

Araştırma Makalesi
Research ArticleDeneyisel Yangı Oluşturulmuş Gökkuşığı Alabalıklarında
(*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Timolün Apoptotik
ve Antiinflamatuvar EtkinliğiBanu KUBULAY¹, Altuğ KÜÇÜKGÜL², Azime KÜÇÜKGÜL^{1*}¹*Munzur Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Tunceli, Türkiye.²Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Hatay, Türkiye.

*Sorumlu Yazar Tel.: +90 428 213 17 94

E-posta: akucukgul@munzur.edu.tr

Geliş Tarihi: 21.07.2016

Kabul Tarihi: 21.09.2016

Öz

Enfekte balık dokusunda apoptoz ve inflamasyon içerikli gen ekspresyonları üzerine timolün etkinliğini araştıran bu çalışmada 4 farklı grup oluşturuldu. Kontrol (C) ve yalnızca timol destekli yemleme grubu (THY-100 µg ml⁻¹ yem) hariç, tüm balıklar *E. coli* LPS'i (LPS-25 µg ml⁻¹) ile enfekte edildi. Son grup enfekte balıkların timol destekli yem ile beslenmesi (+THY) ile oluşturuldu. 3 günlük Ddeneme süresi sonunda (3 gün) karaciğer ve böbrekten doku örnekleri alındı. Apoptotik sitokinlerden kaspaz 3 (Cas 3), kaspaz 8 (Cas 8); pro-inflamator sitokinlerden ise interferon gama (IFN-γ) ve interlökin 1 beta (IL-1β) gen ekspresyon seviyeleri Real-Time PCR analizleriyle araştırıldı. LPS uygulanması ile IL-1β ve IFNγ gen düzeylerinde azalmaların olduğu kaydedildi fakat THY ile tekrar kontrol seviyelerine ulaştığı gözlemlendi. +THY gurubunun LPS ile karşılaştırılmalı sonuçları gösterdi ki tüm gen seviyeleri yukarı regülasyonlar ile uyarıldı. LPS enfeksiyonu Cas 3 ve 8 ekspresyon seviyelerinde karaciğerde artışlara, böbrekte ise azalmalara neden oldu. Ancak, sadece timol içeren yemle beslenen (THY) balıklarda herhangi bir değişim gözlenmedi. +THY, kaspaz içerikli tüm genlerde yaklaşık 3 misli upregülasyonlar yukarı regülasyonlar tespit edildi. Çalışmada, timolün pro-inflamator ve apoptozis içerikli gen seviyelerinde değişimler göstererek etkili olduğu belirlendi. Ancak yine de enfekte balıklar üzerinde bitkisel destekli yemlemenin immün modülasyon üzerindeki etkilerini daha iyi anlamak için daha kapsamlı moleküler çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Gökkuşığı Alabalığı, Apoptotik sitokinler, Lipopolisakkarit, Timol, Pro inflamator sitokinler.

Abstract

Activity of Apoptotic and Antiinflammation on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) Infection-Induced Experimentally

In this study investigated thymol effects on gene expressions relative to pro-inflammatory and apoptosis in tissue fish infected four different trials were formed. All fish were infected with *E. coli* LPS (25 µg ml⁻¹) expect control and only thymol (THY) supplementation (100 µg ml⁻¹ diet) group fish. The last group was the infected fish fed with thymol supplementation diet (+THY). Kidney and liver tissues were removed 3 day after the experiment period. The gene expression levels of interleukin-1β (IL-1β) and interferon gamma (INF-γ) from pro-inflammatory cytokines; caspase 3 (Cas 3) and caspase 8 (Cas 8) from apoptotic cytokines were investigated by Real-Time PCR analyses. Decreases recorded on gene levels of IL-1β and IFNγ by LPS treatment, however it was observed that returned to the control level. The comparative results of LPS and +THY treatment showed that all gene levels significantly stimulated by up regulation. The expression levels of Cas 3 and 8 following LPS caused the increases in liver, no in kidney. However, any change was not observed in only diet application (THY). +THY application showed about 3-fold up-regulations on all gene expressions including apoptosis. It was determined to be effective by showing changes on gene levels including pro-inflammatory and apoptosis. However, further studies are required to better understand immune modulatory effect of diet supplementation feeding on the virulence mechanism of fish-infected.

Keywords: Rainbow trout, Apoptotic cytokines, LPS, Thymol, Proinflammatory Cytokines.

© Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Trabzon

Giriş

Ülkemizde yetiştiricilik ünitelerinde en çok gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) kültürü yapılması hasebiyle gökkuşağı alabalıklarının bakteriyel patojenleri üzerinde birçok çalışma yapılmış ve özellikle hastalıklara daha fazla neden olan gram negatif etkenli patojenlerin hastalık tablosu ortaya konmaya çalışılmıştır (Kum vd., 2004; Akinbowale vd., 2006). Gram negatif bakteriler etki mekanizmasını (*Y. ruckeri* vb.) hücre duvarının bir bileşeni olan lipopolisakarit (LPS) ile oluşturmaktadır. LPS, gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan, doğal bağışıklığı arttıran en önemli bakteri ürünü olup, toksik parçası lipid A, septik sürecin başlamasında ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır (Baba vd., 1988).

İnflamasyon (yangı veya iltihaplanma), canlı dokunun her türlü canlı, cansız yabancı etkene veya içsel/dışsal doku hasarına verdiği sellüler (hücresel), humoral (sıvısal) ve vasküler (damarsal) bir seri vital yanıttır (Knapp vd., 2006). Sitokinler ise yangının başlaması ve devamından sorumlu polipeptidlerdir. Sitokin sekresyonu; bakteriyel ürünler (LPS vb.), immün kompleksler, toksinler ve fiziksel etmenlerce uyarılabilirler. Balıklarda immün sistemde rolü olduğu bilinen pro-inflamator sitokinler IFN α ve β , IL-1, IL-8, TNF- α 'dır (Choi vd., 1998). Son yıllarda özellikle bakteri ve/veya endotoksinleri (LPS vb.) gibi inflamatuvar ajanlar ile oluşturulan enfekte balıklar üzerinde pro-inflamator sitokin ekspresyonlarında izlenen inhibisyonlarda bitkisel kaynaklı fenolik bileşenlerin (timol, karvakrol vb.) etkin olduğunu bildirilmiştir (Küçükgül vd., 2013a; Küçükgül vd., 2013b).

Birçok enfeksiyöz etken yangının başlamasına sebep olmakta ve konak hücrede apoptozu uyarmaktadır. Apoptozis mitokondri ara-

cılı içsel ya da ölüm reseptörleri aracılı dışsal uyarımlar aracılığı ile inaktif kaspazların aktive edilmesiyle uyarılmakta ve birçok enfeksiyöz hastalığın patogenezişinin bir bölümünü kapsamaktadır (Ashkenazi ve Dixit, 1998; Reed, 2000). Apoptoz bakteri gibi tek hücreli organizmalarda hücre ölümünün tek yoludur. Son yıllardaki araştırmalar, balık hastalıklarının patogenezişinde apoptotik hücre ölümünün ve bunda rol oynayan kaspazların büyük öneme sahip olduğunu göstermektedir. (Hirata vd., 1998; Shimizu vd., 1999). Apoptotik proses süreci hakkındaki verileri kapsayan çalışmalarda özellikle kaspaz 3 zebra balıklarında (*Danio rerio*) çalışılmıştır (Chakraborty vd., 2006; Eimon ve Ashkenazi, 2010). Ayrıca deniz çipurası levreği (*Dicentrarchus labrax* L.), ve alabalık (*Oncorhynchus mykiss*), salmon (*Salmo salar*) ve çipura (*Sparus auratus*) gibi bazı teleost türlerde de çalışmalar yapılmıştır (Reis vd., 2007; Rojas vd., 2010).

Yakın zamana kadar Balık yetiştiricilik ünitelerinde antibiyotiklerin aşırı ve bilinçsiz kullanımı sonucu zaman içerisinde antibiyotiklere dirençli patojenlerin artması ciddi problemlerin oluşmasında öncül rol oynamaktadır Patojenlere karşı hayvanlarda direnç gelişimi riskini artırması (Cabello, 2006; Navarrete vd., 2010) sebebiyle, antibiyotik kullanımları giderek azalan bir ivme göstermiştir. 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 vb.) Odaklanmışlardır. Lamiaceae familyası üyesi olup kimyasal bileşenlerinde timol ve karvakrol içeren ülkemizde kekik olarak bilinen pekçok aromatik bitki türü bilinmektedir (Başer vd., 1994).

PCR döngülerinden 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 (Pfaffl, 2001). Her bir PCR reaksiyonu 3 farklı çalışma tekrarlarıyla ortaya konuldu. Ekspresyonlar, aşağı (down) ve yukarı (up) regülasyonlar ile misli değişimler olarak ifade edildi.

Bulgular

Böbrek dokusunda LPS ve THY uygulaması ile IL-1 β ekspresyon seviyelerinde sırasıyla 12,9 ve 6,1 misli değişimlerle azalmalar saptandı. Fakat son grupta (+THY) timol proinflamator etki göstererek IL-1 β ekspresyonunu arttırdığı görüldü (2,30 misli). IFN- γ gen ekspresyonu için kontrol ile karşılaştırmalı sonuçlar gösterdi ki LPS'nin etkisi bu gen seviyelerinde upregülasyonlar (4.82 misli) ile sonuçlandığı belirlendi. Yalnızca timol destekli yemleme ile 3,31 misli azalmalar saptandı. Enfekte balıklarda ise timol desteği (+THY) IFN- γ seviyelerinde downregülasyon (10,04) ile uyarıldı (Şekil 1). Kaspazlarda (Cas 3 ve 8) da downregülasyon izlendi (sırasıyla 3,24 ve 4,11

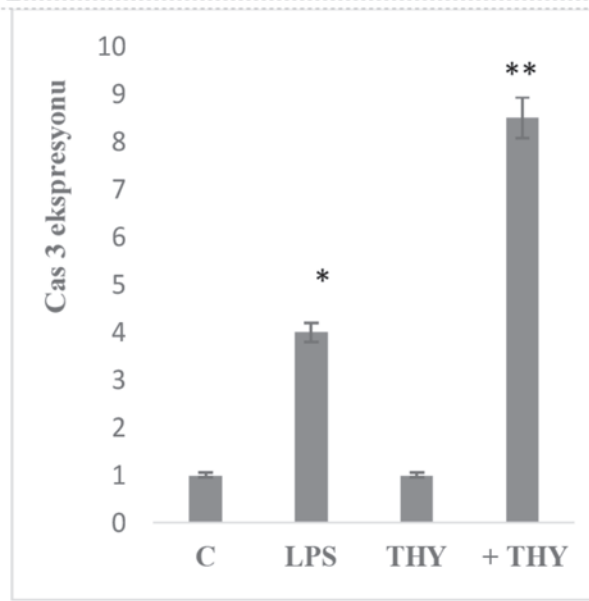
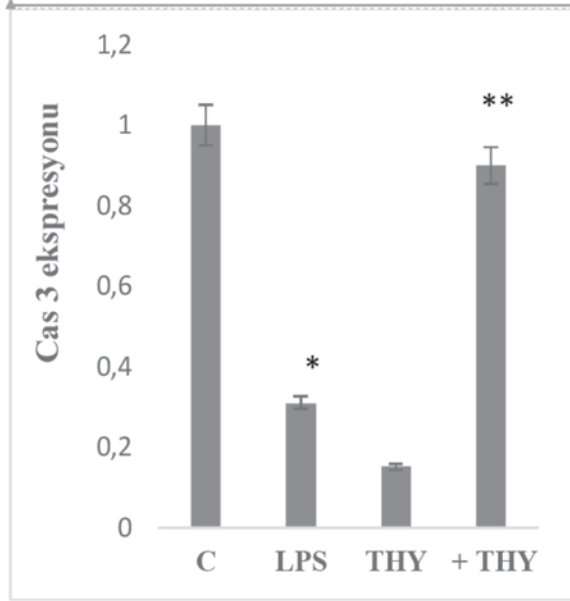
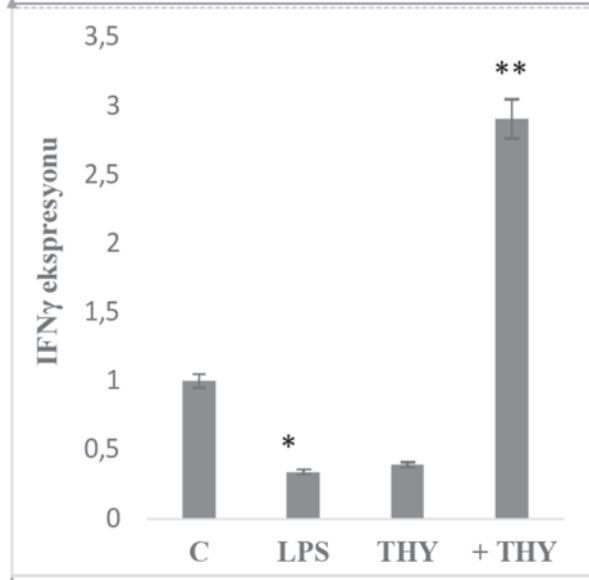
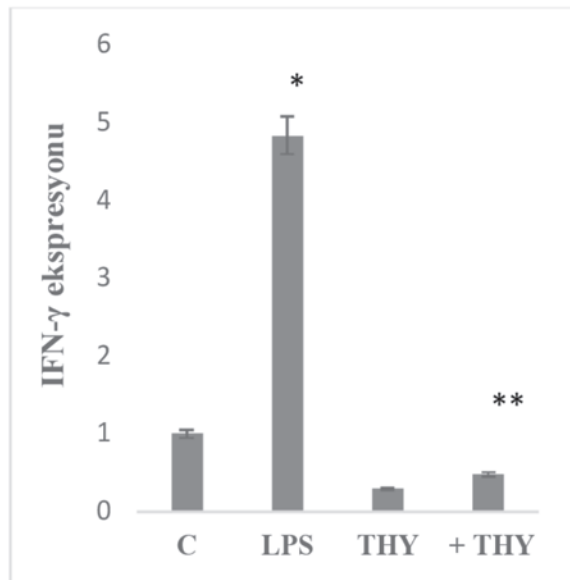
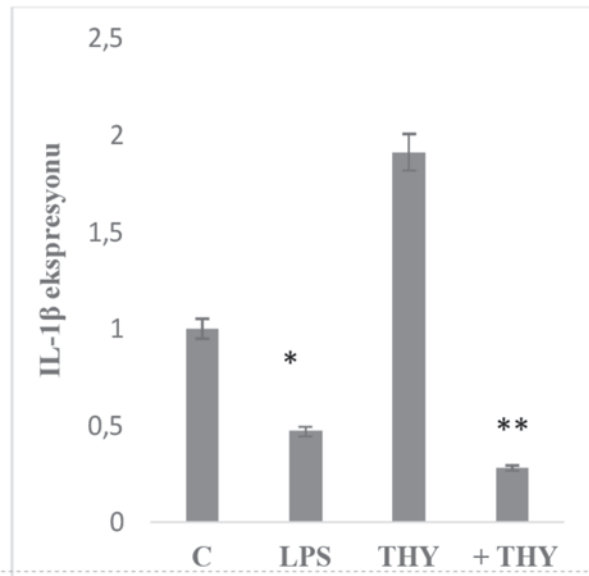
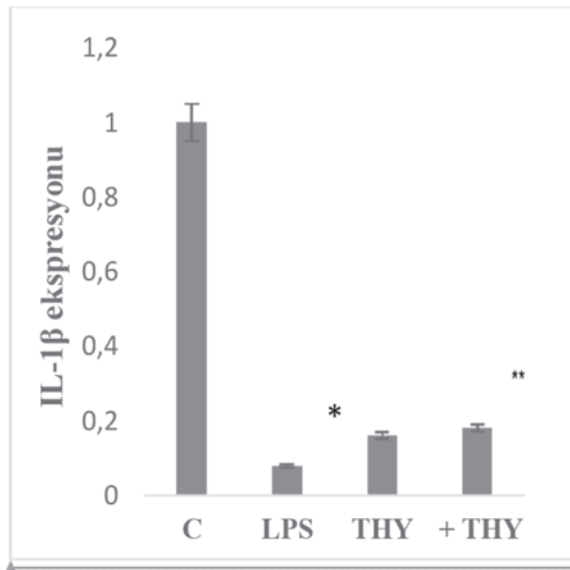
misli). THY uygulanması takiben azalmalar ile uyarılan Cas 3 ve 8 ekspresyonları 6,72 ve 6,14 misli değişimler gösterdi. +THY grubuna dahil kaspaz ekspresyon değişimleri artışlar ile uyarıldı (Cas 3-2,90 ve 8-3,33) (Şekil 1).

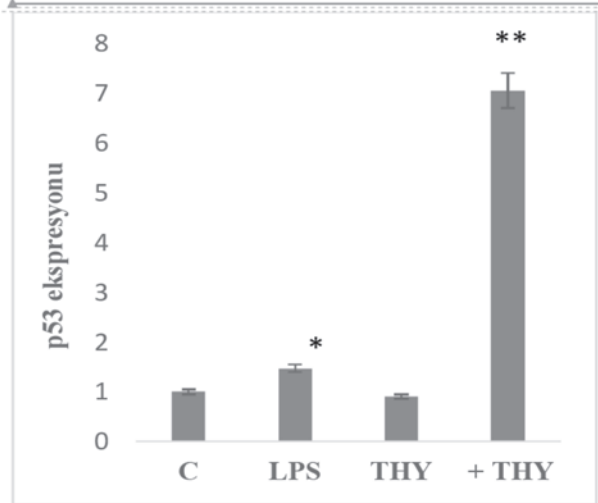
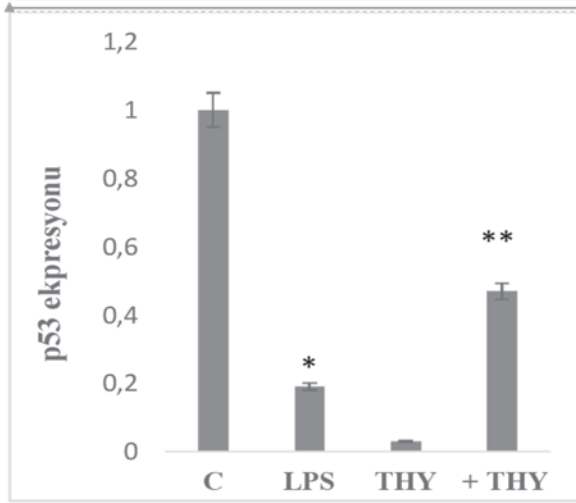
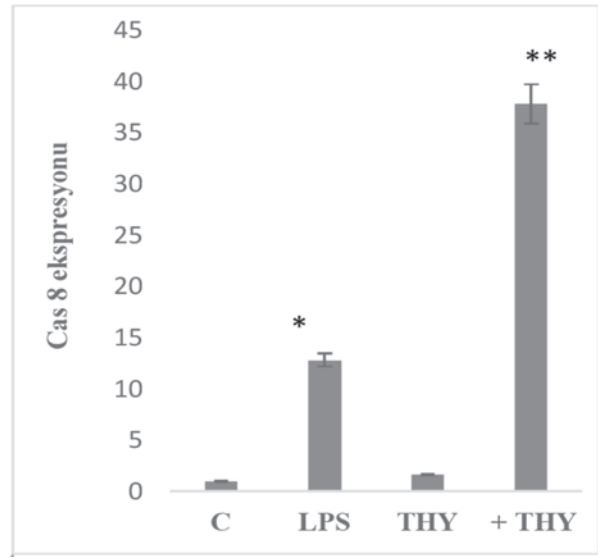
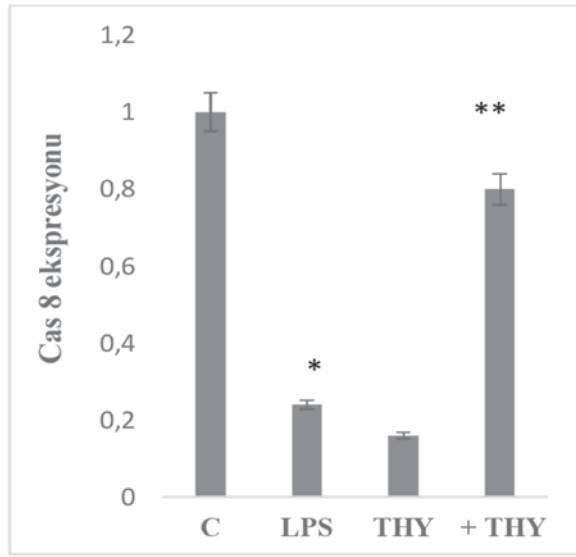
Karaciğer dokusu gen ekspresyon değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, LPS enfeksiyonunun IL-1 β ekspresyonu 2,14 misli azalttığı, timol destekli yemlemenin (THY) ise bu azalmış seviyeleri arttırdığı gözlemlendi. Ancak, LPS ile karşılaştırmalı sonuçlara göre enfeksiyonlu balıklar üzerinde timolün etkisi (+THY) IL-1 β ekspresyonunda 1,68 misli redük-siyona neden oldu. Hem LPS hem de THY uygulamaları IFN γ ekspresyonunu sırasıyla 2,87 ve 2,56 misli düşüşler ile uyardı. Ancak +THY grubunda 8,53 misli upregülasyon yukarı regülasyon gösterdi (Şekil 2). Apoptotik genlerden Cas 3 ve 8 ekspresyonları LPS enfeksiyonu-nu takiben sırasıyla 4 ve 12,81 misli upregüle yukarı regüle edildi.

THY ile Cas 3 ekspresyonu üzerinde herhangi bir değişim saptanmamış iken, Cas 8 ekspresyonunda hafif bir düşüş (1,58 misli) izlendi. +THY grubu LPS ile karşılaştırıldığında Cas 3 ve 8 ekspresyonlarında 2,13 ve 2,95 misli artışlar saptandı (Şekil 2).

Tablo 1. QPCR primers and GenBank IDs

Target genes	1) Forward primer (5'-3')	GenBank ID or reference
	2) Reverse primer (5'-3')	
IL-1β	1-CCG ACT CCA ACT CCA ACA CTA	AY617117
	2-TTG CTG GAG AGT GCT GTG GAA GAA	
IFN-γ	1-TCA CTG TCC TCA AAC GTG	AJ841811
	2-GCT GTT CAA CGG AAA ACC TGT TT	
Cas-3	1-TTT GGG AGT AGA TTG CAG GG	TC172513
	2-TGC ACA TCC ACG ATT TGA TT	
Cas-8	1-CAG CAT AGA GAA GCA AGG GG	TC172513
	2-TGA CTG AGG GGA GCT GAG TT	
GAPDH	1-TCC TCG ATG CCG AAG TTG TCG	AF027130
	2-ATG TCA GAC CTC TGT GTT GG	





Şekil 1. Böbrek dokusunda proinflamatuvar ve apoptoz gen ekspresyon seviyeleri * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$.

Şekil 2. Karaciğer dokusunda proinflamatuvar ve apoptoz gen ekspresyon seviyeleri * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$.

Tartışma

İç sularda üretim tesislerinin %50'sini oluşturan alabalık işletmelerinde baskın tür olarak yetiştiriciliği yapılan gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) stres faktörlerine (su kalitesinde bozulmalar, yoğun stok, hastalıklara direnç vb.) diğer türlere nazaran daha toleranslı olması yönüyle de önemli bir türdür. Alabalık yetiştiriciliğinde en önemli sorunlardan birisi olan hastalık problemleri özellikle gram olumsuz negatif (Gr -)

karaktere sahip 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 (Austin ve Austin, 2012; Roberts, 2012; Austin ve Austin, 2012).

Lipopolisakkarit, Gr -gram negatif bakterilerin dış membran komponenti olup endotoksik etkiden sorumludur (Van Amersfoort vd., 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 vd., 1998; Ellis, 1999). Yapılan bir çalışmada (Novoa vd., 2009) 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 vd., 2009). Yaptığımız çalışmada *E. coli* LPS gökkuşağı alabalıkları I/P olarak enfekte edilmiş sublethal konsantrasyon 25 µg/ml olarak belirlenmiştir. Konsantrasyon arası farklarda balıkların ağırlığı, genel ve bağışıklık durumları etkili olmuş olabilir.

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 vd., 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 terapötik maddelerin yetersiz kalması ve yan etkilerinin saptanması, enfeksiyöz 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. Kekik 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 vd., 2001). Sari vd. (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.

Balıkların çeşitli stresörlere verdiği yanıtlardan birisinde inflamasyondur. İnflamasyonun vasküler ve hücresele yanıtları, plazma hücrelerinden çıkan ve inflamatuvar bir uyararla meydana gelen kimyasal faktörlerle ortaya çıkmaktadır. Bu gibi kimyasal medyatörler inflamatuvar yanıtın oluşmasını etkilerken, özellikle LPS gibi inflamatuvar ajanlar, sitokin gen ekspresyonlarını arttırmaktadır (Maeda, 1998).

In vitro bir çalışmada, alabalıklar *Aeromonas salmonicida* bakterisi ile enfekte edilmiş ve bu bakteriye karşı IL-1β geninin stimüle edildiği bu stimülasyonun ise fagositik ve bakterisidal aktivitenin artışıyla meydana geldiği bildirilmiştir (Peddie vd. 2002). Chen vd. (2005), kanal kedi balıklarının yaygın balığının dalak ve baş böbreğinde IL-8 genini belirlemişler, bu ekspresyonun *Edwardsiella ictaluri* ile enfeksiyondan sonra 3-5 misli arttığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda *E.coli* LPS'si ile I/P olarak enfekte edilen gökkuşağı alabalıklarının böbrek ve karaciğer dokularında IL-1β ve IFNγ ekspresyonlarının sevi-

yelerinde 3 misli azalmalar tespit edildi. Yalnızca böbrekte IFN γ geninin ekspresyonunda artışlar görüldü. Elde ettiğimiz sonuçlar, Chen vd. (2005) ve Peddie vd. (2002) ile stimülasyon yönüyle benzerlikler gösterse de misli değişimlerde izlenen farkların stres uyaranının (enfeksiyon, düşük sıcaklık vb.) doz-zamana bağlı değer farklılıklarından, incelenen doku ve denemede kullanılan türsel farklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozisin oluşumunda farklı virüs ve bakteriler, immüne hücrelerin özellikle makrofajların apoptotik ölümünün aktivasyonu ile savunma mekanizmalarından kaçarak bir yaşam stratejisi geliştirmektedirler (Hong vd., 2005; Carrero ve Unanue, 2006; Rojas vd., 2010). Balık hastalıklarının patogeneğinde önemli bir yere sahip olan apoptotik hücre ölümü son yıllarda birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. *In vitro* bir çalışmada, salmon balıklarının sistemik enfeksiyonu olan riketsial septisemi hastalığında apoptozisin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlenerek makrofajlarda apoptozisin indüklendiği saptanmıştır (Rojas vd., 2010). Bir diğer çalışmada Soto vd. (2010) *Francisella asiatica* ile enfekte tilapialarda (*Oreochromis spp.*) baş ön 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 vd., 2007). Lipopolisakkarit ile enfekte balıklardan temin ettiğimiz böbrek ve karaciğer doku örneklerinde Cas 3 ve Cas 8 gen ekspresyon seviyelerinde karaciğerde artışlar, böbrekte azalmalar tespit edildi.

Ancak timol destekli yemleme uygulamasında (THY) timolün etkinliği kaspaz ekspresyon seviyelerinde önemli değişimler göstermedi ($P < 0.05$). Enfekte balıklarda ise timol (+THY) tüm dokuların kaspaz gen ekspresyonlarında kontrole göre yaklaşık 3 misli upregülasyonlar ile uyarıldı. CAS-3 ve CAS-8 ekspresyon seviyelerinde izlenen bu değişimler Sepulcre vd. (2007) çalışmalarıyla benzerlikler göstermektedir.

Esansiyel yağların ana bileşiğinden biri olan timolün balık patojenlerine karşı antiinflamatuar ve apoptotik etkilerini ortaya koymayı amaç edinen bu çalışmada, LPS enfeksiyonun oluşturduğu yangısal durumun timol destekli yemleme baskılandığı elde edilen up/down-yukarı/aşağı regülasyonlarla ortaya kondu. Çalışma konusu, ilgili literatür taramaları için bir örnek teşkil etmektedir. Bu bağlamda, bitkisel destekli yemlemenin balıkların immün modülasyon üzerindeki etkilerini daha iyi anlamak için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu da bir gerçektir.

Teşekkür

Bu çalışma Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi (MÜNİBAP) tarafından YLTUB015-12 nolu proje ile desteklenmiş olup laboratuvar analizleri için Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı destek vermiştir.

Kaynaklar

- Akinbowale, O. L., Peng, H. ve Barton, M. D. 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. Journal of Applied Microbiology, 100: 1103-1113. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02812.x.
- Aeschbach, R., Loliger, J., Scott, B. C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B. ve Aruoma, O. I. 1994. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. Food

- Chemical Toxicology, 26: 31-36.
doi: 10.1016/0278-6915(84)90033-4.
- Ashkenazi, A. ve Dixit, V. M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281: 1305-130. doi: 10.1126/science.281.5381.1305.
- Austin, B. ve 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. ve Izawa, K. 1988. Immune protection in carp, *Cyprinus carpio* L. after immunization with *Aeromonas hydrophila* crude LPS. *Journal of Fish Disease*, 11: 237-244. doi: 0.1111/j.1365-2761.1988.tb00544.x.
- Başer, K. H. C., Özek, T., Kürkçüoğlu, M. ve Tümen, G. 1994. The essential oil of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* of Turkish origin. *Journal of Essential Oil Research*, 6 (1): 31-36.
doi:10.1080/10412905.1994.9698321.
- Baytop, T. 1963. Türkiye'nin Tıbbi ve Zehirli Bitkileri. İ.Ü. Yayınları, İstanbul No:1039, İstanbul, 351 pp.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foodssa review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- 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. doi: 10.1111/j.1462 2920.2006.01054.x.
- Carrero, J. ve Unanue, E. 2006. Lymphocyte apoptosis as an immune subversion strategy of microbial pathogens. *Trends in Immunology*, 27(11): 497-503. doi:10.1016/j.it.2006.09.005.
- Chakraborty, S., Nandi, S., Sinha, S. ve Gera, V. 2006. Zebrafish caspase-3: Molecular cloning, characterization, crystallization and phylogenetic analysis. *Protein & Peptide Letters*, 13(6): 633-640. Doi: 10.2174/092986606777145850.
- Chen, L., He, C., Baoprasertkul, P., Xu, P., Li, P., Serapion, J., Waldbieser, G., Wolters, W. ve Liu, Z. 2005. Analysis of a cat fish gene resembling interleukin-8: Cdna cloning, gene structure, and expression after infection with *Edwardsiella ictaluri*. *Developmental Comparative Immunology*. 29: 135-142,
doi:10.1016/j.dci.2004.06.011.
- Choi, S. I., Ju, W. K., Choi, E. K., Kim, J., Lea, H. Z., Carp, R. I., Wisniewski, H. M. ve Kim, Y. S. 1998. Mitochondrial dysfunction induced by oxidative stress in the brains of hamsters infected with the 263K scrapie agent. *Acta Neuropathologica*, 96: 279-286. doi: 10.1080/15376510802255184.
- Degterev, A., Boyce, M. Yuan, J. 2003. A decade of caspases. *Oncogene*. 22: 8543-8567.
- Eimon, P. M. ve Ashkenazi, A. 2010. The zebrafish as a model organism for the study of apoptosis. *Apoptosis*, 15: 331-349.
doi:10.1038/sj.onc.1207107.
- Ellis, A. E. 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunology*, 9: 291-308. Doi: 10.1590/0001-3765201420130159.
- Friedman, M., Henika, P. R. ve Mandrell, R. E. 2002. Bactericidal activities of plantessential oils and some of theirisolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria amonocyto genes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65: 1545-1560.
doi: 10.1111/1750-3841.12021.
- Hashiem, M. ve Abd El-Galil, M. A. A. 2012. Studies on Edwardsiellosis in *Clarias gariepinus* Fish at Sohag Governorate. *Journal of American Science*, 8(4): 442-447.
- Hirata, H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, K. ve Sasada, M. 1998. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 187: 587-600.
doi: 10.1084/jem.187.4.587.
- Hong, J. R., Huang, L. J. ve 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.
doi: 10.1111/j.1365-2761.2004.00604.x.
- Knapp, S., Florgun, S., Golenbock, D. T. Ve Van Der, T. 2006. Pulmonary lipopolysaccharide (LPS) binding protein inhibits the LPS induced lung inflammation in vivo. *The Journal of Immunology*, 176: 3189-3195.
doi:10.4049/jimmunol.176.5.3189.
- Koul, O., Walia, S. ve Dhaliwal, G. S. 2008. Essential oils as green pesticides: Potential and constraints. *Biopesticides International*, 4(1): 63-84.
- Küçükgül, G. A., Küçükgül, A., Danabaş, D., Ural, M., Şeker, E., Arslan, A. ve Serdar, O. 2013a. The 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.

- Küçükgül, G. A., Danabaş, D., Ural, M., Şeker, E., Arslan, A. ve Serdar, O. 2013b. 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. doi:10.2754/avb201382030297
- Kum, C., Gökbulut, C., Akar, F., Kırkan, Ş. ve Sekkin, S. 2004. Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Enterococcus seriolicida* izolasyonu ve etkili antibakteriyel sağaltım seçeneğinin belirlenmesi. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi, 75: 47-53.
- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J. ve 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. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x.
- Lee, S. J., Umano, K., Shibamoto, T. ve 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.
- Maeda, H. A. T. 1998. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. Biochemistry, 63: 854-65.
- Navarrete, P., Toledo, I., Mardones, P., Opazo, R., Espejo, R. ve 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. doi: 10.1111/j.1365-2109.2010.02590.x.
- Novoa, B., Bowman, T. V., Zon, L. ve Figueras A. 2009. LPS response and tolerance on the zebrafish (*Danio rerio*). Fish and Shellfish Immunology, 26(2): 326-331. doi: 10.1016/j.fsi.2008.12.004.
- Pastoret, P. P., Griebel, P., Bazin, H. ve Govaerts, A. 1998. Handbook of Vertebrate Immunology. Academic Press, OH, USA, 673 pp.
- Peddie, S., Zou, J. ve Secombes, C. J. 2002. Biologically active IL-1 β derived peptidestimulates phagocytosis and bactericidal activity in Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) head kidney leucocytes in vitro. Journal of Fish Diseases, 25: 351-360. doi: 10.1046/j.1365-2761.2002.00380.x.
- Pfaffl, M. W. ve Hageleit, M. 2001. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. Biotechnology Letters, 23: 275-282.
- Reed, J. C. 2000. Mechanisms of apoptosis. American Journal of Pathology, 157: 1415-1430. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64779-7.
- Reis, M. I. R., Nascimento, D. S., Do Vale, A., Silva, M. T. ve 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. doi:10.1016/j.fsi.2007.02.003.
- Roberts, R. J. 2012. Fish pathology 4th edition. Wiley-Blackwell, 978-1444332827
- Rojas, V., Galanti, N., Bols, N. C., Jiménez, V., Paredes, R. ve 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. doi: 10.1002/jcb.22560.
- Schnick, R. A., Alderman, D. J., Armstrong, R., Le Gouvello, R., Ishihara, S. ve Roth, M. 1997. World wide aquaculture drug and vaccine registration progress, Bulletin-European Association of Fish Pathologists Journal, 17 (6): 251-260.
- Sepulcre, M. P., López-Castejón, G., Meseguer, J. ve 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. Molecular Immunology, 44: 2009-2016. doi:10.1016/j.molimm.2006.09.022.
- Shimizu, S., Narita, M. ve Tsujimoto, Y. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. Nature, 399: 483-487. doi:10.1038/20959.
- Soto, E., Fernandez, D., Thune, R. ve Hawke, J. P. 2010. Interaction of *Francisella asiatica* with tilapia (*Oreochromis niloticus*) innate immunity. Infection and Immunity, 78: 2070-2078. doi:10.1128/IAI.01308-09.
- Toroğlu, S. ve Çenet, M. 2006. Tedavi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin kullanım alanları ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılan metotlar. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 9 (2): 12-20.
- Van Amersfoort, E. S., Van Berkel, T. J. ve Kuiper, J. 2003. Receptors, mediators and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. Clinical Microbiology Reviews, 16(3): 379-414. doi: 10.1128/CMR.16.3.379-414.2003.