

T.C.  
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



MUNZUR  
ÜNİVERSİTESİ  
2008

LİPOLİSAKKARİT (LPS) İLE UYARILMIŞ GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI  
GONAD HÜCRELERİNDE (RTG-2) *Inula viscosa* L.'NİN ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Tülay METİN KORKMAZ

Anabilim Dalı: Su Ürünleri

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Azime KÜÇÜKGÜL

TUNCELİ – 2019

T.C.  
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİPOLİSAKKARİT (LPS) İLE UYARILMIŞ GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI  
GONAD HÜCRELERİNDE (RTG-2) *Inula viscosa* L.'NİN ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Tülay METİN KORKMAZ  
(12876630)

Anabilim Dalı: Su Ürünleri

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Azime KÜÇÜKGÜL

TUNCELİ- 2019

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

**LİPOLİSAKKARİT (LPS) İLE UYARILMIŞ GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI**  
**GONAD HÜCRELERİNDE (RTG-2) *Inula viscosa* L.'NİN ETKİLERİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**Tülay METİN KORKMAZ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

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

**İmza:.....**

Doç. Dr. Azime  
KÜÇÜKGÜL  
(Munzur Üniversitesi)

**DANIŞMAN**

**İmza:.....**

Prof. Dr. Ahmet ÖZER  
(Sinop Üniversitesi)

**ÜYE**

**İmza:.....**

Prof. Dr. Mustafa  
DÖRÜCÜ  
(Munzur Üniversitesi)

**ÜYE**

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

Doç. Dr. Numan YILDIRIM  
Enstitü Müdürü  
İmza ve Mühür

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

**Proje No: YLMUB017-22**

**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, gökkuşuğu alabalığından izole edilmiş gonad hücre hattı (RTG-2) LPS ile enfekte edilmiş *I. viscosa*'nın anti-proliferatif ve anti-inflamatuar etkileri incelenmiştir. Ön çalışmalarla farklı konsantrasyonlarda LPS (1, 5, 10 ve 20 µM/ml) ve *I. viscosa* (IV) (1, 5, 10 ve 20 µg/ml)'nin etkin ve hücreler için toksik doz tespitleri viabilite testleriyle çalışılmıştır. Elde edilen verilere göre, 5 µM/ml LPS konsantrasyonunun kontrol grubuna göre % 2 proliferasyon gösterdiği, 10 ve 20 µM/ml'de sırasıyla %4 ve %27 oranında azalmalar kaydedildiği saptanmıştır. Bu nedenle deneysel enfeksiyon için 20 µM/ml LPS etkin konsantrasyon olarak seçilmiştir. *I. viscosa* ise 1µg/ml konsantrasyonda kontrol grubuna göre % 1,1'lik hücre proliferasyonu göstermiş, artan konsantrasyonlarla (5, 10 ve 20 µg/ml) hücre canlılığını üzerinde sırasıyla % 1.7, %19 ve % 36 düzeylerinde azaltıcı etkiler kaydedilmiştir. Antisitetoksik etkinliğine sahip *I. viscosa*'nın 1µg/ml konsantrasyonu deneme için kullanılmıştır. Daha sonrasında dört deneysel düzenek kurgulanmıştır. İlk grup kontrol grubu olarak değerlendirilmiş (C), ikinci grup LPS ile enfekte edilmiştir (LPS). Üçüncü grup yalnızca *I. viscosa* ile muamele edilmiş (IV), son grup LPS ile enfekte edilen gonad hücreleri üzerinde *I. viscosa*'nın maruziyeti (LPS+IV) ile oluşturulmuştur. *I. viscosa* esansiyel uçucu yağı su destilasyonu yöntemi kullanılarak temin edilmiştir. Antiinflamatuar etki için hedeflenen IL-1β, IL-8 ve TNF-α genlerinin ekspresyonları qRT-PCR metodu ile belirlenmiştir. IL-6 protein düzeyi tespiti için ELISA yöntemi uygulanmıştır. LPS ile enfekte edilen RTG-2 hücrelerinde araştırılan tüm pro-enflamatuar parametreler up regülasyonlar sergilemiş, en fazla TNF-α gen ekspresyon düzeyinde artış görülmüştür (11.3 kat). LPS maruziyeti sonunda İV eklenen grupta ise down regülasyonlar izlenerek, en fazla etkiyi %96 ile IL-1β göstermiştir. IL-6 protein düzeyi için veriler değerlendirildiğinde, tersi bir durum görülmüş, kontrol grubuna göre LPS tarafından % 4 oranında azalma, LPS maruziyeti sonunda İV eklenen grupta ise yaklaşık %9 oranında artma olduğunu belirlenmiştir.

Pro-enflamatuar sitokinler üzerinde *I. viscosa*'nın etkinliği bu çalışma ile ortaya konularak, LPS inhibisyonu ve LPS'ye karşı İV'nin anti-enflamatuar etkileri olduğu belirlenmiştir. Fakat daha ileriki çalışmalarla *I. viscosa*'nın farmakolojik etkinliği birçok yönden daha detaylı olarak çalışılmalıdır.

**Anahtar kelimeler:** Anti-inflamatuar, Anti-proliferatif, *Inula viscosa*, Lipopolisakkarit, RTG-2 hücre hattı

## ABSTRACT

### Investigation of the effects of *Inula viscosa* L. in rainbow trout gonad cells (RTG-2) induced by lipopolysaccharide (LPS)

In this study, the anti-proliferative and anti-inflammatory effects of *I. viscosa* infected with LPS were investigated in gonad cell line isolated from rainbow trout (RTG-2). Preliminary studies were carried out the toxic dose determinations for the cells with different concentrations of LPS (1, 5, 10 and 20  $\mu$ M/ml) and *I. viscosa* (IV) (1, 5, 10 and 20  $\mu$ g/ml) were studied by viability tests. According to the obtained data, it was found that the concentration of 5  $\mu$ M/ml LPS showed 2% proliferation compared to the control group, and decreases of 4% and 27% were recorded in 10 and 20%  $\mu$ M/ml, respectively. Therefore, 20  $\mu$ M/ml LPS for experimental infection were selected as the active concentration. *I. viscosa* showed 1.1% cell proliferation with a concentration of 1 $\mu$ g/ml compared to the control group, reducing effects recorded with increasing doses (5, 10 and 20  $\mu$ g/ml) on cell viability of 1.7%, 19% and 36%, respectively. The concentration of 1  $\mu$ g/ml *I. viscosa* with anti-cytotoxic activity was used for experiments. Then, four experimental instruments were designed. The first group was evaluated as a control group (C), the second group was infected with LPS (LPS), the third group treated with only LPS (LPS), and finally the last group was formed by exposure of *I. viscosa* (LPS + IV) on gonad cells infected by LPS. The essential essential oil of *I. viscosa* was obtained by water distillation method. Expressions of IL-1 $\beta$ , IL-8 and TNF- $\alpha$  genes targeted for anti-inflammatory effect were determined by qRT-PCR method. ELISA method was used to detect IL-6 protein levels. All pro-inflammatory parameters investigated in the LPS-infected cells of RTG-2 showed up-regulations TNF- $\alpha$  gene expression level (11.3 times) was the most increased. In the group added with IV following of LPS exposure, down regulation was monitored and the most effective was IL-1 $\beta$  with 96%. When the data for the IL-6 protein level were evaluated, the situation was opposite. As there was a 4% decrease by LPS when compared to the control group and an increase of 9% in the group with IV addition following of LPS exposure.

The efficacy of *I. viscosa* on pro-inflammatory cytokines was demonstrated, LPS inhibition and anti-inflammatory effects of IV against LPS were determined in the present study. However, further studies are needed to determine pharmacological activity of *I. viscosa* in more detail in many respects.

**Key words:** Anti-inflammatory, Anti-proliferative, *Inula viscosa*, Lipopolysaccharide, RTG-2 cell line

## TEŞEKKÜRLER

Çalışma süresince her konuda yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle her daim yanımda olan danışman hocam Doç. Dr. Azime KÜÇÜKGÜL'e, deneysel analizlerin gerçekleştirilmesinde imkân ve olanaklarından faydalandığımız Mustafa Kemal Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dekanlığı'na, Biyokimya Laboratuvarı personeline ve yardım ve destekleri için Sayın Doç. Dr. Altuğ KÜÇÜKGÜL'e, esansiyel yağ ekstraksiyonlarının sağlanmasında yardımları için Dr. Öğr. Üyesi Aydın ALTOP ve 19 Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki koruma Laboratuvarı personeline, ayrıca bu çalışmayı destekleyen Munzur Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi'ne çok teşekkür ederim.

Ayrıca her daim destekleri ile yanımda olan eşim ve aileme teşekkürü bir borç bilirim.

**Tülay METİN KORKMAZ**  
**TUNCELİ- 2019**

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>III</b>
<b>TEŞEKKÜRLER</b> .....	<b>IV</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>V</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>VI</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b> .....	<b>VII</b>
<b>RESİMLER LİSTESİ</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Literatür Bilgisi.....	3
<b>2. MATERYAL VE METOT</b> .....	<b>14</b>
2.1. Materyal.....	14
2.1.1. LPS ( <i>Escherichia coli</i> , serotip O26:B6).....	14
2.1.2. <i>Inula viscosa</i> (L.).....	14
2.1.3. Hücre Kültürü.....	14
2.1.4. Deneysel Çalışma.....	15
2.2. Metot.....	15
2.2.1. <i>Inula viscosa</i> Uçucu Yağının Eldesi.....	15
2.2.2. Hücre Canlılığı (MTT Metodu).....	16
2.2.3. RNA izolasyonu ve qRT-PCR.....	<b>17</b>
2.2.4. Lizat Hazırlama ve IL-6 Protein Düzeyi Tespiti.....	18
2.2.5. İstatistiksel Analizler.....	19
<b>3. BULGULAR</b> .....	<b>20</b>
3.1. Hücre Canlılık Testleri.....	20
3.2. Hücre Görüntülemeleri.....	22
3.3. Gen Ekspresyon Sonuçları.....	25
3.4. Protein Düzeyi Sonuçları.....	27
<b>4. TARTIŞMA</b> .....	<b>29</b>
<b>5. SONUÇLAR</b> .....	<b>34</b>
<b>6. ÖNERİLER</b> .....	<b>35</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>36</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SEKİLLER LİSTESİ

## Sayfa No

Şekil 3.1. Farklı konsantrasyonla hücelere LPS uygulanımı sonucu elde edilen hücre viabilitesi .....	20
Şekil 3.2. Farklı konsantrasyonla hücelere <i>I. viscosa</i> uygulanımı sonucu elde edilen hücre viabilitesi (24 saat) .....	21
Şekil 3.3. Farklı konsantrasyonla hücelere ve LPS 20 uM/ml ve IN 1ug/ml uygulanımı sonucu elde edilen hücre viabilitesi .....	22
Şekil 3.4. IL-1 $\beta$ ekspresyon düzeyi.....	26
Şekil 3.5. IL-8 ekspresyon düzeyi.....	26
Şekil 3.6. TNF- $\alpha$ ekspresyon düzeyi.....	27
Şekil 3.7. Elde edilen Standart eğrisi ve standart formülasyonu.....	28
Şekil 3.8. IL-6 Protein düzeyi.....	28



## **TABLULAR LİSTESİ**

## **Sayfa No**

Tablo 1.1. <i>Inula viscosa</i> (L.) yapraklarının su distilasyonu (hidrodistilasyon-HD) ve buhar distilasyonu (SD) ile esansiyel yağ kompozisyonu.....	10
Tablo 2.1. Araştırma grupları.....	15
Tablo 2.2. Hedef gen spesifik primer dizgeleri .....	18



## RESİMLER LİSTESİ

## Sayfa No

Resim.1.1. Lippopolisakkaritin yapısı .....	5
Resim 1.2. <i>Inula viscosa</i> L. ....	9
Resim 2.1. <i>I. viscosa</i> esansiyel yağ ekstraktı .....	16
Resim 3.1. Kontrol grubu hücre görüntüsü (20 x).....	23
Resim 3.2. LPS 20 µM/ml grubu hücre görüntüsü (20 x).....	23
Resim 3.3. IV 1µg/ml grubu hücre görüntüsü (20 x).....	24
Resim 3.4. IV 20 µg/ml grubu hücre görüntüsü (20 x).....	24
Resim 3.5. IV 1µg/ml + LPS 20 µM/ml grubu hücre görüntüsü (20 x).....	25



## 1. GİRİŞ

Türkiye'nin birçok bölgesinde olduğu gibi yöremizde de balık çiftlikleri için en büyük problemlerin başında balık hastalıkları gelmektedir. Balık yetiştiriciliği işletmelerinde infeksiyöz hastalıklar ve özellikle bakteriyel kaynaklı olanlar en fazla sorunu oluşturmaktadır. Hastalıklara sebebiyet veren bu etkenler gram negatif karakterde olup hücre duvarında bulunan ve konak vücudunun doğal bağışıklığı tarafından algılanan lipopolisakkarit (LPS) ile ortaya çıkmaktadır ki bu durum sitokin salınımını ile hastalık insidensini arttırmaktadır. LPS, gram negatif bakteri hücre duvarında bulunan, vücudun doğal bağışıklığı tarafından algılanan ve tanınan en önemli bakteri ürünüdür. Bir endotoksin olan LPS'nin toksik parçası lipid A, septik sürecin başlamasında ve ilerlemesinde önemli rol oynar.

Yetiştiricilik ünitelerinde geçmiş zamanlarda bilinçsiz olarak kullanılan antibiyotik tedavileri balık hastalıkları ile mücadelede etkin yol olarak seçilmiş ve bu nedenle yarardan çok zarar gören işletmeler son yıllarda daha kullanışlı, daha yararlı ve risk faktörü daha düşük alternatif yöntem arayışına girmişlerdir. Birçok bilim adamı handikapından dolayı özellikle balık yetiştiricilik işletmeleri için antibiyotik kullanımını azaltmaya yönelik çalışmalar yapmış ve uygun tedavi stratejileri geliştirmiştir. Bu vesile ile son yıllarda daha evvelden de tıbbi amaçlı kullanılan bitkisel ürünler alternatif olarak değerlendirilmiştir.

Asteraceae familyasından *Inula viscosa* L. halk arasında yapışkan andız otu olarak bilinmekte ve hastalıkların tedavisinde alternatif bir çözüm olarak kullanılabilir. *I. viscosa* Akdeniz havzasında geniş bir yayılıma sahip olup yaklaşık yüz türü bulunmaktadır. Türkiye'de ise 27 türü bulunan *Inula* cinsi endemik karakterde olup kendiliğinden yetişen ve her dem yeşil olan bitkilerdir. *Inula* spp. içerdiği seskiterpen ve monoterenler ile uzun yıllardır tıbbi amaçlı kullanılmakta ve birçok biyolojik aktivitede (antifungal, antiinflamatuvar, antibakteriyel, antikanser vb.) görev yapmaktadır.

Günümüzde artan gıda ihtiyacına paralel olarak özellikle alabalık yetiştiriciliği hızlı bir ivme kazanmış ve birçok bölgede geçim kaynağı olacak konuma gelmiştir. Soğuk sulara yetiştirilen en yaygın balık türü gökkuşağı alabalığıdır (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). Ülkemizin konum itibarıyla tatlı su kaynakları açısından geniş imkânlarla sahip olması kültür balıkçılığı için uygun ortamlar oluşturmaktadır. Özellikle soğuk, bol oksijenli suları seven, üretiminde bol miktarda suya gereksinim duyan alabalıklar kültür

balıkçılığının temelini oluşturmaktadır. Birçok yörede gökkuşuğu alabalığı yetiştiriciliği diğer alabalıklara göre tolerans sınırlarının fazla olması, et kalitesi ve daha lezzetli olmasıyla tercih edilmektedir.

*In vivo* çalışmaların en büyük sıkıntısı canlı hayvanların deneylerde kullanılması ve zarar görmeleridir. Oysaki canlıya zarar vermeden laboratuvar ortamlarında uygun koşullar sağlanarak (*in vitro*) yapılan çalışmalar (hücre kültürü, doku kültürü vb.) son yıllarda bilim insanlarınca kabul görmüş ve daha spesifik çalışmaların yapılmasına imkan sağlamıştır. Bu amaçla en fazla yetiştiriciliği yapılan türlerin başında gelen gökkuşuğu alabalığı önemli bir materyal olarak kullanılmış ve bundan izole edilen birçok hücre hattı (RTG-2/gökkuşuğu alabalığı gonad hücre hattı, RTS-11/gökkuşuğu alabalığı makrofaj hücre hattı, RTL-W1/gökkuşuğu alabalığı solungaç epitel hücre hattı vb.) üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır (Küçükgül ve ark., 2019).

Bağışıklık sistemi organizmayı enfeksiyonlara veya hastalığa neden olabilecek organizmalara veya maddelere karşı koruyan karmaşık bir sistem olarak tanımlanabilir. Bağışıklık sisteminin en etkileyici özelliklerinden biri, belirgin özgülükleri olan patojenleri tanıma ve bunlara cevap verme yeteneğidir. Doğal ve uyarlanabilir bağışıklık tepkileri yabancıyı tanıyabilir antijen eliminasyonu için yapılar ve farklı moleküler ve hücrel mekanizmaları tetikler. Daha yüksek omurgalılarda, bağışıklık sistemi, anatomik olarak farklı bölgelere yerleştirilmiş, farklı bölmeleri ve morfolojileri olan birincil ve ikincil lenfoid organlardan oluşur. Tüm omurgalılarda olduğu gibi, balıklarda da hücrel ve humoral immün tepkiler ve organlar bulunur ki ana işlevi immün savunmadır.

Sitokinler, immün yanıtların doğasını düzenleyen büyüme, farklılaşma ve aktivasyon fonksiyonları ile salgılanan proteinlerdir. Sitokinler makrofajlar, lenfosit kütlesi hücreleri ve epitel hücreleri tarafından üretilir ve interferonlar (IFN'ler), interlökinler (IL'ler), tümör nekroz faktörleri (TNF'ler), koloni uyarıcı faktörler ve kemokinler şeklinde ayrılabilir. Balık hastalıkları ile mücadelede sitokinlerin varlığı özellikle immün yetersizlik hastalıklarında bu parametrelerdeki hızlı değişimlerle hastalık belirteci olarak değerlendirilmektedir. Sitokinler çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen ve salgılanan polipeptidler olup bağışıklık sisteminin farklı bileşenlerinin eksikliğine bağlı olarak gelişebilirler. Ayrıca, tümör nekroz faktör (TNF), interlökinler (IL-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 vb.), interferonlar (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  ve IFN- $\gamma$ ) gibi pro-enflamatuar sitokinler enflamasyon,

hücre büyümesi, iyileşmesi gibi sistemik bağışıklık ve enflamatuar olayları düzenlemektedir.

Yürütülen bu araştırmada, LPS ile enfekte edilmiş gökkuşuğu alabalık gonad hücreleri (RTG-2) üzerinde doğal antioksidan ve inflamasyon (yangı) giderici özelliği bulunan *Inula viscosa*'nın (yapışkan andız otu) anti-proliferatif ve anti-enflamatuar etkinlikleri pro-enflamatuar sitokinlerin (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 ve IL-6) gen ekspresyon değişimleri izlenerek çalışılmıştır.

### 1.1. Literatür Bilgisi

Türkiye ekonomisinde büyükbaş ve küçükbaş hayvan üretiminin yetersiz olması, kırmızı etin aşırı tüketiminin insan sağlığında oluşturduğu olumsuzluklar, maliyet yüksekliği gibi nedenlere bağlı olarak balık üretimi gündün güne önem kazanmaktadır ve su ürünleri ülke ekonomisinde önemli bir yere sahiptir.

Besin bileşenlerinin içeriğinin zengin olması özellikle sağlığımız üzerindeki olumlu etkisinin bilinmesi ile bugün balık tercih edilmektedir. Balık tüketiminde artan talebi karşılamak amacıyla Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının kültür balıkçılığını desteklemesi ve bunun yanında ülkemizin konum itibarıyla de iç su kaynakları bakımından oldukça zengin olması birçok yöresinde irili ufaklı birçok balık yetiştiricilik işletmesinin kurulmasına olanak sağlamıştır. Alabalıklardan özellikle gökkuşuğu alabalığı kültür ortamında kolay yetiştirilmesi, yem değerlendirme oranının iyi olması, ortama kolay uyum sağlayabilmeleri ve bazı hastalıklara karşı daha dayanıklı olabilmeleri gibi özelliklerinden dolayı tüm dünyada tercih edilen balık türüdür (Hickling, 1971; Çelikkale, 1994; Aras ve ark., 2000; Timur ve Timur, 2003).

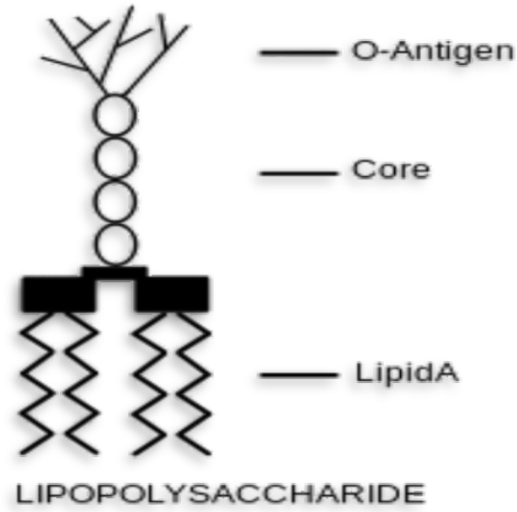
Kültür balıkçılığının temelini oluşturan alabalık yetiştiriciliğinde en büyük sorunların başında gelen olası bir hastalık problemi, özellikle bakteriyel kaynaklı infeksiyöz hastalıklar ve bu hastalıklara bağlı gözlenen ölümler ile ortaya çıkan ekonomik kayıpların neredeyse toplam üretimin %10'unu oluşturması nedeniyle yetiştiriciler için önemli sorun olmaktadır (Arda ve ark., 2002). Bunun yanında yetiştiricilik ünitelerinde bilinçsiz yetiştiricilik, beslenme ve çevre koşullarının optimal limitlerin dışında bulunduğu ve stres faktörlerinin yoğun olduğu durumlarda ve bu şartların kısa sürede normal sınırlara gelmediği veya getirilemediği hallerde topluca ölümler ortaya çıkabilmekte ve verimi düşürmektedir. Hastalığın şiddeti; balığın yaşına ve türüne göre değişmekle birlikte

balıklardaki birçok enfeksiyonun tedavisi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Ancak çevre şartlarının olumsuzluğu (non-optimal su parametreleri, yem kaynaklı sorunlar vb.) hastalıktan korunmayı ve kontrol önlemlerinin alınmasını zorlaştırmakta, hatta imkânsız hale getirmektedir.

Sucul canlıların içinde yaşadığı ortamın fiziksel ve kimyasal faktörleri balığın bağışıklık sistemi üzerinde direkt etkiye sahiptir. Bu nedenle bağışıklık sisteminin zayıflaması ile ciddi problemler açığa çıkmaktadır ki bunda etkili olan gram negatif karakterdeki bakteri kaynaklı hastalıklar sıklıkla görülmektedir.

Gram negatif bakterilerde hücreyi zorlu çevre şartlarına karşı koruyan hücre çeperi bazı enzimatik sistemleri de bünyesinde bulundurmaktadır (Lima de Faria, 1969; Koebnik ve ark., 2000). Gram negatif bakterilerde hücre çift katlı bir membran ile çevrilidir ve dış membran; tamamı sitoplazmada sentezlenen fosfolipidler, lipopolisakkaritler, lipoproteinler ve integral dış membran proteinlerinden (OMP) meydana gelmektedir (Bos ve Tomassen, 2004). Bakterilerde bulunan lipopolisakkaritler antijenik yapılardan sorumlu olup bağışıklık sisteminin gelişmesi üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır ve bu nedenle aşı geliştirme çalışmalarına temel teşkil etmektedir (Fulop ve ark., 1995; Sakai, 1999).

Lipopolisakkarit (LPS) gram negatif bakterilerin hücre duvarının bir komponenti olup, temelde proteinden ibaret olan saflaştırılmış bakteriyel kökenli, bakteri öldüğünde ya da çoğaldığında ortaya çıkmaktadır (Sant'anna ve ark., 2008). LPS'nin gerçek toksik etkisinden Lipid A sorumludur ve lipid A bileşeni birçok enflamatuvar öncü hücreyi aktive etmektedir (Salyers ve Whitt, 1994).



**Resim 1.1.** Lipopolisakkaritin yapısı (URL-1)

Mikroorganizmaların konak canlıdaki en önemli hedef hücreleri endotel hücreler, glial hücreler, makrofajlar, lenfositler ve diğer parankimal hücrelerdir. Mikroorganizmanın değişik antijenik yapılarına veya toksinlerine bu hücreler enflamatuvar yanıt oluştururlar. Endotoksin molekülü hücre membranında kaldığı sürece biyolojik olarak inaktiftir, ancak hızlı hücre bölünmesi ve hücre yıkımı sırasında salınır ki LPS'yi bağlayan protein LBP ile birleşince monosit ve makrofajlara cd14 reseptörü vasıtasıyla entegre olur (Ortatatlı ve ark., 1999). Akaylı ve ark. (2015), Türkiye'de birçok farklı bölgede gökkuşağı alabalıklarından izole ettikleri patojenik gram negatif bakterilerin LPS profillerini belirlemek amacıyla *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas hydrophila*, *A. schubertii*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Yersinia ruckeri* izolatlarını kullanmışlar ve LPS numuneleri elde etmişlerdir. Selveraj ve ark. (2002) tarafından yapılan *in vivo* bir çalışmada, virulan *A. hydrophila*'dan ekstrakte edilen LPS ile enfekte edilen *Cyprinus carpio* üzerinde B-glukan uygulamasının canlılık ve immün modülasyonlar üzerine etkileri incelenmiştir. LPS ile etkin bir enfeksiyon oluşturulmuş ve B-glukan ile balıklarda yaşam yüzdesinin arttığı gözlemlenmiştir. Küçükgül ve ark. (2019) tarafından yapılan *in vivo* çalışmada LPS ile enfekte gökkuşağı alabalıkları üzerinde karvakrol içerikli yemlerin etkileri inflamasyon ve apoptotik parametreler üzerinde araştırılmış ve sublethal dozda LPS enfeksiyonun etkili olduğu saptanmıştır. *Sparus aurata*'nın metabolik homeostazisinin inflammatuar yanıtlar ile nasıl etkilendiğini inceleyen bir diğer çalışmada (Antonopoulo ve ark., 2017), LPS'nin *in vivo* uygulamasıyla balıklarda bakteriyel bir enfeksiyon oluşturulmuş ve kandaki

metabolik parametreler ölçülmüştür, aynı zamanda metabolik olarak balıkların ilgili dokularında mRNA transkripsiyon seviyeleri incelenmiştir. LPS kaynaklı enflamatuar yanıtların, trigliserit plazma seviyelerinin modülasyonuna neden olduğu bildirilmiş ve mRNA ekspresyon seviyelerinde ise azalmalar kaydedilmiştir.

İnflamasyon, hücrelerde büyüme, iyileşme ve yaralanmalara karşı birçok hücre tarafından üretilen sitokinler, polipeptid yapıda olup bağışıklık ve inflamatuvar cevabın oluşmasını ve düzenlenmesini sağlarlar (Nororiha ve ark., 1995). Doğal immüniteye aracılık eden sitokinler; tip I interferonlar (IFN), tümör nekrozis faktör (TNF), interlökin-1 (IL-1) ve IL-6 ve kemokinlerdir (Nororiha ve ark., 1995; Sen ve Lengyel, 1992).

Balıklar, memelilere benzeyen bir sitokin repertuarına sahiptir. Bugüne kadar birkaç sitokin homoloğu ve baskılayıcı balık türlerinde klonlanmıştır (Secombes ve ark., 2011; Wang ve ark., 2011; Whyte, 2007). Balıklarda bildirilen bazı sitokinler TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 ve IFN'dir.

TNF- $\alpha$  (tümör nekroz faktörü alfa), hücre çoğalması, farklılaşma, nekroz, apoptoz ve diğer sitokinlerin uyarılması dâhil olmak üzere çeşitli konak yanıtlarında önemli bir rol oynayan pro-enflamatuar bir sitokindir (Rahman ve McFadden, 2006). Aynı zamanda apoptozu indüklemek, enfekte olmuş hücreleri öldürmek, hücre içi patojen replikasyonunu inhibe etmek ve çeşitli konakçı yanıt genlerini yukarı doğru düzenlemek dahil olmak üzere güçlü anti-mikrobiyal tepkilere aracılık etmektedir (Benedict ve ark., 2003). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki TNF- $\alpha$  gökkuşağı alabalığı (Laing ve ark., 2001; Zou ve ark., 2002), sazan (Saeij ve ark., 2003) yayın balığı (Zou ve ark., 2003), tilapia (Praveen ve ark., 2006) gibi çeşitli kemikli balıklarda karakterize edilip tanımlanmıştır.

IL-1 $\beta$ , en erken eksprese edilen pro-enflamatuar sitokinlerden biri olup inflamasyonik bir olguda indüklenip enfeksiyona erken aşamalarda yanıt vermesi açısından önemlidir. IL-1 $\beta$ 'nin efektör rollerinin çoğuna, diğer sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyonunun yukarı veya aşağı düzenlenmesi yoluyla aracılık edilir. IL-1 $\beta$ , balıklarda karakterize edilen ilk interlökindir ve o zamandan beri gökkuşağı alabalığı (Zou ve ark., 1999), sazan (Fujiki ve ark., 2000), levrek (Scapigliati ve ark., 2001) ve tilapia (Lee ve ark., 2006) gibi bir dizi balık türünde tanımlanmıştır. Scapigliati ve ark. (2001) ve Zou ve ark. (1999) tarafından yapılan çalışmalarda LPS veya poli I:C gibi çeşitli stimüle edici faktörlere verilen yanıtta IL-1 $\beta$ 'nin regüle edildiği raporlanmıştır. Bir diğer çalışmada, balıkların LPS uyarımı yâda bakteriyel enfeksiyonu (*Vibrio anguillarum* ve *Aeromonas*

*hydrophila*) sonucu IL-1 $\beta$  gen ekspresyon seviyelerinde önemli artışlar bildirilmiştir (Lopez-Castejon ve ark., 2007; Yang ve ark., 2013). IL-1R2 ekspresyonunun, solungaç hastalığından etkilenen balıklarda değişmediği veya parazitik enfeksiyonlu (*Ichthyophthirius multifiliis*) balıklarda aşağı regüle edildiği ise bir diğer çalışma bulgusudur (Lopez-Castejon ve ark., 2007; Sigh ve ark., 2004). Birçok balık türünde IL-1 $\beta$ 'nin biyolojik aktivitesi değerlendirilmiş, bağışıklık ile ilgili genlerin düzenlenmesi, lenfosit aktivasyonu, lökositlerin göçü, fagositoz ve bakteri inhibisyonu gibi birçok fonksiyon çalışılmıştır (Lu ve ark., 2008; Buonocore ve ark., 2005).

Proinflamatuvar süreçle ilgili önemli sitokinlerden biri IL-8'dir. Makrofajlar da dâhil olmak üzere birçok hücre tipi, çeşitli uyarılara (LPS, sitokinler ve virüsler) cevap olarak IL-8 üretir (Hebert ve ark., 1991). IL-8, pisi balığı (Lee ve ark., 2001), alabalık (Laing ve ark., 2002; Sangrador-Vegas ve ark., 2002), yayın balığı (Chen ve ark., 2005) gibi birçok balıkta tanımlanmıştır. *In vitro* bir çalışmada, gökkuşağı alabalığı makrofaj hücre hattı (RTS-11), LPS ile stimüle edilmiş ve IL-8 ekspresyon düzeyinin up regülasyonu ile sonuçlandığı vurgulanmıştır (Laing ve ark., 2002).

Bakteriyel enfeksiyonu takiben uyarılan sitokin salınımı boyunca önemli olan bir diğer pro-inflamatuvar sitokin IL-6'dır. Bu sitokin, T lenfositleri, makrofajları, fibroblastları, nöronları, endotel ve glial hücreleri içeren çeşitli hücre grupları tarafından üretilir ve inflamasyonda immünoglobulin üretimi, lenfosit ve monosit farklılaşması, kemokin salgılanması ve lökositlerin salınımına öncülük etmektedir (Hirano, 1998; Kaplanski ve ark., 2003). Makrofajlarda alabalık IL-6 ekspresyonunun LPS tarafından indüklendiği rapor edilmiştir. IL-6, inflamasyon süresinde gen ekspresyon düzeyini önemli ölçüde aşağı düzenleyebilir ki konakçı hasarını elemine etmek için IL-6 potansiyel rolünü bu şekilde gösterdiği bildirilmiştir (Costa ve ark., 2011; Gómez ve ark., 2005).

Balık sitokinlerine az sayıda antikor bulunduğu için, birkaç istisna dışında (örneğin, IFN ve TNF- $\alpha$ ) protein ekspresyonu hakkında neredeyse hiçbir veri yoktur (Zou ve Secombes, 2016). Bu nedenle balık sitokinleri üzerine yapılan fonksiyonel çalışmaların çoğu, öncelikle prokaryotik kullanılarak üretilen sitokin rekombinant proteinlerinin biyo-aktivitelerini araştırmıştır. Bu araştırmalar hücre hattı kullanılarak tasarlanmış ve sitokinlerin gen ekspresyon seviyelerindeki değişimleri araştırılmıştır.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde uzun zamandır tedavi odaklı kullanılan antibiyotikler, mikroorganizmaların zaman içerisinde güç kazanması, kalıntı oluşturmasıyla yerini tıbbi

ve aromatik bitkilere bırakmış olup, pazar hacmi tüm dünyada hızlı bir artış göstermiştir (Özgüven ve ark., 2005). Aromatik bitkiler uzun yıllardır hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır. Son zamanlara kadar modern hayvan beslemede, aromatik bitkilerin büyüme uyarıcı ve antimikrobiyal olarak kullanımı pek dikkate alınmamıştır. Fakat büyümeyi uyarıcı antibiyotiklerin yasaklanmasından dolayı, günümüzde bitkisel ekstraktlar antibiyotiklere alternatif yem katkısı ve büyüme uyarıcı olarak önem kazanmaya başlamıştır. Coğrafi konum itibariyle tıbbi ve aromatik bitki ticaretinde öncü olan Türkiye, ülke florasında zengin bir çeşitliliğe sahiptir. Bu tıbbi ve aromatik bitkiler antiseptik, antioksidan, sindirim uyarıcı, antimikrobiyal ve enzimatik etkiler göstermektedir (Yıldız ve Şener, 2003). Bitkisel ekstraktların faydalarını belirlemek ve gelecek için geçerli bir alternatif olabilmesi için çalışılmaktadır (Kamel, 2000). Antibiyotiklere alternatif olarak düşünülen doğal bitkiler ve ürünleri (ekstrakt ve esansiyel yağ) uzun yıllardır kullanılmakta olup aynı zamanda biyolojik etkinlikleri nedeniyle tıbbi amaçlarla yararlanılmaktadır (Küçükgül, 2018; Küçükgül ve Küçükgül, 2017). Bitkilerin yapısında yer alan alkaloidler, morfin, atropin ve kodein gibi modern ilaçların üretiminde, acımsı veya aromatik bitkiler, sedatif 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 (Anonim, 2006).

Yeryüzünde geniş yayılım gösteren *Inula* cinsinin birçok türü uzun yıllardan beri geleneksel halk ilacı olarak kullanılmaktadır. Asteraceae familyasında yer alan *Inula* cinsi içerdiği yaklaşık 100 tür ile Asya, Afrika, Avrupa ve ağırlıklı olarak Akdeniz Bölgesinde dağılım göstermektedir. *Inula* türleri genellikle çok yıllık bitkiler olup bazen tek yıllık bireylere de rastlanmaktadır. Türkiye’de 7’si endemik 27 tür bulunmaktadır (Zhao ve ark., 2006, TÜBİTAK Türkiye Taksonomik Tür Veritabanı). Fas’ın güneydoğu bölgesinde, “Trehla” olarak bilinen *I. viscosa* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan dekoksilyonun diyabet, hipertansiyon ve böbrek hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı; Akdeniz bölgesinde ise antiinflamatuar, antipiretik, antiflojistik ve antiseptik özelliklerinden dolayı halk ilacı olarak kullanıldığı bilinmektedir. İspanya’da halk arasında gastroduedonal bozuklukların tedavisinde, İsrail’de *I. viscosa* yapraklarından hazırlanan çay halk ilacı olarak diyabet tedavisinde kullanılmaktadır (Yaniv ve ark., 1987, Zeggwagh ve ark., 2006).

Türkiye’de halk arasında Andızotu kökü olarak bilinen *I. helenium* L. türünün kurutulmuş köklerinin, safra söktürücü, idrar arttırıcı, öksürük kesici, göğüs yumuşatıcı, kuvvet verici ve kurt düşürücü etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Kaya andızı olarak bilinen *I. heterolepis* Boiss. bitkisinin yapraklı dalları infüzyon halinde iştah açıcı olarak ve hemoroide karşı, toprak üstü kısımlarından hazırlanan dekoksasyon ise soğuk algınlığı, bronşit ve mide rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Yapışkan andız olarak bilinen *I. viscosa* (L.) Aiton bitkisinin taze yaprakları ise yara üzerine konularak, yara iyileştirici amaçla kullanılmaktadır (Honda ve ark., 1996, Baytop, 1999).



**Resim 1.2.** *Inula viscosa* L. (URL-2)

*Inula* türleri kimyasal içerik bakımından incelendiğinde; terpenik bileşikler (monoterpenler, seskiterpenler, diterpenler, triterpenler), flavonoidler, glukolipitler ve antranilik asit türevi bileşikler içermektedir (Tablo 1.1). Özellikle seskiterpen yapıda bileşikler (ödesmanlar, makrofilik asitler, elemanlar, germakranlar ve guayanlar) türlerde bulunan en önemli bileşik grubu olarak göze çarpmaktadır (Zhao ve ark., 2006). Biyolojik aktivite açısından değerlendirildiğinde ise antibakteriyel, antiproliferatif, hepatoprotektif, antioksidan, antidiyabetik, antitumoral, antiinflamatuvar vb. etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu etkiler arasında özellikle seskiterpen bileşiklerin varlığı nedeniyle antiproliferatif ve sitotoksik etkinin en belirgin aktiviteler olarak yer aldığı görülmektedir (Konishi ve ark., 2002, Stojakowska ve ark., 2005, Zhao ve ark., 2006, Danino ve ark., 2009, Lee ve ark., 2010).

**Tablo 1.1** *Inula viscosa* (L.) yapraklarının su distilasyonu (hidrodistilasyon-HD) ve buhar distilasyonu (SD) ile esansiyel yağ kompozisyonu (Haoui ve ark., 2015)

N°	RT	RI	Komponent Adı	Relative içerik (%)	
				HD	SD
1	18.676	1161	Menthol	0.22	–
2	26.697	1510	Butyl hydroxy tolüene	4.11	2.63
3	27.355	1544	1,6,10-Dodecatrien-3-ol,3,7,11-trimethyl	0.63	–
4	27.936	1574	Caryophyllene oxide	0.17	–
5	28.336	1594	Fokienol	3.37	1.89
6	28.600	1607	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	1.79	–
7	28.765	1615	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0.14	–
8	28.824	1618	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	1.14	–
9	28.941	1624	Cubenol	–	0.29
10	29.305	1642	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	0.77	–
11	29.599	1656	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	0.32	–
12	29.828	1667	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	0.52	–
13	30.046	1678	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	0.89	–
14	30.298	1690	Isobutyrate de 3-méthoxycuminyll	0.71	–
15	30.386	1694	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	0.33	–
16	30.610	1708	3,7,11-Trimethyl dodeca-1,6,10 triène,3,9-diol	0.85	–
17	31.268	1759	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	0.85	–
18	32.466	1840	Phytone	0.31	–
19	32.713	1855	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	4.65	8.11
20	32.905	1861	Pentadecanoic acid	1.85	–
21	33.742	1922	12-Carboxyeudesma-3,11 (13) diene	28.88	56.81
22	33.847	1930	2,3-Didehydrocistic acid	–	3.25
23	34.770	1998	<i>n</i> -Hexadecanoic acid	5.38	1.91
24	37.155	2126	Phytol	2.96	0.28
25	37.452	2145	9,12-Octadecadienoic acid	2.03	–
26	37.555	2154	Linolenic acid	7.80	0.74
27	37.849	2174	Octadecanoic acid	–	0.75
28	39.799	2296	Tricosane	1.50	0.80
29	41.180	2395	Tetracosane	0.80	0.78

N°	RT	RI	Komponent Adı	Relative içerik (%)	
				HD	SD
30	42.554	2482	Eicosanol	2.46	–
31	42.767	2497	Pentacosane	5.43	2.31
32	44.700	2601	Hexacosane	0.89	1.02
33	47.156	2705	Heptacosane	4.82	2.09
			Sesquiterpenes hydrocarbons	1.23	–
			Oxygenated sesquiterpenes	46.7	72.98
			Fatty acids	17.06	3.4
			Alkanes	13.44	7
			Alcohols	6.9	0.28
			Others	1.24	–
			<u>Total</u>	<u>86.57</u>	<u>83.66</u>

Balıkların hastalık etmenleriyle (infeksiyöz ve non-infeksiyöz) karşılaşmasında, doğal bağışıklık sistemi elemanlarından makrofajlar, monositler, granüositler ve lizozim gibi humoral elementler ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Bu elementlerin aktif hale gelmesi ve hastalıklarla mücadelede immünstümlenlerin kullanımı birçok bilim insanının bu konu üzerinde odaklanmasına neden olmuştur. Bu nedenle güçlü ve yan etkisi neredeyse yok denecek kadar az olan bitkiler ve onların yan ürünleri kullanılmaya başlanmıştır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde antimikrobiyal ve antiinflamatuvar aktivite, gelişmeyi stimüle etme, ayrıca yetiştiriciliğin yoğun yapıldığı işletmelerde olası stres durumlarını ortadan kaldırma gibi durumlarda bitkisel ilaçların kullanımına ağırlık verilmektedir. Yapılan bir çalışmada (Baba, 2017), bitki ekstraktları ya da onların ürünlerinin çeşitli konsantrasyonlarda oral ya da enjeksiyon yolu ile uygulanmasının farklı tatlı su ve deniz balıklarında bakteriyel, viral ve parazitik hastalıklara karşı doğuştan ve adaptif immün cevabı arttırdığını bildirmiştir. Tilapialar üzerinde *Ocinum sanctum* ekstraktını deneyen araştırmacılar nötrofil aktivitesinde artışlar belirlemiştir (Logambal ve ark., 2000). Peddie ve Secombes (2003) ise Cheimmun adı verilen bir bitkisel karışımı (*Echinacea angustifolia*, *Eupatorium perfoliatum*, *Baptisia tinctoria*) intraperitoneal olarak alabalıklara enjekte etmiş ve fagositozun arttığını saptamışlardır.

Yapılan çalışmalar göstermektedir ki bitkisel ürünler diğer tüm canlılarda olduğu gibi balıkların bağışıklık mekanizmasında da etkin rollere sahiptir. Ayrıca, immün sistemin

savunma elamanlarını aktive etmesiyle antibakteriyel antioksidan, antitümoral, antidiyabetik, spazm giderici daha birçok aktivitede önemli görevler üstlenen bitkisel ürünler son yıllarda önemle üzerinde durulan konuların başında gelmektedir. Özellikle çalışmamızın ana materyalini oluşturan *Inula viscosa* son yıllarda balık yetiştiricilik çalışmalarında da kullanılmaya başlanmıştır (Gökbulut ve ark., 2013; Sırakov ve ark., 2018). *Inula* spp. dahil üç tür ile yapılan bir çalışmada antibakteriyel aktivite değerlendirilmiş ve bu amaç için *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* ve *Candida tropicalis* bakterileri çalışılmış, ve tüm türlerin bahsi geçen bakteriler üzerinde antioksidan ve antibakteriyel aktiviteler sergilediği bildirilmiştir (Gökbulut ve ark., 2013). Balık patojeni olan *A. salmonicida*'ya karşı *Glycyrrhiza glabra*, *Rhodiola rosea*, *Althaea officinalis*, *Sambucus nigra*, *Inula helenium*, *Pinus sylvestris*, *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* bitkisel ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri çalışmış, en yüksek aktiviteyi *Salvia officinalis* türünün gösterdiği raporlanmıştır (Sırakov ve ark., 2018).

*Inula* cinsinin dünyada yaygın olmasının yanısıra, birçok türü geleneksel halk ilacı olarak kullanılmaktadır. *I. viscosa*'nın yaprak ve esansiyel yağları farmakolojik olarak seskiterpen, seskiiterpen asitleri, flavonoidler gibi bazı aktif bileşenler içermektedir ki bunlar antiinflamatuvar, antibakteriyel, antidiyabetik, antitümoral etkilere sahiptir. Kültür balıkçılığında bakteriyel kaynaklı hastalıklar ağır harabiyetler ve beraberinde yüksek mortalitelerle kendini göstermektedir. Uzun yıllardır bu hastalıkların tedavisinde kullanılan kimyasal kökenli ilaçlar avantajlarından ziyade dezavantajları ile yetiştiriciler için sorun olmaktadır. Bu bağlamda son çalışmalar yan etkilerinin çok daha az olması hasebiyle bitkisel kaynaklı yöntemlere odaklanmıştır. Balık hastalıklarında immün sisteminin savunma elamanlarını aktif hale getiren bitkisel tedavi, bitkinin çeşitli kısımlarının yâda ekstrakt ve esansiyel yağ kullanımlarıyla sağlanmaktadır. Su ürünleri sektöründe bu konudaki çalışmaların istenen düzeyde olmaması, balık hastalıklarına karşı spesifik ilaçların bulunmaması, ayrıca bulunsu dahi maliyetlerinin yüksek olması ve birçok handikapının bulunması bitkisel ürünlerin bu sektör için yeni tedavi yöntemleri olarak önem arz etmektedir.

Bu çalışmada, ticari olarak temin edilmiş gökkuşağı alabalık gonad hücre hattı (RTG-2) LPS ile enfekte edilerek enfeksiyon modeli oluşturulmuştur. Tedavi edici özelliği daha evvel literatür çalışmalarıyla desteklenmiş *I. viscosa*'nın (yapışkan andız otu)'nın

antiproliferatif ve antiinflamatuvar etkileri IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IL-8 ve IL-6 gen ekspresyon seviyelerindeki değişimlerinin tespiti ile çalışılmıştır.



## **2. MATERYAL VE METOT**

### **2.1. Materyal**

#### **2.1.1. LPS (*Escherichia coli*, serotip O26:B6)**

Çalışmamızda, deneysel enfeksiyonu oluşturmak için lipopolisakkarit (LPS) kullanıldı. Ticari olarak temin edilen LPS (*Escherichia coli*, serotip O26:B6) (Sigma-Aldrich, St, Louis, CO) konsantrasyonun belirlenmesinde doz tespit çalışmaları yapıldı (Pelegri ve ark., 2003). Ön denemeler sonunda deneysel LPS konsantrasyonu 20 µM/ml (sub-lethal doz) olarak belirlendi.

#### **2.1.2. *Inula viscosa* (L.)**

*I. viscosa* ülkemizde birçok alanda (çorak, kurak alanlar, yol kenarındaki yamaçlık, taşlık alanlar vb.) kendiliğinden yetişebilen sarı çiçekli, çok yıllık yarı çalimsı bitkilerdir. Reçinemsi yapısından dolayı halk arasında yapışkan andız otu olarak bilinmektedir. Deneysel çalışma için *I. viscosa* Hatay Bölgesi'nden toplandı ve laboratuvara getirilerek nem oranı düşük, güneş görmeyen ve ısı değişiminin çok düşük olduğu bir ortamda 1 hafta süreyle kurutulması sağlandı. Esansiyel yağ ekstraksiyonları 19 Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki koruma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

#### **2.1.3. Hücre Kültürü**

Araştırmada gökkuşuğu alabalığı gonad hücresi RTG-2 (ATCC® CCL-55™) hattı kullanıldı. Hücreler, polietilenimin (sodyum borat buffer içerisinde 0.2 mg/ml, pH 8.3) ile kaplı 25 cm<sup>2</sup> lik flasklarda ve içeriğinde %10 oranında ısı ile inaktif edilmiş fetal sığır serumu (FBS) ve penisilin/ streptomisin/amfoterisin B karışımı bulunduran Lebovitz L-15 besi ortamında, 23 °C, %0 CO<sub>2</sub> ve %100 hava bulunduran steril inkübatörde üretildi. Hücreler besi kabına %75-80 oranında üremeleri sonucu tripsin ile (%0,025 Tripsin/EDTA) muamele edilerek kaldırıldı ve 1:5 oranında diğer besi kaplarına ayrılarak deney grupları oluşturuldu.

#### 2.1.4. Deneysel Çalışma

Araştırmadaki deney grupları Tablo 2.1.'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.1.** Araştırma grupları

Araştırma grupları	Tekerrür
<b>Grup 1:</b> Kontrol grubu (K)	3
<b>Grup 2:</b> LPS eklenen grup (LPS)	3
<b>Grup 3:</b> <i>I. viscosa</i> eklenen grup (IV)	3
<b>Grup 4:</b> LPS ile enfekte RTG-2 hücrelerine <i>I. viscosa</i> eklenen grup (LPS+IV)	3

#### 2.2. Metot

##### 2.2.1. *Inula viscosa* Uçucu Yağının Eldesi

*I. viscosa* esansiyel uçucu yağı su destilasyonu (hidrodestilasyon) yöntemi kullanılarak temin edildi. Laboratuvar ortamında kurutulan *I. viscosa*'nın yaprak ve çiçekleri bir "Clevenger" cihazı vasıtasıyla küçük parçacıklara ayrıldı. Sabit basınç altında kaynatılan bir sıvıya parçacıklar atılarak üzerinde oluşan buharın soğutucudan geçirilerek yoğunlaştırılması sağlandı ve elde edilen ekstrakt damıtma haznesinde toplandı. Daha sonra ayrı steril 15 ml falkon tüpüne alınan örnekler çalışma sürecine kadar tüp ağzları paraffin şeritler ile kaplanarak +4°C buzdolabı soğukluğunda saklandı (Resim 2.1.).



**Resim 2.1.** *I. viscosa* esansiyel yağ ekstraktı

### **2.2.2. Hücre Canlılığı (MTT Metodu)**

Araştırmada bir hücre popülasyonundaki canlı hücre oranının tespiti için Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT-Fluka, USA) maddesi kullanılarak tespit edilebilir. Araştırmada Papachristou ve ark. (2013) tarafından geliştirilen protokol takip edilerek viabilite testleri uygulandı. İlk önce etkin ve hücreler için toksik dozun tespiti için, değişik dozlarda LPS (1, 5, 10 ve 20  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) ve *I. viscosa* (IV) (1, 5, 10 ve 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) gonad hücre kuyucuklarına eklendi ve 24 saat inkübatör şartlarında bekletildi (24 kuyucuklu hücre kabı,  $4 \times 10^4$  hücre/kuyucuk). Süre sonunda, yapışan hücreler üzerlerindeki besiyeri kaldırıldı. Sonrasında ise hücrelere, 20  $\mu\text{L}$  MTT (5 mg/ml fosfat tampon solüsyonunda çözdürüldü) ihtiva eden 200  $\mu\text{L}$  taze komple besi yeri eklendi. Hücreler bu solüsyonla 4 saat 23  $^{\circ}\text{C}$ 'de tutuldu. Oluşan formazan kristalleri 100  $\mu\text{L}$  0.04 M HCL/isopropanol ile 15 dk süreyle 23  $^{\circ}\text{C}$ 'de çözdürüldü. Sonrasında ayrı tüplere aktarılan süpernatantlar  $12 \times 10^3$  rpm ve +4  $^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi. Bir ELISA okuyucuda ( $\mu\text{Quant-SK}$ ) hazırlanan 96'lı mikroyeylet 570 nm ışık dalga boyunda okutuldu. Bu analizle LPS ve IV'nin hücre canlı oranına etkileri ve etkin konsantrasyonları tespit edildi.

### 2.2.3. RNA izolasyonu ve qRT-PCR

Örneklerdeki RNA, temin edilen bir kit ile çalışıldı. Elde edilen RNA'ların saflıkları spektrofotometrik olarak (Shimadzu-UV mini 1240- JAP) (OD260/OD280 nm oranı) tespit edildi. Bu metotla, 1 günlük inkübasyon sonrası 75 cm<sup>2</sup>'lik deneme kültür kapları tabanına yapışan 1,5x10<sup>6</sup>/ml hücreler, 1 mililitre RiboEx reaktif solüsyonuna (GeneAll-SK) maruz bırakılarak, oda ısısında 5 dakika bekletildi. Sonra 40°C' de 12000g 10 dakika santrifüj edildi. Süre sonunda hücre sıvılarının üst kısımları temiz tüplere alındı. Üzerlerine 0,2 ml kloroform konularak örnekler 2 dakika süresince oda ısısında bırakıldı. Devamında örnekler 12000g rotor hızında santrifüj gerçekleştirildi (40°C, 15 dakika). Elde edilen süpernatant (renksiz) temiz bir tüpe alındı. Üzerlerine 0.5'er ml izopropil alkol ilave edildi ve örnekler 10 dakika oda ısısında bekletildi. Aynı santrifüj işleminden sonra sıvıların üst kısmı atıldı. RNA birikintileri tüplerin dip kısmında pelet halinde görülmekteydi. Peletler 1 mililitre %75 etil alkolle süspanse edilerek 7500 g hızında 5 dakikada tekrar dibe çöktürüldü. Elde edilen RNA örneklerine 20'şer ml "Diethyl pyrocarbonate Water" eklenerek sulandırıldı ve homojenize edildi. Tüm örneklerin RNA saflıkları spektrofotometrede 260/280 oranlamalarıyla 1.7'den yüksek oldukları görüldü. İzolasyon işleminden sonra polimeraz zincir reaksiyonu metoduna geçildi. Bu yöntemle hedeflenen IL-1 $\beta$ , IL-8 ve TNF- $\alpha$  genlerin ekspresyon miktarları araştırıldı. Çalışmada bu yöntem için "iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix" (Bio-Rad, EU) temin edildi.

Deneme reaksiyon tüplerine toplamda 20 mikrolitre (iTaq™ Universal SYBR® GreenSupermix 2x-10  $\mu$ L, Reverse ve forward primerler 1'er  $\mu$ L, 1  $\mu$ g/ml RNA'ya eş total RNA ve 20  $\mu$ L tamamlayan DEPC su) konuldu. Çalışmada araştırılan genlere spesifik primer dizgeleri tablo halinde verilmiştir (Tablo 2.2). Yöntemde PCR siklusları, qRT-PCR thermal cyclusunda (Bio-RAD- CFX96, SK) gerçekleştirildi. Öncelikle cDNA sentezi 95°C'de 30 sn olarak düzenlendi. Siklus basamakları ise; 40 siklüs olacak şekilde 95°C'de 15 sn denatürasyon ve 60°C'de 30 sn yapışma olarak ayarlandı.

**Tablo 2.2.** Hedef gen spesifik primer dizgeleri

<b>Gen</b>	<b>Reverse</b>	<b>Forward</b>
IL-1 $\beta$ (Sentegen, TR)	5 <sup>1</sup> -TTG AGC AGG TCC TTG TCC TTG- 3 <sup>1</sup>	5 <sup>1</sup> -ACA TTG CCA ACC TCA TCG- 3 <sup>1</sup>
IL-8 (Sentegen, TR)	5 <sup>1</sup> -TCT CAG ACT CAT CCC CTC AGT- 3 <sup>1</sup>	5 <sup>1</sup> -AGA ATG TCA GCC AGC CTT GT - 3 <sup>1</sup>
TNF- $\alpha$ (Sentegen, TR)	5 <sup>1</sup> -TGA GGC CTT TCT CTC AGC GAC AGC - 3 <sup>1</sup>	5 <sup>1</sup> -TGG AGG GGT ATG CGA TGA CAC CTG - 3 <sup>1</sup>
$\beta$ -Act (Sentegen, TR)	5 <sup>1</sup> -CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3 <sup>1</sup>	5 <sup>1</sup> -TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A -3 <sup>1</sup>

#### **2.2.4. Lizat Hazırlama ve IL-6 Protein Düzeyi Tespiti**

Öncelikle, hücre flasklarındaki besiyeri atıldı. Fenolik bileşikler ve hücrelere artık metabolitlerin uzaklaştırılması için buz soğukluğundaki PBS ile 2 kez yıkandı. Deneme gruplarındaki her bir flaska 500 mikrolitre içerisinde %1 oranında proteaz inhibitör kokteyli ihtiva eden M-Per solüsyonu (Thermo, EU) eklendi ve bir çalkalayıcıda 5 dakika bekletildi. Devamında lizatlar temiz bir endorf tüpe alınarak 14000 g rotor hızında 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Lizat örnekleri elde edildikten sonra IL-6 düzeyleri, ELISA okuyucuda (BioTec,  $\mu$ quant, SK) temin edilen hazır ELISA ticari kit (Bioassay Technology Laboratory, PRC) yardımıyla gerçekleştirildi. Kit prosedürü olarak ilk önce tüm solüsyonlar kullanılmadan önce oda ısısına getirildi. Tüm standart kuyucuklarına 50  $\mu$ L standartlardan eklendi. Örnek kuyucuklarına ise 40  $\mu$ L örnek ve 10  $\mu$ L anti IL-6 antikör içeren solüsyon ile 50  $\mu$ L streptavidin-HRP solüsyonu eklendi. Tüm kuyucuklar bir jilatin yapışkanlı kâğıt ile kapatıldı. Sonrasında örnekler 60 dakika 37 °C’de inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklar kitteki yıkama solüsyonuyla dikkatli bir şekilde yıkandı. Devamında her kuyucuğa 50  $\mu$ L substrat A ve 50  $\mu$ L substrat B eklendi. Örnek kuyucukları 37 °C’de 10 dakika karanlıkta tutuldu. İnkübasyondan sonra her kuyucuğa 50 mikrolitre stop solüsyonu eklendi. Örnekler ELISA okuyucuda 450 nanometre ışık dalga boyunda

okutularak alınan değerler kayıt edildi. Çalışma sonunda standart eğrisi elde edilerek oluşan formulasyonla net hücre içi IL-6 dzeleri ortaya konuldu.

### **2.2.5. İstatistiksel Analizler**

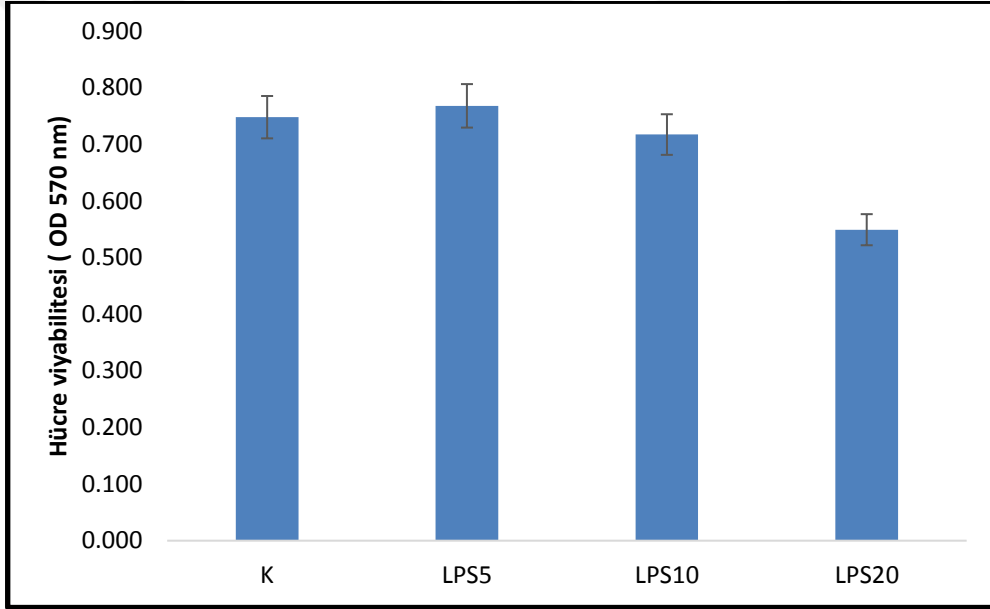
Deneme oklu verileri, SPSS 21.0 programı, Deskriptif, One-way ANOVA analizi yöntemi ile ortaya konuldu. Gruplar arası istatistiksel farkların önem dereceleri Duncan testiyle tespit edildi.  $P \leq 0.05$  ve altındaki veriler istatistiksel önemli sayıldı. Veriler ise Ortalama  $\pm$  Standart Hata (S.E) olarak adlandırıldı.



### 3. BULGULAR

#### 3.1. Hücre Canlılık Testleri

Gökkuşığı alabalığı gonad hücreleri (RTG-2) farklı konsantrasyonlarda LPS ve *I. viscosa* esansiyel yağlarını içeren solüsyon ile hem ayrı ayrı hem de birleştirilerek 1 gün süresince inkübe edildi. LPS uygulananı sonucu belirlenen hücre canlılık düzeylerine dair analiz sonuçları; 3 farklı orandan elde edilen verilerle ve yüzdelik standart hata uygulanarak grafik halinde verildi (Şekil 3.1).



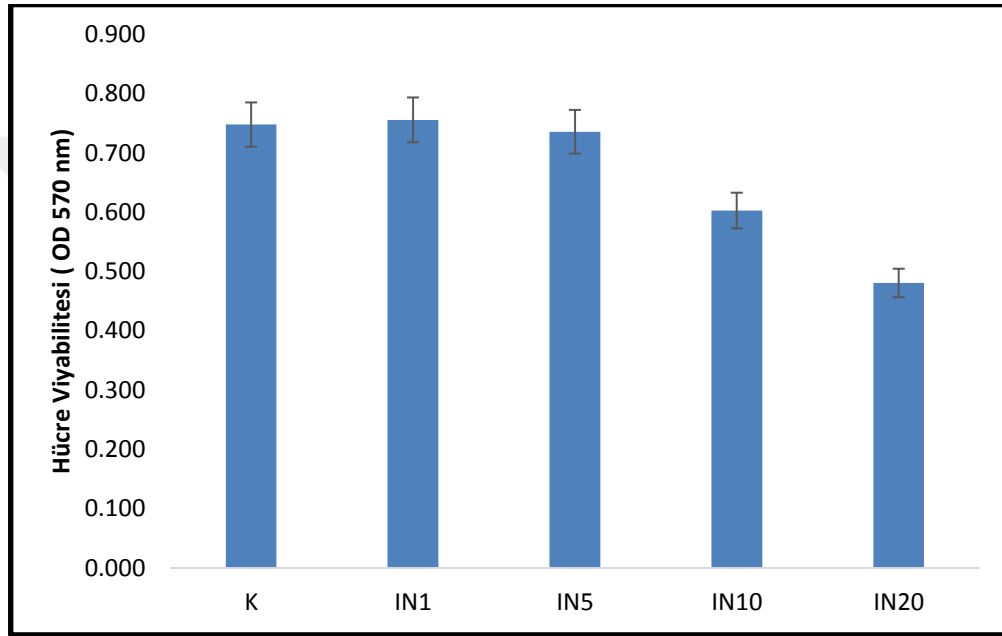
Şekil 3.1. Farklı konsantrasyonla hücelere LPS uygulananı sonucu elde edilen hücre viabilitesi

Araştırmada LPS 5  $\mu\text{M}/\text{ml}$  konsantrasyon uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre %2'lik proliferasyon tespit edildi. LPS'in artan diğer dozlarında (10 ve 20  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) ise hücre canlılıklarında sırasıyla % 4 ve % 27 oranında azalmalar görüldü ve sonraki çalışmalarda inflamasyon oluşturmak için LPS 20  $\mu\text{M}/\text{ml}$  etkin konsantrasyon olarak seçildi.

Çalışmada su destilasyonu yöntemiyle elde edilen *I. viscosa* esansiyel yağı (IN) bulunan solüsyon farklı konsantrasyonda (1, 5, 10 ve 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) hücelere uygulandı. Süre

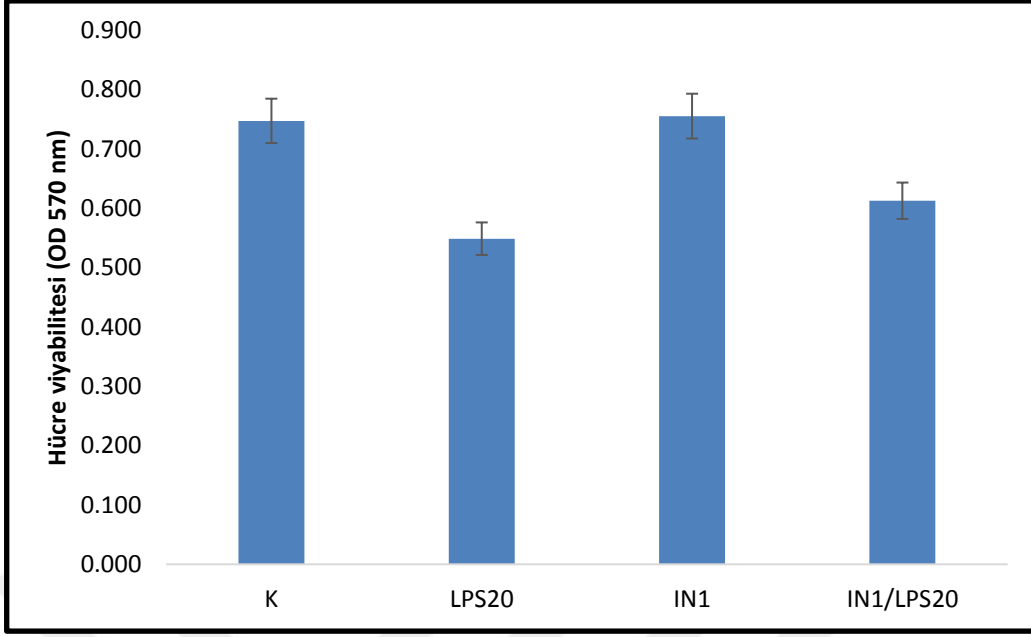
sonunda IN 1µg/ml konsantrasyonda uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre % 1,1'lik hücre proliferasyonu bulundu. Ancak IN'nin artan konsantrasyonla (5, 10 ve 20 µg/ml)

hücre canlılığını sırasıyla % 1.7, % 19 ve % 36 düzeyinde azaltıcı etki gösterdiği tespit edildi (Şekil 3.2). Elde edilen verilere göre IN'nin 1µg/ml konsantrasyonda antisitotoksik etkinliği olabileceği kararına varılarak etkin konsantrasyon olarak seçildi ve çalışma süresince bu doz referans olarak kullanıldı.



Şekil 3.2. Farklı konsantrasyonla hücelere *I. viscosa* uygulanımı sonucu elde edilen hücre viabilitesi (24 saat)

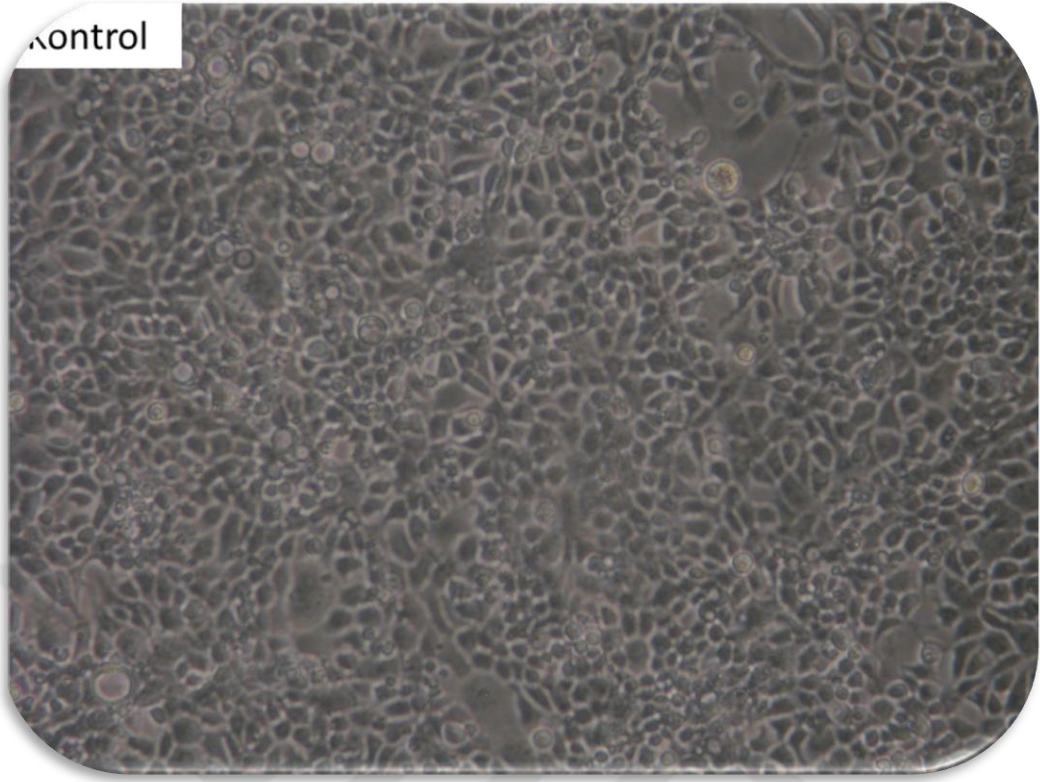
Araştırmada LPS'in inflamatuvar olarak oluşturduğu sitotoksik etkinliğine karşı IN'nin etkinliği araştırıldı. Elde edilen verilere göre hücre canlılığı analizlerinde LPS'in meydana getirdiği hücre kayıplarının IN tarafından % 12 oranında iyileştirdiği tespit edildi (Şekil 3.3).



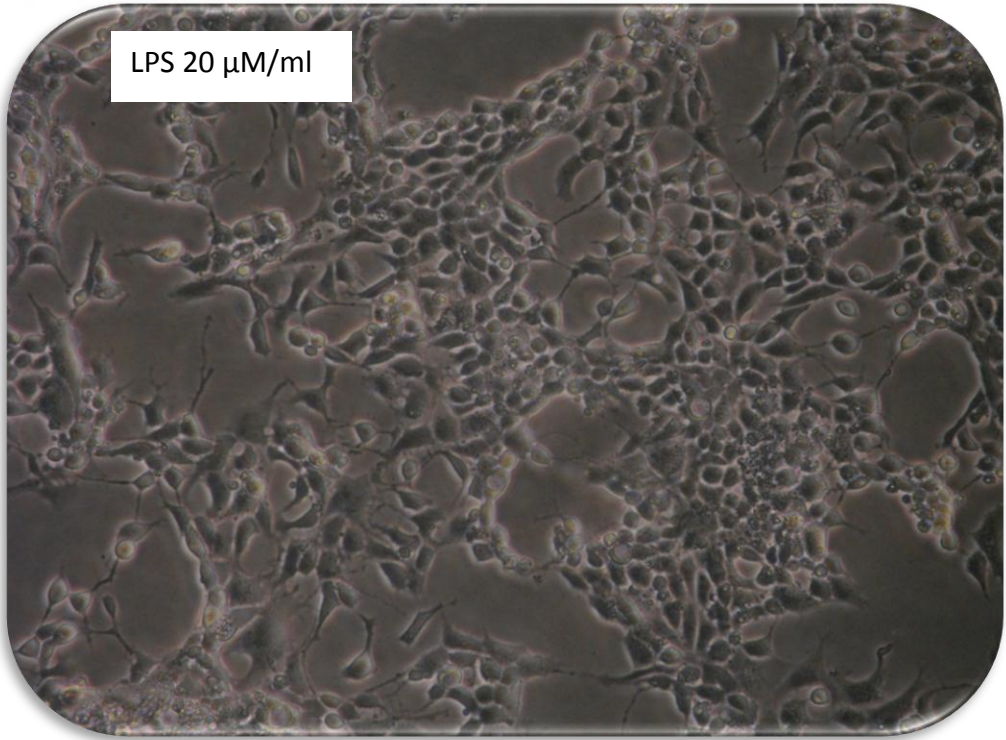
**Şekil 3.3.** Farklı konsantrasyonla hücelere ve LPS 20  $\mu$ M/ml ve IN 1  $\mu$ g/ml uygulanımı sonucu elde edilen hücre viabilitesi

### 3.2. Hücre görüntülemeleri

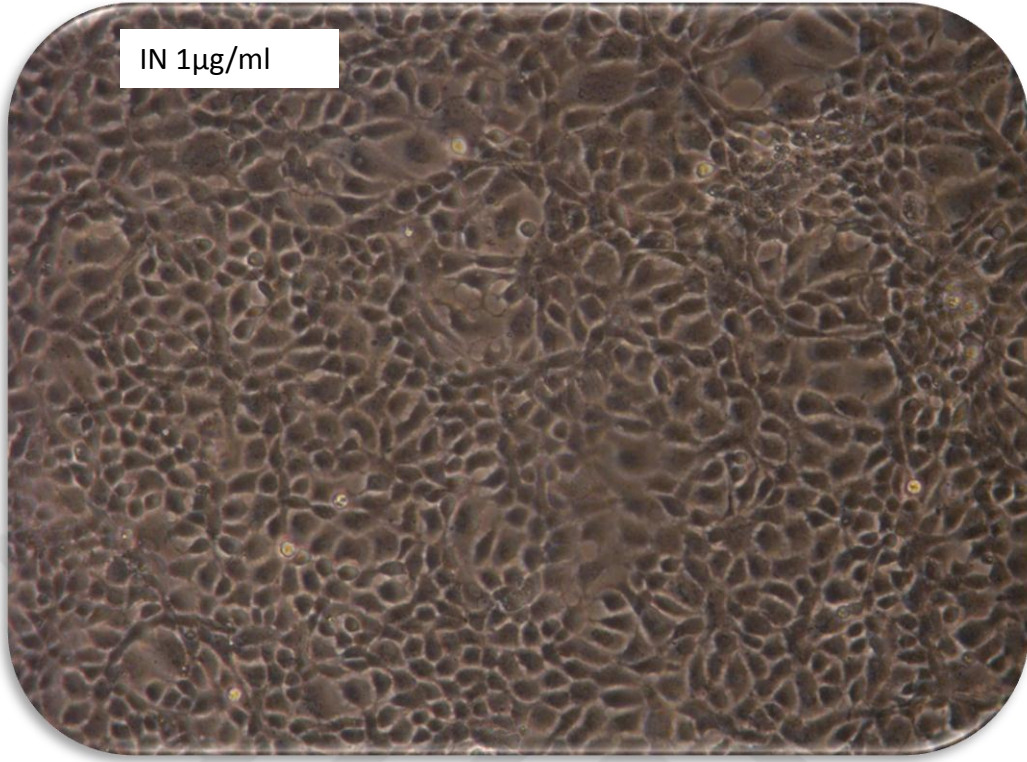
Hücelere 1 gün süre ile LPS ve IN'nın ayrı ayrı veya birlikte maruziyetinden sonra bir invert mikroskopla (Olympus CK40, JP) flasklar tabanındaki hücre yoğunlukları 20x'lik büyütmeyle görüntüledi. Elde edilen bulgularda LPS'in anlamlı derecede hücre kayıplarına neden olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte IN'nın ise tek başına uygulanımında kontrol grubuna göre hücre sayısında değişiklik yapmadığı da görüldü. Yine, LPS ve IN'nın birlikte uygulanımı ile hücre yoğunluklarında IN'nın LPS'in meydana getirdiği kayıpları kayda değer düzeyde önlediği görüldü (Resim 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 ve 3.5).



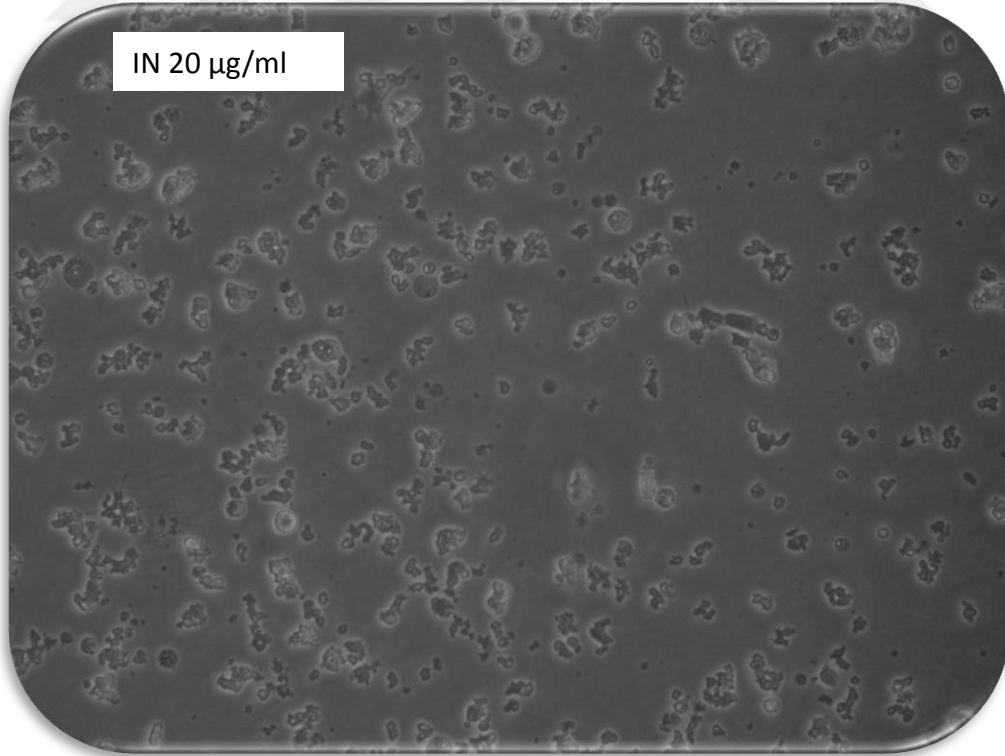
**Resim 3.1.** Kontrol grubu hücre görüntüsü (20 x)



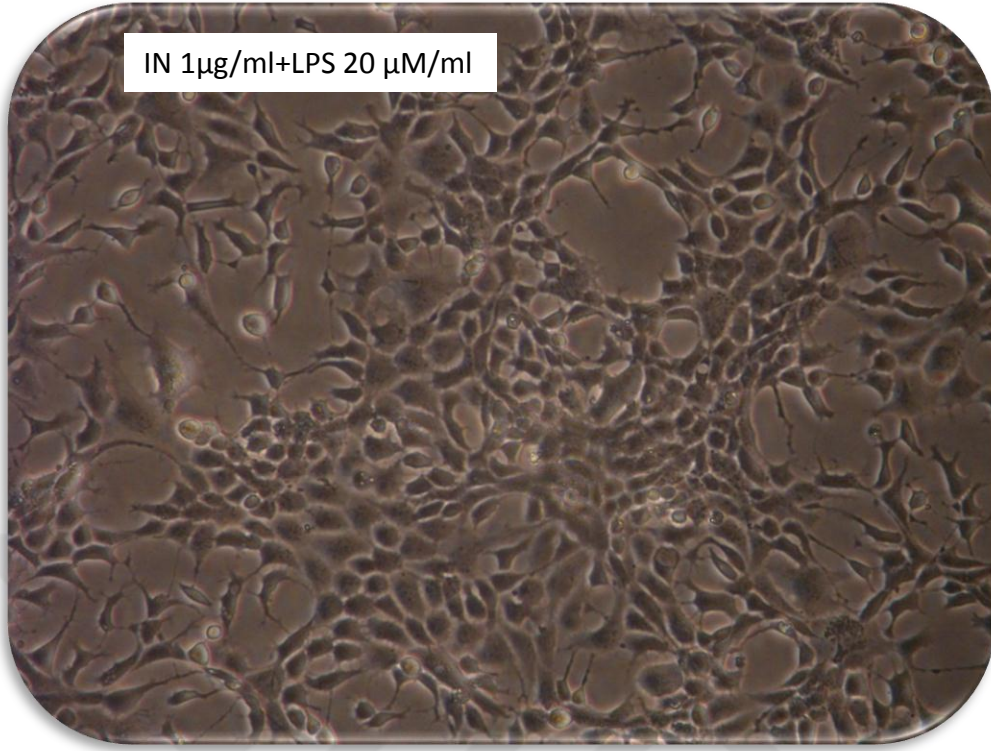
**Resim 3.2.** LPS 20 µM/ml grubu hücre görüntüsü (20 x)



**Resim 3.3.** IN 1µg/ml grubu hücre görüntüsü (20 x)



**Resim 3.4.** IN 20 µg/ml grubu hücre görüntüsü (20 x)

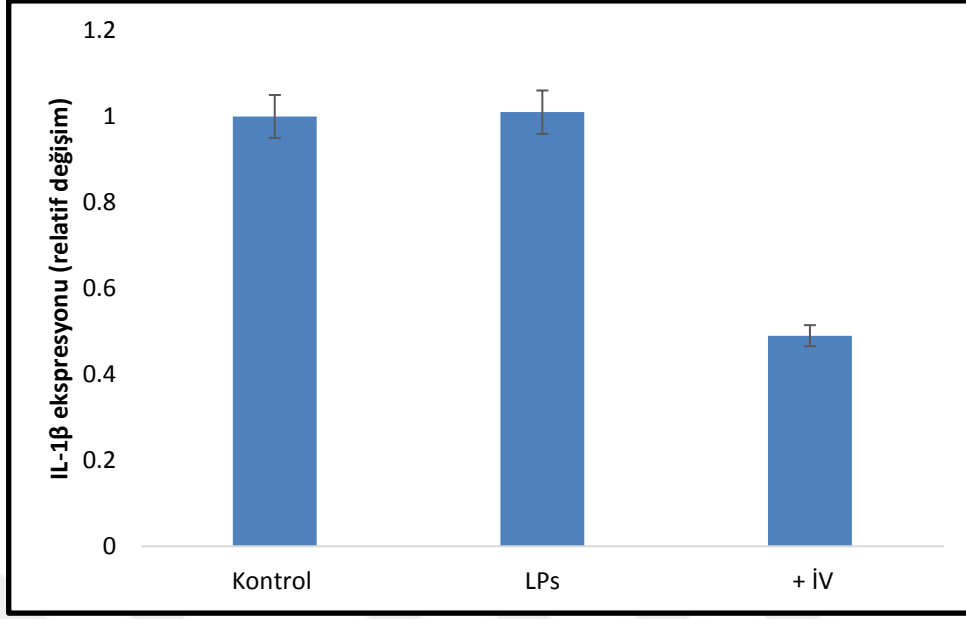


**Resim 3.5.** IN 1µg/ml + LPS 20 µM/ml grubu hücre görüntüsü (20 x)

### **3.3. Gen Ekspresyon Sonuçları**

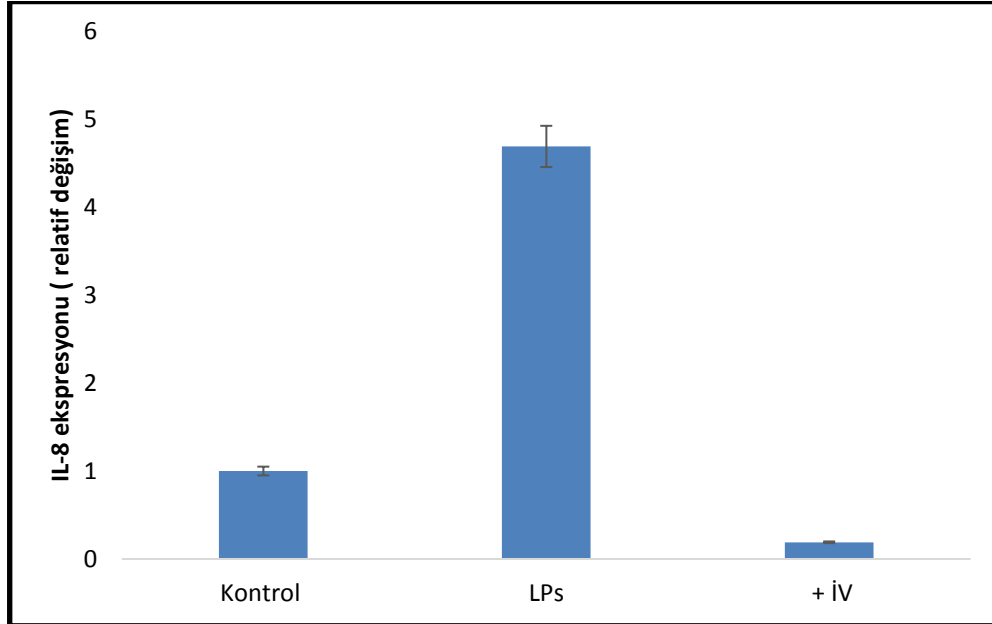
Hücrelere 24 saat süreyle LPS ve *I. viscosa* esansiyel yağı uygulandı. Süre sonunda deneme gruplarından elde edilen RNA örneklerinden “Real time PCR” yöntemiyle IL-1 $\beta$ , IL-8 ve TNF- $\alpha$  gen ekspresyon düzeyleri araştırıldı.

Analiz sonuçları, IL-1 $\beta$  gen ekspresyon düzeyinin, kontrol grubuna göre LPS tarafından önemsiz düzeyde up-regüle edilirken, LPS maruziyeti sonunda İV eklenen grupta ise yaklaşık % 51 oranında down-regüle olduğunu göstermiştir (Şekil 3.4).



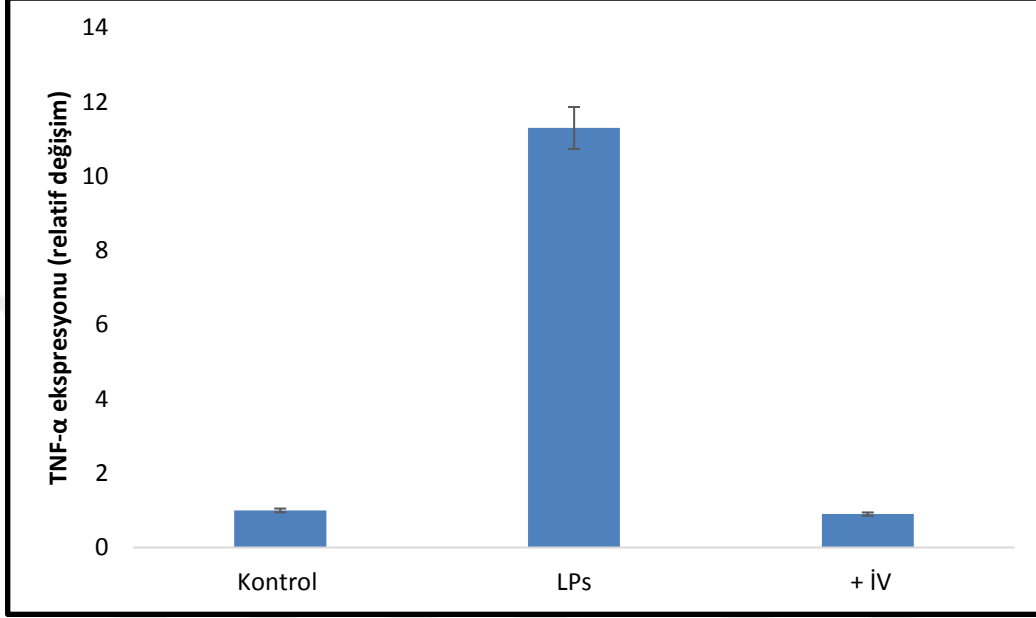
Şekil 3.4. IL-1 $\beta$  ekspresyon düzeyi

Elde edilen verilere göre proinflatuar sitokinlerden IL-8 gen ekspresyon düzeyi, kontrol grubuna göre LPS tarafından 4.69 kat relatif değişimlerle up regüle edilirken, LPS maruziyeti sonunda İV eklenen grupta ise % 96 düzeyinde down-regülasyon tespit edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. IL-8 ekspresyon düzeyi

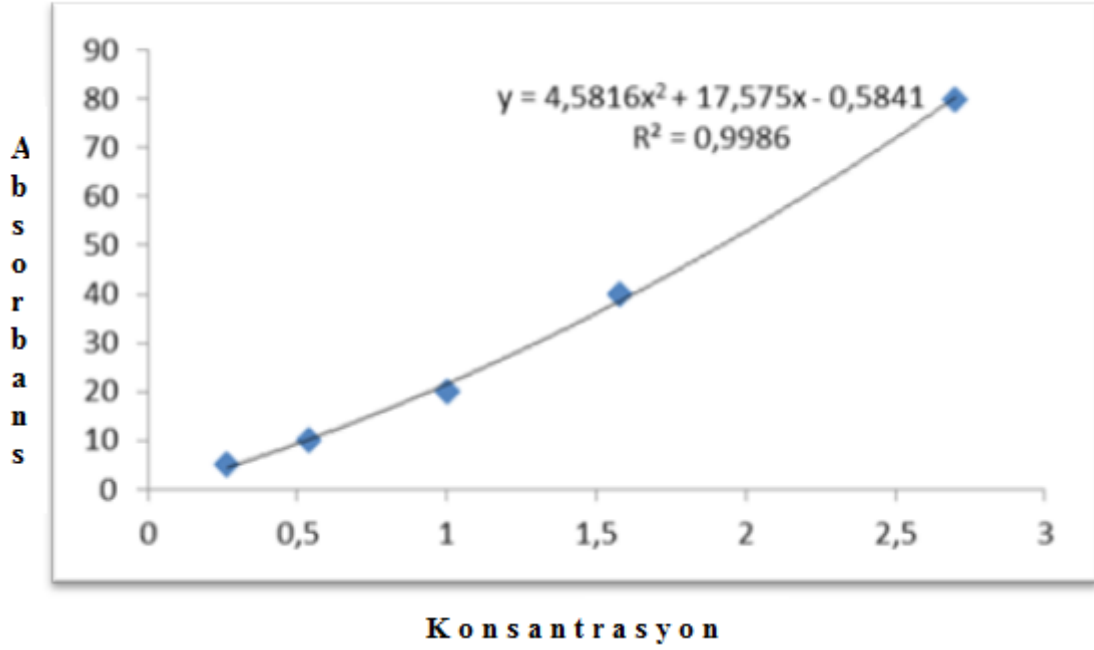
Verilere göre proinflatuar sitokinlerden TNF- $\alpha$  gen ekspresyon düzeyi, kontrol grubuna göre LPS tarafından 11.3 kat relatif değişimlerle up regüle edilirken, LPS + İV eklenen grupta ise yalnızca LPS eklenen gruba göre % 92 oranında down-regülasyon tespit edilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. TNF- $\alpha$  ekspresyon düzeyi

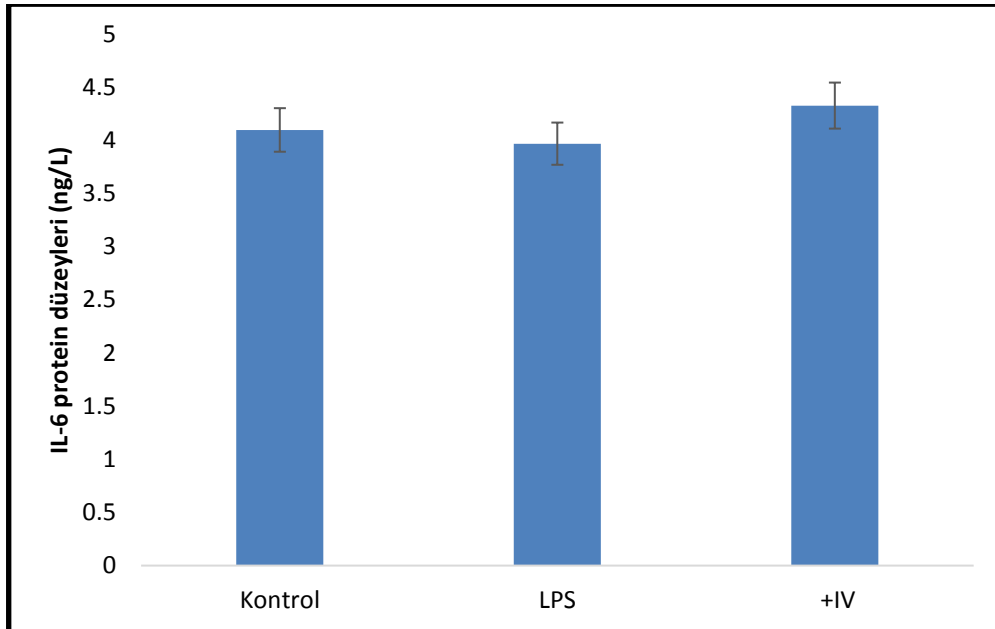
### 3.4. Protein Düzeyi Sonuçları

Hücre içi IL-6 protein düzeyi is hazır ticari kit protokolü uygulanarak ELISA yöntemiyle tespit edildi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Elde edilen standart eğrisi ve standart formülasyonu

Analiz sonuçları, hücre içi IL-6 protein düzeyinde, kontrol grubuna göre LPS tarafından % 4 oranında azalma, LPS maruziyeti sonunda İV eklenen grupta ise yaklaşık %9 oranında artma olduğunu göstermiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. IL-6 Protein düzeyi

#### 4. TARTIŞMA

Su ürünleri yetiştiriciliğinde enfeksiyöz hastalıklardan en yaygın olanı bakteriyel hastalıklardır. Hastalıklardan korumak yâda hasta balıkları tedavi etmek için uzun yıllardır antibiyotiklerden yararlanılmaktadır (Avsever ve ark 2010). Ancak uzun süre antibiyotikli yemlerle beslenen hayvanlarda kalıntı ve kronik toksisite problemleri ortaya çıkmakta, ayrıca bakterilerde direnç gelişimi görülmektedir ki bu durum hem bu canlılar hem de tüketiciler için tehlike oluşturmaktadır (Serrano 2005). Öte yandan, bilinçsiz ve kontrolsüz kullanımları nedeniyle avantajdan çok dezavantaj oluşturan antibiyotiklere alternatif olarak bilim insanları yeni terapötik arayışına odaklanmışlar ve biyolojik aktif maddelerin ana kaynaklarından olan bitkiler üzerinde birçok çalışmalar yapmışlardır.

Asteraceae familyasından olan *Inula* cinsi 100'den fazla türe sahip olan çok yıllık tıbbi bir bitkidir. Anavatanı Afrika olan *Inula* spp. oradan dünyanın çeşitli bölgelerine dağılım göstermiştir. Uzun yıllardır dünya çapında tıbbi amaçlı kullanımları mevcut olup saygın bir tıbbi değere sahiptir. Özellikle anti-enflamatuar, anti-septik, kas gevşetici, diüretik, romatizmal ağrıların giderilmesi, anemi, bronşit, kanser hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Etiyofarmakolojik kullanımları nedeniyle *Inula* spp. bitkisi üzerinde giderek artan çalışmalar, geleneksel uygulamalarını kanıtlamak için hem fito-kimyasal çalışmaları hem de aktif prensibi ve farmakolojik değerlendirmeleri içermektedir (Seca ve ark., 2014). *Inula* cinsi içerisinde önemli bir tür olan *I. viscosa* L. farmakolojik etkilerini içerdikleri seskiterpenler, seskiiterpen asitleri, laktonları, flavonoidler gibi aktif bileşenleri ile sağlamaktadır (Wollenweber ve ark., 1991; Marongiu ve ark., 2003).

Medikal bitkilerin alternatif bir tedavi olarak kullanılması tarihi bir süreçtir ve uzun zamandan beri bilinmekte, son zamanlarda balık yetiştiricilik işletmelerinde çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Özellikle yem verimini arttırmak, dezenfeksiyon ayrıca balık hastalıklarının tedavi edici etkileri üzerinde de birçok çalışmalar yapılmıştır. Kimyasal analizlerinde içerdikleri flavonoidler, terpenoidler dâhil olmak üzere biyolojik olarak aktif birçok bileşen içermesi sebebiyle kimyasal maddelere, antibiyotiklere karşı alternatif olarak bu bitkilerden yararlanılmaktadır (Jan ve ark., 2010; Scalbert ve ark., 2005).

Türkiye'nin birçok bölgesinde kendiliğinden yetişebilen sarı çiçekli, çok yıllık yarı çalimsı bitkilerden olan *I. viscosa*'nın antibakteriyel, antiproliferatif, antioksidan,

antidiyabetik, antitumoral, antienflamatuar vb. etkilerinin olduğu literatür çalışmalarıyla bilinmektedir (Konishi ve ark., 2002, Stojakowska ve ark., 2005, Zhao ve ark., 2006).

Talib ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada *I. viscosa*'nın kimyasal bileşenlerinin antiproliferatif ve antimikrobiyal etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar, antiproliferatif aktiviteyi üç hücre hattı üzerinde (MCF-7, Hep-2 ve Vero hücre hattı) MTT analizleriyle belirlemişlerdir. *I. viscosa*'nın kimyasal bileşenlerinde mevcut olan 4 flavonoid MCF-7, Hep-2 hücre hatlarına karşı yüksek antiproliferatif aktivite sergilemiş, ancak Vero hücre hattında sınırlı bir aktivite göstermiştir. Bir diğer çalışmada, *I. viscosa* bitkisinden elde edilen metanol ve su özütlerinin antiproliferatif aktivitesi MCF-7 ve T-98 hücre hatları üzerinde değerlendirilmiştir. *I. viscosa*'nın metanol özütünün MCF-7 ve T-98 hücre hatları üzerine sırasıyla  $179.5 \pm 2$  µg/ml ve  $121 \pm 3$  IC<sub>50</sub> değerleri ile su özütünden daha iyi antiproliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir (Özkan ve ark., 2015). Abu-Dahab ve Afifi (2007), *I. viscosa* ekstraktının A549 ve HL60 hücre hatları üzerinde toksik bir etki göstermediği, ancak MCF-7 hücre hattında güçlü bir antiproliferatif ve sitotoksik aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise, *I. viscosa*'nın farklı konsantrasyonlarının RTG-2 hücre hattı üzerinde proliferatif etkileri araştırılmıştır. Su destilasyonu yöntemiyle elde edilen *I. viscosa* esansiyel yağının farklı konsantrasyonlarını (1, 5, 10 ve 20 µg/ml) RTG-2 hücrelerine uygulanmış 1 µg/ml konsantrasyonun kontrol grubuna göre %1,1'lik hücre proliferasyonu gösterdiği izlenmiştir. Ancak artan konsantrasyonların hücre canlılığı üzerinde sırasıyla %1.7, %19 ve %36 düzeyinde azaltıcı etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. *I. viscosa*'nın biyolojik etkileri esas olarak kimyasal yapılarına ve molekül içindeki farklı kısımların nispi yönelimlerine bağlı olduğu için çalışmalar arasındaki farklılıkların bundan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Balıklarda enfeksiyöz bakteriyel enfeksiyonlar, balık sağlığı üzerindeki büyük etkileri nedeniyle araştırmacıların dikkatini ve ilgisini uzun yıllardır çekmektedir. Öyle ki bu hastalıklara bağlı mortaliteler ve beraberinde getirdiği ekonomik kayıplar neredeyse toplam üretimin %10'nunu oluşturmaktadır. Balıklarda hastalıklara neden olan bakteriyel enfeksiyonlar çoğunlukla gram negatif kaynaklıdır (Akaylı ve ark., 2015; Selveraj ve ark., 2002). Gram-negatif bakteriyel enfeksiyonların patogeneğinde kilit bir rol oynayan LPS gram-negatif bakterilerde dış zarın merkezi bir bileşenidir (Whitfield ve Trent, 2014). Ana virülans faktörü olarak kabul edilen endotoksinler de denilen bakteriyel lipopolisakaritler (LPS), insanlarda ve hayvanlarda hastalıkların lethal etkilerinden ve klinik belirtilerinden sorumludur (Morrison ve ark., 1985; Brandtzaeg ve ark., 2001). Yüksek omurgalı

hayvanlar çok düşük dozlarda dahi endotoksine hassasken, balık gibi daha düşük omurgalılar endotoksik şoka sıklıkla dirençlidir. Buna rağmen LPS, sitokinleri, akut faz proteinlerini eksprese etme gücüne sahiptir ve ayrıca çeşitli balık türlerinde immünolojik, patolojik, fizyolojik, immüno-endokrinolojik ve nöro-immünolojik etkiler gösterir (Pepels ve ark., 2004). Enfeksiyon boyunca, bakteri LPS'si; inflamatuvar hücreler tarafından konağın mikroorganizmalarla mücadelesinde vazgeçilmez rol oynayan sitokinlerin salınımına maruz kalır. Ancak aşırı sitokin üretimi (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 vb.) hücrelerde hasara ve inflamatuvar hastalıklara yol açar (Jin ve ark., 2011). Bakteriyel enfeksiyonu takiben sitokin uyarımı boyunca IL-6; proinflamatuvar sitokinlerden ise TNF- $\alpha$  ve IL- $\beta$  salınımı izlenmektedir ki bu salınım balıklarda antibakteriyel, antiparazitik ve antiviral immünitede anahtar rol oynamaktadır (Nam ve ark., 2007; Mladineo ve Block, 2010; Verriera ve ark., 2011). Yapılan bir çalışmada, Costa ve ark. (2011) gökkuşacağı alabalığı (RTS-11) hücrelerinde inflamasyon süresince IL-6 ve IL-1 $\beta$  ekspresyonlarının LPS ile indüklendiğini, ayrıca IL-6'nın belirgin şekilde aşağı regüle edildiğini rapor etmişlerdir (Costa ve ark., 2011). Fırsatçı mikroorganizmalara ve ürünlerine karşı hedef organlarda inflamasyon oluşumu ile çeşitli sitokinler stimüle edilmektedir. Proinflamatuvar sitokinlerden IL-6 ve anti-enflamatuvar sitokinlerden IL-10 'un enfeksiyon boyunca artması birçok literatür ile ortaya konmuştur (Peters ve Noverr, 2013; Van der Poll ve ark., 1996). Gómez ve ark. (2005), *S. aureus* enfeksiyonlarında, IL-6 ekspresyonunun yüksek seviyelere ulaştığını rapor etmişlerdir. Bir diğer çalışmada ise, *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'nın pro-enflamatuvar sitokinlerden IL-6 ekspresyonunu güçlü bir şekilde aktive ettiği bulunmuştur (Schildberger ve ark., 2013). Sun ve ark. (2009), *P. aeruginosa*' dan 1.000 ng/mL LPS'nin tam kanda TNF-a, IL-1, IL-6, IL-8 ve IL-10'un belirgin salgılanmasına yol açtığını göstermişlerdir. Çalışmamızda, gökkuşacağı alabalığı gonad hücreleri (RTG-2) üzerine 24 saat süre ile farklı konsantrasyonlarda LPS uygulandı. Hücre canlılıkları incelendi. Deneysel inflamasyon oluşturmak için en etkin doz LPS 20  $\mu$ M/ml olarak belirlendi. Sonrasında gonad hücreleri üzerinde gen ekspresyon sonuçları (IL-1 $\beta$ , IL-8 ve TNF- $\alpha$  ve IL-6) değerlendirildi. Elde edilen verilere göre tüm pro-enflamatuvar gen ekspresyon düzeylerinin LPS uyarımı ile up regüle edildiği izlendi. Bu veriler gösteriyor ki diğer çalışma bulgularıyla sonuçlarımız örtüşmektedir. Costa ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada ise IL-6 ekspresyon sonuçlarımızı yansıtan bulgu ile benzerdir. Pro-enflamatuvar gen ekspresyon seviyelerindeki up veya down regülasyon düzeyleri LPS konsantrasyon farkları, uygulama süresi, kullanılan hücre hattı farklılığı gibi birçok faktör

ile etkilenmekte ve çalışmalar arasındaki farklılıkların bunlardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

İnsan ve hayvanların bakteriyel enfeksiyonlarını tedavi etmek için etkinliğe sahip fitoterapötikler yüzyıllar boyunca kullanılmaktadır (Silva ve Fernandes-Junior, 2010). Son zamanlarda su ürünleri yetiştiriciliğinde majör patojenlere karşı verilen savaşlarda *in vitro* birçok test uygulanmış ve çözüm arayışına gidilmiştir (Ostrand ve ark., 2012; Albert ve Ransangan, 2013; Xue-Gang ve ark. 2013). Ayrıca, bazı *in vivo* testler, çeşitli balık hastalıklarının tedavisi ve geri kazanılması ile ilgili olumlu etkiler göstermiştir (Abd El-Galil ve Aboelhadid, 2012; Schelkle ve ark., 2013). Aynı anda birkaç hedefi etkileyen etki tarzları nedeniyle bakteriyel direnç gelişimine daha az eğilimli olmaları sebebiyle su ürünlerinde kullanılan mevcut antimikrobiallerin, bitkisel ürünlerle değiştirilmesi önem arz etmektedir (Bakkali ve ark., 2008; Kulkarni ve ark., 2013). Doğal bitki özleri içerdikleri biyoaktif özler ve doğal bileşikler ile antimikrobiyal, antioksidan ve antiinflamatuvar gibi birçok etkinliğe sahiptir. Bu çalışmada *I. viscosa*'nın LPS enfeksiyonu sonucu antiinflamatuvar etkinliği incelenmiştir. Bitki özleri üzerinde anti-enflamatuvar araştırmalar ile elde edilen bulgular, biyoaktif ekstraktların ve doğal bileşiklerinin, çeşitli proinflamatuvar mediatörlerin üretiminde asıl rolü oynayan NF- $\kappa$ B ve mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) gibi iki ana sinyalleme yolunu bloke ederek biyolojik özelliklerini sergilediklerini kanıtlamıştır. Mueller ve ark. (2010) bitki ekstraktlarının proliferatif veya antiinflamatuvar aktivitesini belirlemek için LPS ile uyarılmış makrofaj hücrelerini kullanmışlardır. 0.5 mg / mL konsantrasyonda kekiğin (*Origanum onites*) IL-6 ekspresyon seviyelerini redüse ettiğini, 0.2 mg / mL kekiğin ise IL-10 ekspresyon seviyelerini arttırdığını raporlamışlardır. Assaf ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans* gibi fırsatçı patojenler üzerinde geleneksel tıpta kullanılan altı bitkinin (*Arbutus andrachne*, *Chrysanthemum coronarium*, *Inula viscosa*, *Origanum syriacum*, *Punica granatum* ve *Rosmarinus officinalis*) antimikrobiyal ve anti-enflamatuvar aktiviteleri değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre bu bitkilerden en fazla antibakteriyel etkiyi gösteren *O. syriacum*'du. Tüm incelenen bitki ekstratları anti-enflamatuvar etkisini pro-enflamatuvar sitokinlerden IL-6 ekspresyonu doza bağlı olarak inhibe etmesi, IL-10 ekspresyonunda ise aşağı regülasyon ile göstermiştir. *O. syriacum* ve *R. officinalis* karışımı, sinerjik antimikrobiyal etkiye sahip

bir anti-enflamatuar etki gösterdiği diğerk bir bulgu olarak belirtilmiştir. Çeşitli model sistemlerinde, IL-10' un, akut enflamatuar durumların geliştirilmesinde rol aldığı bilinen bazı pro-enflamatuar sitokinlerin (Örn., TNF-a, IL-1, IL-6) üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Pro-enflamatuar sitokinlerin gen ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin izlendiği çalışmamızda LPS enfeksiyonuna karşı *I. viscosa* esansiyel yağının incelenen tüm parametrelerde down-regülasyon göstermiş ve *I. viscosa* yağının anti-enflamatuar etkinliği ortaya konmuştur. Bu sonuçlarımız diğerk çalışma bulgularıyla birbirini destekler özellikler sergilemektedir.



## 5. SONUÇLAR

Bakteriyel etkenlerin neden olduğu fırsatçı enfeksiyonlar, kültür balıkçılığında yaygın olup birincil veya ikincil kaynaklı olabilir. Bununla birlikte, bu genellikle konak canlı bağışıklık sisteminin etkinliğinin azalmasına neden olan olumsuz çevresel koşullarına maruz kaldığında ortaya çıkar ve bu durum parazit istilası, zayıf beslenme, stresten kaynaklanıyor olabilir. Sonuç itibariyle balık üretim çiftliklerinde herhangi bir olumsuzluk karşısında konak savunmasında gösterilen bir seri fizyolojik yanıt dizisi inflamasyonu ile ortaya çıkmaktadır. Bu durum sitokin gen ekspresyon seviyelerinde erken aşamalarda görülen değişimler kendini göstermekte ve hastalık tanısında değerli bilgiler sunmaktadır.

Konak, insidensi yüksek bir patojene maruz kaldığı zaman, terapötik ilaç kullanımı kaçınılmazdır. Bu ilaçlar dezenfektan, antibiyotik olduğu taktirde; su ve balıkta rezidü, toksisite, bakteriyel direnç gibi birçok olumsuzlukta beraberinde gelmiş olacaktır. Yeni terapötikler arayışında bitkiler, biyolojik olarak aktif materyallerin ana kaynaklarından biri olarak kabul edilmektedir. Bitki özleri, antioksidan, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar etkinlikleri nedeniyle balık hastalıklarını kontrol etmede önemli özelliklere sahiptir. Bu nedenle medikal bitki kullanımı balık sağlığı yönetiminde antibiyotiklere alternatif bir tedavi yöntemi olarak değerlendirilmektedir.

Bu çalışmada, bakteri endotoksini olarak bilinen LPS ile enfekte edilmiş gökkuşağı alabalık gonad hücreleri (RTG-2) üzerinde doğal antioksidan ve inflamasyon (yangı) giderici özelliği bulunan *Inula viscosa*'nın (yapışkan andız otu) anti-proliferatif ve anti-enflamatuar etkinlikleri pro-enflamatuar sitokinlerin (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 ve IL-6) gen ekspresyon değişimleri izlenerek çalışılmıştır. Hücre canlılığı analizleriyle LPS'in meydana getirdiği hücre kayıplarının *I. viscosa* iyileştirici etkileri tespit edilmiştir. Ayrıca LPS ile enfekte edilen RTG-2 hücrelerinde *I. viscosa*'nın pro-enflamatuar gen ekspresyon düzeylerinde yüksek oranlarda down-regülasyon göstermeleri ile bu çalışma *I. viscosa*'nın balık bakteriyel hastalıkları üzerinde etkinlikleri üzerinde bir literatür desteği sağlamaktadır.

## 6. ÖNERİLER

Son yıllarda, tüm dünyada balık üretim çiftliklerinin teşvikiyle yetiştiricilik teşvik edilmiştir. Üretim zincirinde, kısa bir süre içinde ve daha düşük maliyetle maksimum üretkenlik talebi, ürünün sağlık durumunu doğrudan veya dolaylı olarak etkileyen bazı engellere yol açmaktadır. Yüksek stoklama yoğunluğu, yetersiz beslenme kalitesi, su ortamının kalitesizliği ve biyolojik güvenlik önlemlerinin eksikliği, yetiştiricilikte, özellikle balık yetiştiriciliğinde görülen başlıca problemler arasındadır, çünkü bu koşullar, konakta patojen yayılmasını ve / veya immünosupresyonunu kolaylaştırmaktadır.

Araştırmacılar, kültür balıkçılığındaki sağlık sorunlarına çözüm bulma konusunda teşvik edici çalışmalarını sürdürmektedir. Balık hastalıklarını kontrol etme ve önleme çözümleri arasında aşı olarak profilaktik ajanların geliştirilmesi ve immünostimülan diyetlerin geliştirilmesi yer alır. Bununla birlikte, patojenlerin neden olduğu ölüm salgınlarını kontrol etmek için, en azından konaktaki patojenlerin insidensini azaltmak amacıyla, üretimin bir aşamasında terapötik bir ürün kullanılması zorunlu hale gelmiştir. Bu terapötik maddeler son araştırmalarla bitkisel kaynaklardan sağlanmaktadır. Uzun yıllardır halk sağlığı açısından değerli olan birçok bitki özü içerdiği etken maddelerle birçok hastalık durumlarını tölere edebilmekte hatta etkili tedavi yöntemleri olarakta kullanılmaktadır. Bu durum balık yetiştiriciliği ile uğraşanlarında dikkatini çekmiş antibiyotik dezenfektan gibi kimyevi maddelerin yan etkilerini elemine etmek için alternatif bir tedavi olarak değerlendirilmiştir. Ancak bitkisel ürün çeşitlerinin, metodolojilerin ve hedef patojenlerin çeşitliliği göz önüne alındığında, çalışmalar arasındaki karşılaştırmaların karmaşıklığı göze çarpmaktadır. Bu karmaşıklık benzer koşullara sahip çalışmaların daha fazla teşvik edilmesi ile indirgenebilir. Ayrıca bitkisel kökenli çalışmaların kronik ve akut toksisite, hedef ve hedef olmayan organizmalar üzerine etkileri, çevre üzerine olan etkileri, balık yetiştiriciliğinde antioksidan ve anti-enflamatuar etkinlikleri gibi daha ileriki çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun yanında çalışmaların *in vitro* ve *in vivo* olarak karşılaştırılmalı yapılması bir diğer önemli konuların başında gelmektedir. Çünkü etkinlik konusundaki çoğu çalışma, *in vitro* testlere dayanmaktadır. Bu nedenle, mevcut tedavilerin değiştirilmesini sağlamak için daha pratik ve ekonomik çalışmalara ihtiyaç vardır ve tedarik zinciri, sanayi ve araştırmacılar arasındaki ortak çalışmalar da çok önemlidir.

## KAYNAKLAR

- Abu-Dahab, R., Afifi, F.,** 2007. Antiproliferative activity of selected medicinal plants of Jordan against a breast adenocarcinoma cell line (MCF7). *Sci. Pharm.*, 75(3): 121-146.
- Abd El-Galil, M.A., Aboelhadid, S.M.,** 2012. Trials for the control of trichodinosis and gyrodactylosis in hatchery reared *Oreochromis niloticus* fries by using garlic. *Veterinary Parasitology*, 185: 57–63.
- 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.
- Albert, V., Ransangan, J.,** 2013. Antibacterial potential of plant crude extracts against Gram negative fish bacterial pathogens. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biosciences*, 3: 21–27.
- Anonim,** 2006. Extraction of the essential oil of lavender. [http://www.routeslavande.com/about\\_lavender/stills.html](http://www.routeslavande.com/about_lavender/stills.html).
- Antonopoulou, E., Kaitetzidou, E., Castellana, B., Panteli, N., Kyriakis, D., Vraskou, Y., Planas, J.V.,** 2017. *In vivo* effects of lipopolysaccharide on peroxisome proliferator-activated receptor expression in juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Biology*, 6: 20-36.
- Aras, N.M., Kocaman, E.M., Aras, M.S.,** 2000, Genel su ürünleri ve kültür balıkçılığının temel esasları, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Yayınları, Erzurum, No: 216.
- Arda, M., Seçer, S., Sarıeyyüpoğlu, M.,** 2002. Balık hastalıkları. Medisan Yayınevi, Ankara, 36s.
- Assaf, A.M., Amro, B.I., Mashallah, S., Haddadin, R.N.** 2016. Antimicrobial and anti-inflammatory potential therapy for opportunistic microorganisms. *J. Infect. Dev. Ctries.*, 10(5): 494-505.
- Avsever, M.L., Türk, N., Tunalgil, S.,** 2010. The increase of antibiotic resistance in aquaculture and its effects on human health. *Bornova Vet. Kont. Araşt. Enst. Derg.*, 32: 19-23.
- Baba, E.,** 2017. Su ürünleri yetiştiriciliğinde bitkisel immunostimulant kullanımı. *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.*, 7(3): 249-256.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M.** 2008. Biological effects of essential oils—A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446–475.

- Baytop, T.** 1999. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Ankara:Nobel Tıp Kitabevleri, 2. Baskı, p.: 151.
- Benedict, C.A., Banks, T.A., Ware, C.F.,** 2003. Death and survival: viral regulation of TNF signaling pathways. *Curr Opin Immunol.*, 15(1): 59-65.
- Brandtzaeg, P., Bjerre, A., Vstebo, R., Brusletto, B., Joo, G.B., Kierulf, P.,** 2001. Neisseria meningitidis lipopolysaccharides in human pathology. *Journal of Endotoxin Research*, 7: 401-420.
- Bos, M.P., Tomassen, J.,** 2004. Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Current opinion in Microbiology*, 7: 610-616.
- Buonocore, F., Forlenza, M., Randelli, E., Benedetti, S., Bossu, P., Meloni, S.,** 2005. Biological activity of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) recombinant interleukin-1beta. *Mar Biotechnol (NY)*., 7(6): 609-17.
- Chen, L., He, C., Baoprasertkul, P., Xu, P., Li, P., Serapion, J.,** 2005. Analysis of a catfish gene resembling interleukin-8: cDNA cloning, gene structure, and expression after infection with *Edwardsiella ictaluri*. *Dev. Comp. Immunol.*, 29(2): 135-42.
- Costa, M.M., Maehr, T., Diaz-Rosales, P., Secombes, C.J., Wang, T.,** 2011. Bioactivity studies of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) interleukin-6: Effects on macrophage growth and antimicrobial peptide gene expression. *Mol. Immunol.*, 48 (15): 1903-1916.
- Çelikkale, M.S.,** 1994. İçsu balıkları ve yetiştiriciliği. Cilt, I. K.T.Ü. Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi, Trabzon, 419 s.
- Danino, O., Gottheb, H.E., Grossman, S., Bergman, M.,** 2009. Antioxidant activity of 1,3-dicaffeoylquinic acid from *Inula viscosa*. *Food Res. Int.*, 42: 1273-1280.
- Dinarelo, C.A.,** 1992. Interleukin-1 in infectious diseases. *Immunological Reviews*, 127:119-146.
- Fulop, M., Manchee, R., Titball, R.,** 1995. Role of lipopolysaccharide and a major outer membrane protein from *Francisella tularensis* in the induction of immunity against tularemia. *Vaccine*, 13(13): 1220- 1225.
- Fujiki, K., Shin, D.H., Nakao, M., Yano, T.,** 2000. Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 beta, high affinity immunoglobulin E Fc receptor gamma subunit and serum amyloid A. *Fish Shellfish Immunol.*, 10(3): 229-42.
- Gómez, M.I., Sokol, S.H., Muir, A.B., Soong, G., Bastien, J., Prince, A.S.** 2005. Bacterial induction of TNF-alpha converting enzyme expression and IL-6 receptor alpha shedding regulates airway inflammatory signaling. *J. Immunol.*, 175: 1930-1936.

- Gökbulut, A., Özhan, O., Satılmış, B., Batçioğlu, K., Günal, S., Şarer, E.,** 2013. Antioxidant and antimicrobial activities and phenolic compounds of selected inula species from Turkey. *Natural Product Communications*, 8(4): 475-479.
- Haoui, I.E., Derriche, R., Madani, L., Oukali, Z.,** 2015. Analysis of the chemical composition of essential oil from Algerian *Inula viscosa* (L.) Aiton. *Arabian Journal of Chemistry*, 8: 587-590.
- Hebert, C.A., Vitangcol, R.V., Baker, J.B.** 1991. Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding. *J. Biol. Chem.*, 266(28): 18989-94.
- Hickling, C.F.,** 1971. Fish culture. Faber and Faber, London, p. 317.
- Hirano, T.,** 1998. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int. Rev. Immunol.*, 16 (3-4): 249-84.
- Honda, G., Yeşilada, E., Tabata, M., Sezik, E., Fujita, T., Takeda, Y., Takaishi, Y., Tanaka, T.,** 1996. Traditional medicine in Turkey VI. Folk medicine in West Anatolia: Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın provinces. *J. Ethnopharmacol.*, 53: 75-87.
- Jan, A., Kamli, M., Murtaza, I., Singh, J., Ali, A., Haq, Q.,** 2010. Dietary flavonoid quercetin and associated health benefits-an overview. *Food Rev. Int.*, 26: 302-317.
- Jin, M., Iwamoto, T., Yamada, K., Satsu, H., Totsuka, M., Shimizu, M.,** 2011. Effects of chondroitin sulfate and its oligosaccharides on toll-like receptor mediated IL-6 secretion by macrophage-like J774.1 cells. *Biosci Biotechnol. Biochem.*, 75(7): 1-7.
- Kamel, C.,** 2000. A novel look at a classic approach of plant extracts. *Feed Mix, Special*, pp. 19-21.
- Kaplanski, G., Marin, V., Montero-Julian, F., Mantovani, A., Farnarier, C.,** 2003. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.*, 24(1): 25-29.
- 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
- Konishi, T., Shimada, Y., Nagao, T., Okabe, H., Konoshima, T.** 2002. Antiproliferative sesquiterpene lactones from the roots of *Inula helenium*. *Biol. Pharm. Bull.*, 25: 1370-1372.

- Kulkarni, R.R., Pawar, P.V., Joseph, M.P., Akulwad, A.K., Sen, A., Joshi, S.P.,** 2013. *Lavandula gibsoni* and *Plectranthus mollis* essential oils: Chemical analysis and insect control activities against *Aedes aegypti*, *Anopheles sfittephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Pest Science*, 86: 713–718.
- Küçükgül, A.,** 2018. An investigate on importance of the major components of herb essential oils on challenging with fish diseases. *Food Science and Technology*, 6(10): 1501-1506.
- Küçükgül, A., Küçükgül A.,** 2017. Apoptotic effects of artificial feed supplemented with *Thymus vulgaris* on *Oncorhynchus mykiss* against *Yersinia ruckeri*. *Indian Journal of Geo Marine Sciences* 46(06): 1170-1174.
- Küçükgül, A., Küçükgül, A., Gülşafak, İ.,** 2019. Bio-functions of carvacrol-supplemented feeds on lipopolysaccharide-induced rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 18(2): 205-214.
- Küçükgül, A., Küçükgül, A., Gönenci, R., Yurdagül Özsoy, Ş., Kutlu, B., İşgör, M.M.,** 2019. Investigation of the anti-apoptotic activity of ozone therapy in rainbow trout macrophages infected with *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture International*, 27: 771–783.
- Laing, K.J., Wang, T., Zou, J., Holland, J., Hong, S., Bols, N.** 2001. Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor-alpha. *Eur. J. Biochem.*, 268(5): 1315-22.
- Laing, K.J., Zou, J.J., Wang, T., Bols, N., Hirono, I., Aoki, T.** 2002. Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.*, 26(5): 433-44.
- Lee, D.S., Hong, S.H., Lee, H.J., Jun, L.J., Chung, J.K., Kim, K.H.,** 2006. Molecular cDNA cloning and analysis of the organization and expression of the IL-1beta gene in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 143(3): 307-14.
- Lee, E.Y., Park, H.H., Kim, Y.T., Choi, T.J.** 2001. Cloning and sequence analysis of the interleukin-8 gene from flounder (*Paralichthys olivaceous*). *Gene.*, 274(1-2): 237-43.
- Lee, J., Tae, N., Lee, J.J., Kim, T., Lee, J.H.,** 2010. Eupatolide inhibits lipopolysaccharide-induced COX-2 and iNOS expression in RAW264.7 cells by inducing proteasomal degradation of TRAF6. *Eur. J. Pharmacol.*, 636: 173-180.
- Lima De Faria, A.,** 1969. Hand book of molecular cytology. North-Holland Publications, Londra.
- Logambal, S.M., Venkatalakshmi, S., Michael, R.D.,** 2000. Immuno stimulatory effect of leaf extract of *Ocimum sanctum* L. in *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Hydrobiologia*, 430: 113-120.

- Lopez-Castejon, G., Sepulcre, M.P.; Roca, F.J., Castellana, B., Planas, J.V., Meseguer, J., Mulero, V., 2007.** Thetype II interleukin-1 receptor (IL-1RII) of the bony fish gilthead seabream *Sparus aurata* is strongly induced after infection and tightly regulated at transcriptional and post-transcriptional levels. *Mol. Immunol.*, 44: 2772–2780.
- Lu, D.Q., Bei, J.X., Feng, L.N., Zhang, Y., Liu, X.C., Wang, L., 2008.** Interleukin-1 beta gene in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*: molecular cloning, expression, biological activities and signal transduction. *Mol. Immunol.*, 45(4):857-67.
- Marongiu, B., Piras, A., Pani, F., Porcedda, S., Ballero, M., 2003.** Extraction, separation and isolation of essential oils from natural matrices by supercritical CO<sub>2</sub>. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(6): 505–509.
- Mladineo, I., Block, B.A., 2010.** Expression of cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in tissues and cysts surrounding *Didymocystis wedli* (Digenea, Didymozoidae) in the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Fish and Shellfish Immunology*, 29(3): 487-493.
- Morrison, D.C., Duncan, R.L., Goodman, S.A., 1985.** In vivo biological activities of endotoxin. *Progress in Clinical and Biological Research*, 189: 81-99.
- Mueller, M., Hobiger, S., Jungbauer, A., 2010.** Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food. Chem.*, 122: 987-996.
- Nam, B., Byon, J., Kim, Y., Park, E., Cho, Y., Cheong, J., 2007.** Molecular cloning and characterisation of the flounder (*Paralichthy solivaceus*) interleukin-6 gene. *Fish and Shellfish Immunology*, 23(1): 231-236.
- Nororiha, I.L., Niemir, Z., Stein, H., Waldher, R., 1995.** Cytokines and growth factors in renal disease: *Nephrol Dial Transplant*, 10: 775-786.
- Ortatatlı, M., Özgüven, V., Şengül, A., 1999.** Sepsis ve ağır infeksiyonların tanı ve takibinde yeni bir marker: Prokalsitonin. *Flora*, 4: 151-155.
- Ostrand, S.L., Glenn, R.A., Gannam, A.L., Hanson, K.C., 2012.** Inhibitory effects of rosemary oil on the in vitro growth of six common finfish pathogens. *North American Journal of Aquaculture*, 74: 230–234.
- Özgüven, M., Sekin, S., Gürbüz, B., Şekeroğlu, N., Ayanoğlu, F., Erken, S., 2005.** Tütün, tıbbi ve aromatik bitkiler üretimi ve ticareti. Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, Ankara.
- Özkan, E., Pehlivan Karakaş, F., Birinci Yıldırım, A., Taş İ., Eker, İ., Yavuz, M.Z., Uçar Türker, A. 2015.** *Inula viscosa* (yapışkan andız otu)'nın antibakteriyel, antioksidan, antiproliferatif etkileri ve fenolik madde içeriğinin belirlenmesi. 1. Ulusal Bitki Biyolojisi Kongresi, Bolu, 2-4 Eylül 2015.

- Papachristou, F., Chatzaki, E., Petrou, A., Kougioumtzi, I., Katsikogiannis, N., Papalambros, A., Tripsianis, G., Simopoulos, C., Tsaroucha, A.K., 2013.** Time course changes of anti- and pro-apoptotic proteins in apigenin-induced genotoxicity. *Chinese Medicine*, 8: 1-9.
- Peddie, S., Secombes, C.J., 2003.** The immuno stimulatory effects of Chevimmun in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 23: 48-51.
- Pepels, P.P.L.M., Van Helvoort, H., Wandelaar Bonga, S.E., Balm, P.H.M., 2004.** Corticotropin-releasing hormone in the teleost stress response: Rapid appearance of the peptide in plasma of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Journal of Endocrinology*, 180: 425-438.
- Peters, B.M., Noverr, M.C., 2013.** *Candida albicans*-*Staphylococcus aureus* poly microbial peritonitis modulates host innate immunity. *Infect. Immun.*, 6: 2178-2189.
- Praveen, K., Evans, D.L., Jaso-Friedmann, L., 2006.** Constitutive expression of tumor necrosis factor-alpha in cytotoxic cells of teleosts and its role in regulation of cell-mediated cytotoxicity. *Mol. Immunol.*, 43(3): 279-291.
- Rahman, M.M., McFadden, G., 2006.** Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS Pathog.*, 2(2): 0066-0077.
- Saeij, J.P., Stet, R.J., de Vries B.J., van Muiswinkel, W.B., Wiegertjes, G.F., 2003.** Molecular and functional characterization of carp TNF: A link between TNF polymorphism and trypanotolerance. *Dev. Comp. Immunol.*, 27(1): 29-41.
- Sakai, M., 1999.** Current sea chstatus of fish immuno stimulants. *Aquaculture*, 172: 6392.
- Salyers, A.A., Whitt, D.D., 1994.** Bacterial pathogenesis: A molecular approach. ASM Press. Washington, USA. pp. 260-268.
- Sangrador-Vegas, A., Lenington, J.B., Smith, T.J., 2002.** Molecular cloning of an IL-8-like CXC chemokine and tissue factor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by use of sup-pression subtractive hybridization. *Cytokine.*, 17(2): 66-70.
- Sant'anna, A., Spolidorio, L., Ramalho, L., 2008.** Analysis of the association between formocresol and endotoxin in the subcutaneous tissue of mice. *Braz. Dent. J.*, 19: 40-45.
- Scalbert, C., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., 2005.** Dietary polyphenols and prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci.*, 45: 287-306.
- Scapigliati, G., Buonocore, F., Bird, S., Zou, J., Pelegrin, P., Falasca, C., 2001.** Phylogeny of cytokines: Molecular cloning and expression analysis of sea bass *Dicentrarchus labrax* interleukin-1 beta. *Fish Shellfish Immunol.*, 11(8):711-726.

- Schelkle, B., Snellgrove, D., Cable, J.,** 2013. In vitro and in vivo efficacy of garlic compounds against *Gyrodactylus turnbulli* infecting the guppy (*Poecilia reticulata*). *Veterinary Parasitology*, 198: 96–101.
- Schildberger, A., Rossmanith, E., Eichhorn, T., Strassl, K., Weber, V.,** 2013. Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm.*, 2013: 697-972.
- Secombes, C.J., Wang, T., Bird, S.,** 2011. The interleukins of fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 35(12): 1336-1345.
- Selvaraj, V., Sampath, K., Sekar, V.,** 2005. Administration of yeast glucan enhance survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 19: 293-306.
- Sen, G.C., Lengyel, P.,** 1992. The interferon system. A birdseyeview of its biochemistry. *J. Biological. Chem.*, 267: 5017- 5020.
- Serrano, P.H.,** 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture, Publishing management service Information division FAO, Roma, p. 29-33.
- Sirakov, I., Velichkova, K., Slavcheva-Sirakova, D.,** 2018. *In vitro* study of the use of some medicinal plants against the fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, 12: 168-171.
- Sigh, J., Lindenstrom, T., Buchmann, K.** 2004. Expression of pro-inflammatory cytokines in rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*) during an infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish Shell Fish Immunol.*, 17: 75–86.
- Silva, N.C.C., Fernandes-Junior, A.,** 2010. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 16: 402–413.
- Stojakowska, A., Kedzia, B., Kisiel, W.,** 2005. Antimicrobial activity of 10-isobutyryloxy-8,9-epoxythymol isobutyrate. *Fitoterapia*, 76: 687-690.
- Sun, L., Guo, R.F., Newstead, M.W., Standiford, T.J., Macariola, D.R., Shanley, T.P.,** 2009. Effect of IL-10 on neutrophil recruitment and survival after *Pseudomonas aeruginosa* challenge. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1: 76-84.
- Timur, G., Timur, M.,** 2003, Balık hastalıkları, İstanbul Üniversitesi Yayınları, No: 4426, İstanbul.
- Tübitak,** 2019. Türkiye Taksonomik Tür Veritabanı, Inula Linnaeus. Erişim: [<http://biow.tubitak.gov.tr/present/taxonForm1.jsp?taxon=3692>]. Erişim Tarihi: 13.04.2019.

**URL-1**, 2019 [https://tr.wikipedia.org/wiki/Endotoksin#media/File:LPS\\_en.svg](https://tr.wikipedia.org/wiki/Endotoksin#media/File:LPS_en.svg)

**URL-2**, 2019 <http://yabanicicek.com/inula-viscosa.php>.

**Van der Poll, T., Marchant, A., Keogh, C.V., Goldman, M., Lowry, S.F.**, 1996. Interleukin 10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia. *J. Infect. Dis.*, 174: 994-1000.

**Verriera, E.R., Langevin, C., Benmansour, A., Boudinot, P.** 2011., Early antiviral response and virus-induced genes in fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 35(12): 1204–1214.

**Wang, T., Gorgoglione, B., Maehr, T., Holland, J.W., Vecino, J.L., Wadsworth, S.**, 2011. Fish suppressors of cytokine signaling (socs): gene discovery, modulation of expression and function. *J. Signal Transduct.*, 2011: 905- 813.

**Whitfield, C., Trent, M.S.**, 2014. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev. Biochem.*, 83: 99–128.

**Whyte, S.K.**, 2007. The innate immune response of finfish- A review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol.*, 23(6): 1127-1151.

**Wollenweber, E., Mayer, K., Roitman, J.N.**, 1991. Exudate flavonoids of *Inula viscosa*, *Phytochemistry*, 30(7): 2445–2446.

**Xue-Gang, H., Lei, L., Cheng, C., Kun, H., Xian-Le, Y., Gao-Xue, W.**, 2013. In vitro screening of Chinese medicinal plants for antifungal activity against *Saprolegnia* sp. and *Achlya klebsiana*. *North American Journal of Aquaculture*, 75: 468–473.

**Yang, X., Wang, S., Du, L., Yang, K., Wang, X., Zhang, A., Zhou, H.**, 2013. Molecular and functional characterization of IL-1 receptortype 2 in grass carp: A potent inhibitor of IL-1 $\beta$  signaling in head kidney leukocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, 41: 738–745.

**Yaniv, Z., Dafni, A., Friedman, J., Palevitch, D.**, 1987. Plants used for the treatment of diabetes in Israel. *J. Ethnopharmacol.*, 19:145-151.

**Yıldız, M., Şener, E.**, 2004. Levrek (*Dicentrarchus labrax* L.) başlangıç yemlerinde balık yağı yerine kullanılan farklı bitkisel yağların karaciğer yağı kompozisyonuna etkisi. *Türk Veteriner Hayvancılık Dergisi*, 27: 709-717.

**Zeggwagh, N.A., Ouahidi, M.L., Lemhadri, A., Eddouks, M.**, 2006. Study of hypoglycaemic and hypolipidemic effects of *Inula viscosa* L. aqueous extract in normal and diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.*, 108: 223-227.

**Zhao, Y.M., Zhang, M.L., Shi, Q.W., Kiyota, H.**, 2006. Chemical constituents of plants from the genus *Inula*. *Chem Biodivers.*, 3: 371-384.

- Zou, J., Grabowski, P.S., Cunningham, C., Secombes, C.J.,** 1999. Molecular cloning of interleukin 1beta from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals no evidence of an ice cut site. *Cytokine*, 11(8): 552-560.
- Zou, J., Secombes, C.J.,** 2016. The function of fish cytokines. *Biology*, 5(2): 23-58.
- Zou, J., Secombes, C.J., Long, S., Miller, N., Clem, L.W., Chinchar, V.G.** 2003. Molecular identification and expression analysis of tumor necrosis factor in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Comp. Immunol.*, 27(10): 845-58.
- Zou, J., Wang, T., Hirono, I., Aoki, T., Inagawa, H., Honda, T.,** 2002. Differential expression of two tumor necrosis factor genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.*, 26(2): 161-172.



## ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Tunceli’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Tunceli’de tamamladı. 2014 yılında Tunceli Su Ürünleri Fakültesinden mezun oldu. 2015 yılında Munzur Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine başlayıp, 2019 yılında tamamladı.

