Sayı: 26511 Teblig No: 2007/9 Resmi Gazete
- Anonymous,** 2006b. “Credits,” *Journal of Information Privacy & Security* (2: 1), p. i.
- Arda, M., Seçer, S., Sarıeyyüpoğlu, M.,** 2002. Balık Hastalıkları. Medisan Yayın Serisi, Ankara.
- Arrebola, R., Olmo, A., Reche, P., Garvey, E.P., Santi, D.V., RuizPerez, L.M., Gonzalez-Pacanowska, D.,** 1994. Isolation and characterization of a mutant dihydrofolate reductase-thymidylate synthase from methotrexate-resistant Leishmania cells. *J. Biol. Chem.*, 269: 10590–10596.
- Austin, M.P., Groves, R.H., Fresco, M.F., Kaye, P.E.,** 1985. Relative growth of six thistle species along a nutrient gradient with multispecies competition. *J. Ecol.* 73: 667–84.
- Awad, E., Austin, B.,** 2009. Use of lupin (*Lupinusperennis*), mango (*Mangiferaindica*) and stinging nettle (*Urticadioica*) as feed additives to prevent *Aeromonas hydrophila* infection in Rainbow trout. *J. Fish Dis.*, 33: 413-420.

- Magnadottir, B., Lange, S. ,** 2005. Gudmundsdottir , J. Bøgwald , R.A. Dalmo , Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 19: 429-439.
- 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.
- Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan, G., Karadoğan, T.,** 2004. Antimicrobial activity of and composition of essential oils from Origanum, Thymbra, and Satureja species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, 15: 169-172.
- Beer, A.M., Lukanov, J., Sagorchev, P.,** 2007. Effect of thymol on the spontaneous contractile activity of the smooth muscles. *Phytomedicine*, 14: 65–69.
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Colombatto, D., McAllister, T.A., Beauchemin, K.A.,** 2008. A review of plant derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145: 209-228.
- Bos, M.P., Tomassen, J.,** 2004. Biogenesis of the Gram-negative bacterial outer membrane. *Current opinion in Microbiology*, 7: 610-616.
- Burt, S.,** 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223–253.
- Burt, S.A., Remders, R.D.,** 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36 (3): 162– 167.
- Cabello, F.C.,** 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8: 1137-1144.
- Cao, L., Si, J.Y., Liu, Y., Sun, H., Jin, W., Li, Z., Zhao, X.H., Pan, R.L.,** 2008. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* Maxim. *Food Chemistry*, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.12.064.
- Chami, N., Bennis, S., Chami, F., Aboussekhra, A., Remmal, A. (2005).** Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo*. *Oral Microbiol Immunol*, 20: 106–111.
- Chen, H., Kunnimalaiyaan, M., Van Gompel, J.J.,** 2005. Medullary Thyroid Cancer: The functions of raf-1 and human achaete-scute homologue-1. *Thyroid*, 15: 511–21.
- Chen, L., He, C., Baoprasertkul, P., Xu, P., Li, P., Serapion, J., Waldbieser, G., Wolters, W. Liu, Z.,** 2005. Analysis of a Cat fish gene resembling interleukin-8: Cdna cloning, gene structure, and expression after infection with *Edwardsiella ictaluri*. *Devel. Comp. Immunol*, 29: 135-142.
- Cristani, M., Darrigo, M., Mandalari, G., Micieli, D., Venuti, V., Bisignano, G., Saija, A., Trombetta, D.,** 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15): 6300-6308.

- Dorman, H.J., Deans, S.G.,** 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 308-316.
- Drenth, J.P., Van Uum, S.H., Van Deuren, M., Pesman, G.J., Van Der Ven Jongekrijg, J., Van Der Meer, J.W.,** 1995. Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates *ex vivo* TNF-alpha and IL-1 beta production. *Journal of Applied Physiology*, 79: 1497–1503.
- Ekici, S., Diler, Ö., Didinen, B.I., Kubilay, A.,** 2011. Balıklardan İzole Edilen Bakteriye Patojenlere Karşı Bazı Bitkisel Uçucu Yağlarının Antibakteriyel Aktivitesi. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 17: 47-54.
- 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.
- Fischer, N., Nitz, S., Drawert, F.,** 1987. Original flavor compounds and the essential oil composition of marjoram (*Majorana hortensis* Moench). *Flavor Fragrance J.*, 2: 55-61.
- 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 their induction of immunity against tularemia. *Vaccine*, 13(13): 1220- 1225.
- Garcia, S.M.,** 2003. A review of the ecosystem approach to fisheries. In: Ba M., Chavance P., Gascuel D., Pauly D., Vakily M., editors. *Pêcheries Maritimes, Écosystèmes et Sociétés en Afrique de l'Ouest: un Demi-siècle de Changement.* . Actes du Symposium International de Dakar (Sénégal). ACP-UE.
- Gardner, T.A., Co'te, I.M., Gill, J.A., Grant, A., Watkinson, A.R.,** 2003. Long-term region-wide declines in Caribbean corals. *Science*, 301: 958–960.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P.,** 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124: 91–97.
- Hashiem, M., Abd El-Galil, M.A.A.,** 2012. Fish Microbiology Dept. National Institute of Oceanography and Fisheries, Hurghada, Egypt. ²Fish Dis. Dept., Faculty of Veterinary Medicine., Sohag Univ., Egypt. *Journal of American Science*, 8(4): 442-447.
- 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.
- Iwama, G., Nakanishi, T.,** 1996. *The Fish Immune System Organism, Pathogen and Environment.* Academic Press, USA., 378.

- İspir, Ü., Dörücü, M.,** 2014. Efficacy of lipopolysaccharide antigen of *Yersinia ruckeri* in Rainbow trout by intra peritoneal and bath immersion administration. *Research in Veterinary Science*, 97: 271-273.
- İspir, Ü., Şeker, E., Sarıyüpeoğlu, M.,** 2004. *Yersinia ruckeri* ile İnfekte Edilen Gökkuşığı Alabalığında (*Oncorhynchus Mykiss*, W. 1792) Oluşan İmmunolojik Değişimlerin Araştırılması. *F. Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(2): 393-400.
- Jalalvand, M., Shahsavari, R., Sheikhan, A., Mosayebi, G.,** 2013. Satureja Khozestanica essential oil (SKEO) inhibits NOS gene expression in Lipopolysaccharide-stimulated J774A.1 macro phagocell line.
- Kamel, C.,** 2000. A novel look at a classic approach of plant extracts. *Feed Mix Special* : 19–21.
- Karousou, R.,** 1995. Taxonomic studies on the Cretan *Labiatae*. Distribution, morphology and essential oils. PhD thesis, University of Thessaloniki, Thessaloniki (in Greek with English summary).
- Kaya, E.G., Özbilge, H.,** 2011. Lipopolisakkarit ile uyarılmış makrofajlar dapropolis'in sitokin salınımı üzerine etkileri. *Klinik ve Deneysel Araştırmalar Dergisi*, 2(4): 366-370.
- Kılıç, A., Şeker, E., Özcan, M., İspir, Ü.,** 2007. Elazığ'daki Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) İşletmelerinin Bakteriyel Yönden İncelenmesi. Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi Science and Eng. *J. of Fırat Univ.*, 2: 129-132.
- 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.
- Kokkini, S., Vokou, D., Karousou, R.,** 1991. Morphological and chemical variation of *Origanum vulgare* L. in Greece. *Bot. Hron. (Patras)*, 10: 336-337.
- Kordalı, S., Cakir, A., Özer, H., Çakmakçı, R., Kesdek, M., Mete, E.,** 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology*, 99: 8788–8795.
- Koul, O., Waha, S., Dhaliwal, G.S.,** 2008. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Biopestic. Int.*, 4(1): 63–84.
- Kucukgul Gulec, A., Kucukgul, A., Danabas, D., Ural, M., Seker, E., Arslan, A., Serdar. O.,** 2013. Therapeutic effects of thyme (*Thymus vulgaris* Linneaus) and fennel (*Foeniculum vulgare* Miller) essential oils in infected rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 8(3): 1069-1078.
- Kucukgul Gulec, A., Danabas, D., Ural, M., Seker, E., Arslan, A., Serdar. O.,** 2013. effects of mixed using of *Thymus vulgaris* and *Fennel vulgare* Oils on biochemical and electrolytes responses against *Yersinia ruckeri* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Veterinaria Brno*, 82: 297–302.

- Zhou, L., Dickinson, R.E., Tian, Y., Zeng, X., Dai, Y., Yang, Z.L., Schaaf, C.B., Gao, F., Jin, Y., Strahler, A., Myneni, R.B., Yu, H., Wu, W., Shaikh, M.,** 2003. Comparison of seasonal and spatial variations of albedos from Moderate-Resolution Imaging Spectroradiometer (MODIS) and Common Land Model. *Journal Of Geophysical Research*, Vol. 108, No. D15, 4488, Doi:10. 1029/2002jd003326, 2003.
- Laing, E., Butterworth, G., Ansari, D., Gsödl, M., Longhi, E., Panagiotaki, G., Paterson, S., Karmiloff-Smith, A.,** 2002. Atypical development of language and social communication in toddlers with Williams syndrome. *Developmental Science*, 5: 233-246.
- Laing, K.J., Zou, J., Wang, T., Bols, B., Hirono, I., Aoki, T. and Secombes, C.J.** 2002. Identification and analysis of an interleukin 8- like molecule in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev. Comp. Immunol.*, 26: 433-444.
- 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.
- Lee, S.Y., Jin, H.H.,** 2008. Inhibitory activity of natural antimicrobial compounds alone or in combination with nisin against *Enterobacter sakazakii* Journal compilation. The Society for Applied Microbiology, *Letters in Applied Microbiology*, 47: 315–321.
- 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.
- Lima-De-Faria, A., Birnstiel, M.L., Jaworski, H,** 1969 . Amplification of ribosomal cistrons in heterochromatin of *Acheta*. *Genetics*, 61: 145-148.
- Lindberg, L.D., Boggess, S., Williams, S.,** 2000. Multiple Threats: The Co-occurrence of teen health risk behavior. Unpublished research report, U.S.
- Liolios, C.C., Gortzi, O., Lalas, S.,** 2009. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus L.* and in vitro antimicrobial activity. *Food Chem.*, 112: 77–83.
- Maeda, H.A.T.,** 1998. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry*, 63: 854-65.
- Mahmoud, B., Yamazaki, K., Miyashita, K., Ii-Shik, S., Dong-Suk, C., Suzuki, T.,** 2004. Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oils compounds. *Food Microbiology*, 21: 657–666.
- 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. *North American Journal of Aquaculture*, 68: 176-185.

- Navarrete, P., Paola, O.J.,** 2009. Oxytetracycline treatment reduces bacterial diversity of intestinal microbiota of Atlantic salmon. *Journal of Aquatic Animal Health*, 20(3): 177-183.
- Navarrete, S.A., Broitman, B.R., Menge, B.A.,** 2008. Interhemispheric comparison of recruitment to rocky intertidal communities: pattern persistence and scales of variation. *Ecology* 89: 1308–1322.
- O'Donnell, G.B., Smith, P.R., Kilmartin, J.J., Moran, A.P.,** 1994. Uptake and fate of orally administered bacterial lipopolysaccharide in Brown trout *Salmo trutta*. *Fish Shell Fish. Immunol.* 4: 285–299.
- Ortatatlı, M., Özgüven, V., Şengül, A.,** 1999. Sepsis ve ağır infeksiyonların tanı ve takibinde yeni bir marker: Prokalsitonin. *Flora* 1999; 4: 151-5.
- Panella, N.A., Dolan, M.C., Karchesy, J.J., Xiong, Y., Peraltacruz, J., Khasawneh, M., Monteneiri, J.A., Maupin, G.O.,** 2005. Use of novel compounds for pest control: insecticidal and acaricidal activity of essential oil components from heartwood of Alaska yellow cedar. *J. Med. Entomol.* 42: 352–358.
- Paterson, W.D., Fryer, J.L.,** 1974. Immuneresponse of *Coho salmon Oncorhynchus kisutch* to *Aeromonas salmonicida* cells administered intraperitoneally in Freund's complete adjuvant. *J Fish Res Bd Canada* 31: 1751–1755.
- Peddie, S., Zou, J., Secombes, C.J.,** 2002. Biologically active IL-1 β derived peptide stimulates phagocytosis and bactericidal activity in *Rainbow trout Oncorhynchus mykiss (Walbaum)* head kidney leucocytes in vitro. *J. Fish Dis.* 25: 351-360.
- 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.
- Rad, F.,** 1999. Türkiyede gökkuşağı alabalık işletmelerinin teknik ve ekonomik analizi. Su Ürünleri A.B.D., Ankara, Doktora Tezi
- Ruberto, G., Biondi, D., Meli, R., Piattelli, M.,** 1993. Volatile flavour components of Sicilian *Origanum onites* L.. *Flavour and Fragrance Journal*, 8(4):197-200.
- Ruecker, R.R.,** 1996. Picornaviridae: The viruses and their replication. In B.N. Fields, D.N. Knipe, P.M. Howley, et al. (ed.), *Fields Virology*, third ed., Lippincott-Raven publishers, Philadelphia. 2: 609-654.
- Sağdıç, O., Özcan, M.,** 2003. Antimicrobial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control* 14, 141-143.
- Sakai, M.,** 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.
- Salyers, A.A., Whitt, D.D.,** 1994. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. pp. 260-268, ASM Press, Washington, D.C., USA, 1994.

Secombes, C.J., Wang, T., Hong, S., Peddie, S., Crampe, M., Laing, K.J., Cunningham, C., Zou, J., 2001. Cytokines and innate immunity of fish. *Dev. Comp. Immunol*, 25: 713-723.

Shane, S., 2005. Antibiotic alternatives in turkey production. *World Poultry*, 5 (21): 26-27.

Solem, S.T., Jorgensen, J.B., Robertsen, B., 1995. Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) macro phages by lipopolysaccharide. *Fish&Shell fish. Immunology*, 5: 475-491.

Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., Botsoglou, N., 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science*, 80: 159–166.

Sökmen, M., Serkedjjeva, J., Daferera, D., Gulluce, M., Polissiou, M., Tepe, B., Akpulat, A., Sahin, F., Sökmen, A., 2004. In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*. *J Agric Food Chem* 52: 3309-3311.

Şarer, E., Scheffer, J.J.C., 1985. Composition of the Essential Oil of *Origanum majorana* Grown in Different Localities in Turkey, *Aromat. Plants, Proc. Int. Symp.*15th, 209-212.

Şeker, E., Karahan, M., İspir, Ü., Çetinkaya, B., Sağlam, N., Sarıeyyüpoğlu, M., 2012. Investigation of *Yersinia ruckeri* Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum 1792*) Farms by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Bacteriological Culture. *Kafkas Üniv. Vet. Fa. Dergisi* (In press)

Tampieri, M.P., Galuppi, R., Macchioni, F., Carelle, M.S., Falcioni, L., Cioni, P.L., Morelli, I., 2005. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia*, 59: 339-345.

Tanrikul, T.T., Çağırğan, H., Tokşen, E., 1996. Bakteriyel Balık hastalıkları. *Vet. Kontr. ve araşt. Enst. Md. Derg.* 34: 105-127.

Ultee, A., Kets, E.P.W., Alberda, M., Hoekstra, F.A., Smid, E.J., 2000a. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology* 174 (4):233– 238.

Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid, E.J., 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (10), 4606– 4610.

Ultee, A., Smid, E.J., 2001. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 64:373-378.

URL-1, 2015. http://tr.wikipedia.org/wiki/Endotoksin#/media/File:LPS_en.svg

URL-2, 2015. <http://www.nuveforum.net/1598-hastaliklar/217047-sepsis-sendromu/>

URL-3, 2015. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Karvakrol#/media/File:Carvacrol.png>

- Veldhuizen, E.J.A., Tjeerdsma-Van Bokhoven, J.L., Zweijter, M., Burt, C., S. Haagsman, A.,** 2006. Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol. *J. Agric. Food Chem.* 54 (5), pp 1874–1879.
- Velji, M.I., Albright, L.J., Evelyn, T.P.,** 1990. Protective immunity in juvenile *Coho salmon, Oncorhynchus kisutch* following immunization with *Vibrio ordalii* lipopolysaccharide or from exposure to *V. ordalii* cells. *Dis. Aquat Organ* 9: 25–29.
- Vokou, D., Kokkini, S., Bessiere, J.M.,** 1988. *Origanum onites* (Labiatae) in Greece: Distribution, volatile oil yield, and composition. *Econ. Bot.*, 42(3): 407-412.
- Vokou, D., Varelzidou, S., Katinakis, P.,** 1993. Effects of Aromatic Plants on Potato Storage: Sprout Suppression and Antimicrobial Activity. *Agric., Ecosyst. Environ.*, 47: 223-235.
- Wang, S., Zhang, B., Faller, D.V.,** 2002. Prohibitin requires Brg-1 and Brm for the repression of E2F and cell growth. *Embo J.*, 21:3019–28.
- Wang, T., Zou, J., Cunningham, C., Secombes, C.J.,** 2002. Cloning and functional characterisation of the interleukin-1 beta 1 promoter of *Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1575: 108-116.
- Zou, J., Peddie, S., Scapigliati, G., Zhang, Y., Bols, N.C., Ellis, A.E.,** 2003. Functional characterisation of their recombinant tumour necrosis factor in *Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *Dev. Comp. Immunol.* 27: 813-822.