

İZMİR KATİP CELEBİ ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDA (*Oncorhynchus mykiss*) ANTİMİKROBİYAL
ETKİLİ FUNGAL METABOLİTLERİN TNF- α ve IL-1 β GEN
EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Betül Melike OĞAN

Su Ürünleri Anabilim Dalı

Yetiştiricilik Programı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Muhammet ALTUNOK

MAYIS 2016

İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ ★FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDA (*Oncorhynchus mykiss*) ANTİMİKROBİYAL
ETKİLİ FUNGAL METABOLİTLERİN TNF- α ve IL-1 β GEN
EXPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ.**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Betül Melike OĞAN

Y130107048

Su Ürünleri Anabilim Dalı

Yetiştiricilik Programı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Muhammet ALTUNOK

MAYIS 2016

İKÇÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün Y130107048 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Betül Melike OĞAN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "Gökkuşuğu Alabalığında (*Onchorhynchus mykiss*) Antimikrobiyal Etkili Fungal Metabolitlerin TNF- α , IL-1 β İmmün Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisi" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri üyeleri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Yrd. Doç. Dr. Muhammet ALTUNOK**
İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Serpil SERDAR**
Ege Üniversitesi

Doç. Dr. Semih ERGİN
İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi

Teslim Tarihi : ^{7 Kasım}~~25 Mayıs~~ 2016

Savunma Tarihi : 18 Mayıs 2016

ÖNSÖZ

Tezimin hazırlanıp son halini aldığı ana kadar beni yalnız bırakmayan, cesaretlendiren ve sınırları aşmanın ötesinde yeni ufuklar kazandıran danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Muhammet ALTUNOK'a,

Çalışmamda maddi manevi desteğini üzerimden esirgemeyen, her takıldığımda hatalarımla sorularıma büyük bir sabırla cevap veren ve elini üzerimden bir an olsun çekmeyen okulumuzun Araştırma Görevlilerinden Sayın Zerife PEKER'e,

Bu çalışmam boyunca bilgisinden, tecrübesinden yararlandığım aynı zamanda çalışmama ışık tutarak kendimi geliştirmemi sağlayan değerli hocam, Sayın Doç. Dr. Hüseyin SARIBAŞAK'a,

Son olarak tez çalışmamı en iyi şekilde bitirmemde maddi manevi katkı sağlayan değerli arkadaşım Sümeyye ERTUĞRUL'a, aileme ve yakın dost çevreme de,

Teşekkürü bir borç bilirim...

MAYIS/2016

BETÜL MELİKE OĞAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	xi
TABLO LİSTESİ	xv
ŞEKİL LİSTESİ	xvii
ÖZET	xix
SUMMARY	xxi
1.GİRİŞ	1
1.1 Genel Bilgiler	1
1.2 Balıklarda Bağışıklık Sistemi.....	4
1.2.1 Bağışıklık sisteminin regülatörleri: Sitokinler, İnterlökinler	5
1.2.1.1 TNF- α , IL-1 β	7
1.3 İmmünostimülan Maddeler	9
1.3.1 Balıklarda kullanılan immünostimülanlar.....	11
1.4 Sekonder Metabolitler	13
1.4.1 Antimikrobiyal etkili fungal metabolitler	14
1.5 İmmünostimülanların TNF- α , IL-1 β Gen Expressiyonları Üzerine Etkileri....	15
1.6 Hipotez	17
2. MATERYAL VE METOT	19
2.1 Materyaller	19
2.1.1 Kullanılan balık.....	19
2.1.2 Kullanılan araç ve gereçler	19
2.1.3.Kullanılan Kimyasallar	21
2.1.4 Kullanılan kitler	21
2.2 Yöntem.....	22
2.2.1 Deneme dizaynı.....	22
2.2.2 Fungal özütler	22
2.2.2.1 Süngerden fungus izolasyonu	22
2.2.2.2 Fermentasyon aşaması	23
2.2.2.3 Özütleme aşaması	23
2.2.3 Biyoaktivite taraması	23
2.2.3.1 Antibakteriyel aktivite.....	23
2.2.3.2 Serbest radikal temizleme aktivitesi	24
2.2.4 Fungus türünün tanımlanması.....	24
2.2.5 Özütün balıklara verilmesi	25
2.2.6 Balıklardan kan örneklerinin alınması	25
2.2.7 RNA izolasyonu	25
2.2.8 cDNA sentezi	28
2.2.9 Real-Time PCR	29
2.2.10 İstatistiksel analiz	31
3.BULGULAR	33
3.1 Fungusların Antimikrobiyal Aktiviteleri.....	33

İÇİDEKİLER (devamı)

Sayfa

3.2 Fungal Özütlerin Serbest Radikal Temizleme Aktiviteleri.....	33
3.3 RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	34
3.4 Real Time PCR için Metot Optimizasyonu	35
3.5 Real-Time PCR	37
3.5.1 Melting Point Grafikleri.....	38
3.5.2 Cq değerlerine göre analiz sonuçları.....	40
4. TARTIŞMA	43
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ.....	78

KISALTMALAR

ACP (Alternative Complement Pathway)	: Akternatif Tamamlayıcı Yolak
β-glucan	: Beta Glukan
BHT (Butylated hydroxytoluene)	: Butil Hidroksi Toluen
cDNA (Complementary DNA)	: Tamamlayıcı DNA
CL (Chemiluminescence Activity)	: Kemiluminesan Aktivitesi
COX-2 (Cyclooxygenase)	: Siklooksijenaz-2
CSR (Colony Stimulating Factor 1 Receptor) Reseptörü	: Koloni Uyarıcı Faktör 1
CT (Threshold Cycle)	: Eşik Dönüsü
Cq (Quantification Cycle Value)	: Miktar Döngüsü Değeri
DMSO (Dimethyl Sulfoxide)	: Dimetil Sülfoksit
DNA (Deoxyribonucleic Acid)	: Deoksiribo Nükleik Asit
DNP (Dinitrophenol)	: Dinitrofenol
dNTP (Deoxynucleotide)	: Di Nükleotid Trifosfat
DPPH (1,1-diphenyl-2 picrylhidrazi)	: Difenil-1-pikrihidrazil
dsRNA (Double strand RNA)	: Çift Sarmal RNA
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid)	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EF (Elongation Factor)	: Uzama Faktörü
FAO (Food and Agriculture Organization)	: Gıda ve Tarım Örgütü
FTS (Physiological Saline)	: Fizyolojik Tuzlu Su
GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase): Gliseraldehid 3 Fosfat Dehidrogenaz)	
IgM (Immunoglobulin M)	: İmmünoglobülin M
IL (Interleukin)	: İnterlökin
IL-1β (Interleukin 1β)	: İnterlökin 1 beta
INOS (Inducible Nitric Oxide Synthase)	: Uyarılabilir Nitrik Oksit entezi
IRF (Interferon Regulatory Factor)	: İnterferon Regülatör Faktör
ITS (Internal Transcribed Spacer)	: İç Transkripsiyonel Boşluk
LPS (Lipopolysaccharides)	: Bakteriyel Lipopolisakkarit

KISALTMALAR (devamı)

MDP (Muramyl Dipeptide)	: Muramil Dipeptit
MHC (Major Histocompatibility Complex)	: TemelDoku-uygunluğu Bileşeni
µl (Microliter)	: Mikrolitre
ml (Milliliter)	: Mililitre
mM	: Milimolar
NCA (Natural killer Cell Activity) Aktivitesi	: Doğal Öldürücü Hücre
NK (Natural Killer)	: Doğal Öldürücü
ORF (Open Reading Frame)	: Açık Okuma Çerçevesi
PAMP (Pathogen-associated Molecular Patterns): Kalıplar	: Patojen İlişkili Moleküler
PBS (Phosphate Buffered Saline)	: Fosfat Tampon Solüsyonu
PCR (Polimerase Chain Reaction)	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGE2 (Prostaglandins)	: Prostaglandin E2
PRR (Pattern Recognition Receptors)	: Kalıp Tanıma Reseptörleri
rDNA (Ribosomal DNA)	: Ribozomal DNA
RNA (Ribonucleic Acid)	: Ribo Nükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz
ROI (Reactive Oxygen Intermediates)	: Reaktif Oksijen Bileşenleri
RT-PCR (Real-Time PCR) Zincir Reaksiyonu	: Gerçek Zamanlı Polimeraz
TCR (T Cell Receptor)	: T Hücre Reseptör
TGF (Tumor Growth Factor)	: Tümör Büyüme Faktör
TLR (Toll Like Receptor)	: Toll Benzeri Reseptör
TNF (Tumor Necrosis Factor)	: Tümör Nekroz Faktör
TNFR (Tumor Necrosis Factor Reseptör)	: Tümör Nekroz Faktör Reseptör
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UTR (Untranslated Region)	: Çevrilmemiş Bölge

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Gökkuşığı alabalığı taksonomisi	3
Tablo 1.2: İmmünoştimülanlarla tedavi edilen balıklarda görülen önemli cevaplar.....	11
Tablo 2.1: Deneme dizaynı	22
Tablo 2.2: RT-PCR için kullanılan program.....	31
Tablo 3.1: Fungal özütlerin balık patojenlerine karşı disk difüzyon sonuçları.....	33
Tablo 3.2: Özütlerin serbest radikal temizleme aktiviteleri	34
Tablo 3.3: RNA izolasyonu yapılan örneklerin miktarları ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	35
Tablo 3.4: Real Time PCR optimizasyonunda denenen primerler.....	37
Tablo 3.5: Real Time PCR optimizasyonunda Beta-aktin denemesi	37
Tablo 3.6: Son çalışma için PRIMER 3 programında tasarlanan primerler.....	38
Tablo 3.7: Gen ekspresyon oranları ve ortalamaları	40
Tablo 3.8: Hedef genlerin ekspresyon değerlerinin hesaplanması.....	40

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1: Dünya’da 1970-2030 yılları arasında balık üretimi	2
Şekil 2.1: RT-PCR plate deneme dizaynı	29
Şekil 3.1: Real Time PCR optimizasyonunda hatalı amplifikasyon pikleri	36
Şekil 3.2: EF (1a), TNF- α (1b) ve IL-1 β (1c) genlerinin kontrol grubundaki melting point grafiği	39
Şekil 3.3: EF (2a), TNF- α (2b) ve IL-1 β (2c) metabolit verilen gruptaki melting point grafiği.....	39
Şekil 3.4: Hedef genlerin kontrol ve metabolit verilen gruptaki ifadeleri.....	41
Şekil 3.5: Metabolitin hedef gen ifadelerine olan farklı etkisi	41

**GÖKKUŞAĞI ALABALIĞINDA (*Oncorhynchus mykiss*)
ANTİMİKROBİYAL ETKİLİ FUNGAL METABOLİTLERİN TNF- α
ve IL-1 β GEN EXPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

ÖZET

Su ürünleri yetiştiriciliği dünyada en hızlı büyüyen hayvansal gıda üretim sektörüdür ve yetersiz beslenmenin ortadan kaldırılmasına yönelik küresel etkilerde önemli bir role sahiptir. Ayrıca, iyi beslenme önemli sağlık faydalarını getirir. Bununla birlikte su ürünleri yetiştiriciliği ve balıkçılık milyonlarca insana geçim kaynağı sağlamaktadır. Ancak bu hızlı büyümeye rağmen su ürünleri endüstrisi, sektörün sürdürülebilirliğini etkileyebilecek sağlık problemleri ile karşı karşıya bulunmaktadır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde karşılaşılan en yaygın problemlerin başında sağlık yönetimi eksikliği ve hastalıklar gelmektedir.

İmmunostimulantlar doğal veya sentetik bileşikler olup, patojenlerin neden olduğu hastalıklara karşı konakçının direncini arttırarak bağışıklık sistemini düzenlerler. Denizel funguslardan elde edilen sekonder metabolitlerin çok geniş spektrumlu biyoaktivite potansiyelleri bilinmektedir. Fungal metabolitlerin özellikle antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri son yıllarda büyük bir ilgiyle araştırılmakla birlikte, doğal immünostimülant olarak balıklarda kullanımı ile ilgili bilgiye rastlanmamıştır.

Bu araştırmada, Ege denizinden toplanan süngerlerden izole edilen fungal suşlarda yapılan taramalar sonucunda en yüksek antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteyi gösteren fungus (*Penicilium atrovenetum*) seçilerek özütlenen metabolitleri potansiyel immünostimülant madde olarak kullanılmıştır.

Fungustan elde edilen özütün gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kanında immum sistem ile ilişkili TNF- α ve IL-1 β gen ekspresyonlarına etkileri incelenmiştir. Gen ekspresyonları için kandan izole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezlenerek Real-Time PCR aracılığıyla analizler yapılmıştır. Her PCR döngüsü sonunda tüp içinde oluşan çift zincirli ürün miktarının ölçülebilmesini ve kantitatif analizlerin yapılmasını sağlar. Çalışma sonunda PBS ile dilue edilen *P. atrovenetum* özütünün 40 mg/kg konsantrasyonda gökkuşağı balıklarına karın içine enjeksiyon yapıldığında TNF- α ve IL-1 β genlerinin ekspresyonları üzerine etkisi olduğu anlaşılmıştır. Real Time sonuçlarına göre, özütün TNF- α gen ekspresyonunu 36 kat arttırırken, IL-1 β geninde 11 kat artış sağladığı tespit edilmiştir.

**EFFECTS OF FUNGAL METABOLITES WITH ANTIMICROBIAL
ACTIVITY ON TNF- α AND IL-1 β GENE EXPRESSION IN RAINBOW
TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)**

SUMMARY

Aquaculture is the fastest growing animal production sector in the world and plays an important role in global efforts towards eliminating malnutrition and brings significant health benefits by nutritional well-being. Despite its increasing growth, the aquaculture industry still faces some problems, particularly diseases, which can affect its sustainability. Also, the heavy use of antibiotics may result in food and environmental pollutions and development of antibiotic resistant pathogens.

Immünostimülans can increase resistance to infectious diseases, not by promoting specific immune responses, but by enhancing nonspecific defense mechanisms. Therefore, many substances from different sources (bacterial, chemical agents, animal or plant extracts, etc) have been studied as prospective immünostimülans for fish, and some have been reported to give a significant degree of protection against several diseases commonly found in farmed fish. Recent years, researchers have considered the potential of marine microorganisms as an alternative source for isolation of new metabolites with different chemical structures and pharmaceutical properties. Marine fungi from sea sponges have been also recognized as an important resource for effective bioactive compounds.

In this study, immune-modulating effect of selected fungal metabolites on the rainbow trout innate immune system was analyzed by looking at the gene expression profiles of TNF- α and IL-1 β . To do this we performed Real Time PCR using cDNA that was converted from RNA isolated from blood. Q-PCR allows us to measure double stranded cDNA quantitatively after each PCR cycle. At the end of the study, we found that when rainbow trouts were injected with extracts of *P. antrovenetum* in the concentration of 40 mg/kg, the expression of TNF- α and IL-1 β increased 36 fold and 11 fold, respectively.

1. GİRİŞ

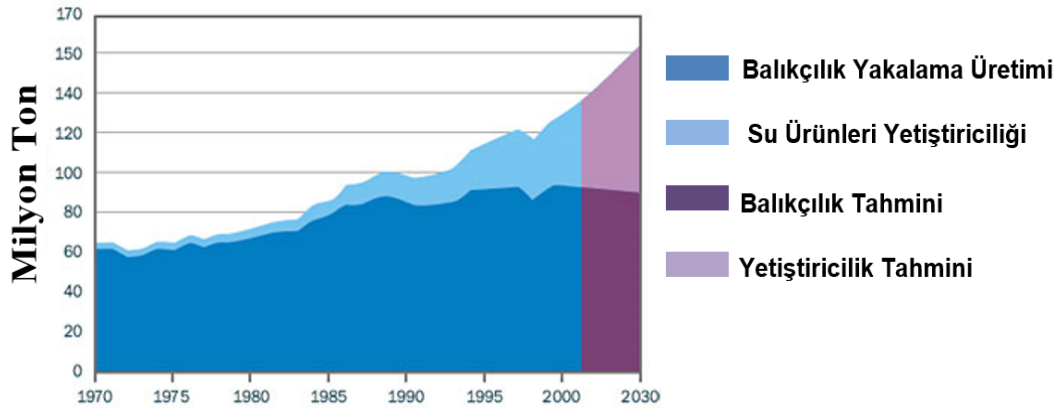
İmmün düzenleyici olarak kullanılan uyarıcıların balıklarda doğal bağışıklıktan sorumlu bazı genlerin ifadesinde oynadığı uyarıcı rolünün Real-Time PCR (RT-PCR) teknikleriyle ortaya konulması son yıllarda sıklıkla araştırılan önemli bir konu olmuştur. Bu tez kapsamında denizde süngerlerle birlikte yaşayan fungal suçlardan elde edilen ve antimikrobiyal/antioksidan özellik gösteren özütlerinin gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) immünoestimülant olarak kullanım potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır. Yüksek antibakteriyel ve antioksidan aktiviteyi birlikte barındıran fungal özütlerin immünoestimülant etkilerini araştırmada RT-PCR tekniğinin kullanılması ve metodun uyarlanarak geliştirilmesi ise ayrıca teknoloji transferi ve know-how potansiyeli sunmaktadır. Akuakültürde kullanılabilir doğal ve yeni immünoestimülant bileşikler keşfetmek, bunları ülke kaynaklarından elde etmek, kimyasal immünoestimulanlar yerine doğal ürün potansiyeli olan kaynakları keşfetmek ve sucul çevreyi korumak yanında ekolojik tarıma katkı sağlamak ve en nihayetinde; doğal immünoestimulanlar ile balık sağlığının korunmasına ve sürdürülebilir akuakültürün gelişmesine önemli katkılar sunmak bu tezin amaçları arasında sayılabilir.

1.1 Genel Bilgiler

Günümüzde, insanlar beslenmelerine daha fazla dikkat etmekte ve beslenme alışkanlıklarına göre sağlıklı olan gıdaları seçmede titizlik göstermektedirler. Bu gıdalar içerisinde ilk sırada çoklu doymamış yağ asitleri açısından zengin olan balık ve diğer su ürünleri gelmektedir. Balık eti besleyici yönü oldukça yüksek ve sağlıklı beslenme için çok önemli bir gıda kaynağıdır (Kaya ve diğ., 2004). Balık eti, protein kalitesi ve besin miktarı açısından mükemmel bir gıda maddesidir (Karabulut ve Yandı, 2006). Nüfustaki artış, doğal stoklardaki düşüş ve eğitim düzeyinin artması ile birlikte balıkların en sağlıklı protein kaynağı olduğunun ortaya çıkması akuakültürü daha önemli hale getirmiştir (Çelikkale ve diğ., 1999).

Dünya genelinde, su ürünleri üretimi ve ticaret hacminde temel olarak 58 ülke faaliyet göstermektedir. 2010 yılında su ürünleri toplam üretimi 148 milyon ton olup yaklaşık değeri 217.5 milyar doları bulmuştur ve bu üretimin 128 milyon tonu gıda olarak tüketilmiştir. 2011 verilerine göre, üretim miktarı 154 milyon tona artarken, bu üretimin 131 milyon tonu gıda olarak tüketilmiştir. Su ürünleri üretimindeki bu sürekli büyüme ve artışla birlikte kişi başına düşen su ürünleri miktarı 1960'larda 9.9 kg iken 2010 istatistiklerine göre bu sayı 18,6 kg'a yükselmiştir (FAO, 2012). FAO tarafından dünyada en hızlı büyüyen gıda sektörü su ürünleri yetiştiriciliği olarak bildirilmiştir (Vannuccini, 2004).

Geleceğe yönelik beklentilerde su ürünlerine olan talebin 2030 yılına kadar 160 milyon tona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Avcılık yoluyla sadece 80-90 milyon ton ihtiyaç karşılanabilmektedir. Mevcut üretim ve kişi başına tüketim böyle devam ederse dünya genelinde yaklaşık 20-30 milyon ton bir açık oluşacağı tahmin edilmektedir (FAO, 2012). Türkiye' de su ürünleri sektörü, 1984 yılından itibaren ortalama yıllık %11 ve üzerinde büyüme kaydederek, gıda ürünleri arasında en hızlı artış ve gelişim sağlayan sektör haline gelmiştir (Yazıcıoğlu, 2015).



Şekil 1.1: Dünya'da 1970-2030 yılları arasında balık üretimi

Ülkemizde balık yetiştiriciliğine bakıldığında, özellikle gökkuşuğu alabalığı yetiştiriciliği önemli bir yere sahiptir (Yılmaz ve diğ., 2008). Yetiştirilen türler içerisinde ilk sırayı alabalık almaktadır (%52.52) ve üretimin %55.7'si iç sularda yapılmaktadır (Albayrak ve Özkan, 2010; İnan ve Pınarkara, 2013).

Gökkuşığı alabalığının ülkemiz koşullarında yetiştiricilik potansiyelinin oldukça fazla olması ve et kalitesinin çeşitli işleme teknolojilerine uyarlanmasındaki kolaylıklar nedeniyle, farklı damak tadına sahip ürünler elde edilmesi mümkündür (Ünal, 1995; Gökoğlu, 2002).

Tablo 1.1: Gökkuşığı Alabalığı Taksonomisi (Behnke, 2002).

Kingdom	Animalia
Phylum	Chordata
Class	Actinopterygii
Order	Salmoniformes
Family	Salmonidae
Genus	Oncorhynchus
Species	<i>Oncorhynchus mykiss</i>

Son yıllarda dünya genelinde görülen gelişmelere benzer şekilde, ülkemizde de doğal stoklardaki düşüş ve avcılıktaki iniş-çıkışlar kültür balıkçılığında artışı zorunlu hale getirmiştir. Ürün artışıyla beraber maliyetlerin düşürülmesi, verimin artırılması, çevrenin ve balık sağlığının korunması maksadıyla yürütülen çalışmalara hız kazandırılmıştır (Türe ve Savaş, 2010).

Bununla birlikte, yakın zamanda yapılan araştırmalar hızlı gelişim gösteren kültür balıkçılığının beraberinde bazı sorunları da ortaya çıkardığını göstermiştir. Dikkatsizce kullanılan ilaçlar ve kimyasal maddelere ek olarak atıkların usulüne uygun berteraf edilememesinden dolayı çevre kirliliği gibi sorunların dışında dirençli patojenlerin gelişimini ve yeni hastalık problemlerini beraberinde getirmektedir. Kültür balıkçılığında enfeksiyöz (bakteri, virus, mantar ve parazit gibi) ve enfeksiyöz olmayan (nonenfeksiyöz) su kalitesi, O₂ yetersizliği ve amonyak gibi problemler ciddi balık ölümlerine neden olmaktadır. Bu kayıpların oluşması beraberinde belli teşhis ve tedavi masrafları ortaya çıkararak, işletme verimliliğini sekteye uğratmaktadır ve sektörün ülke ekonomisine katkısını azaltmaktadır (Türe ve Savaş, 2010). Kültür balıklarındaki bu büyük riskin yanında spesifik patojenlere karşı balığın direncinin artırılmasına rağmen, diğer patojenlerden gerekli şekilde koruma sağlanamamaktadır. Buna karşın, balığın doğal bağışıklığının geliştirilmesi ile geniş spektrumlu direnç sağlanabilir (Gopalakannan ve Arul, 2006).

1.2 Balıklarda Bağışıklık Sistemi

Memelilerin doğal savunma mekanizması hakkında birçok bilgi mevcuttur. Bu bilgiler, diğer omurgalılarla karşılaştırıldığında hem anatomik hem de fonksiyonel yönden genel olarak benzemekle birlikte son yıllarda yapılan çalışmalara göre balıklarda farklı olduğu yönündedir (Dalmo ve diğ, 1997; Buonocore ve diğ, 2007).

Balıklarda bağışıklık sistemi, vücudun enfeksiyona karşı cevap oluşturmasında ve enfeksiyonun ortaya çıkmasını engelleyen faktörlerin çoğunu kapsar (Aoki, 1992). İmmün sistemin temel fonksiyonu, hastalıklara neden olan mikroorganizmalara karşı canlıyı korumaktır. Balıklardaki immün sistemin değişik yönleri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Watts ve diğ, 2001). İmmün sistem hücresel ve humoral faktörleri içeren, hem spesifik hem de spesifik olmayan savunma sistemlerinden oluşur. Spesifik olmayan savunma sistemi balıkların bir parçasıdır ve yanıt gelişimi için, bir antijen/patojen ile önceden temasa gerek yoktur (Ellis, 1988; Yano, 1996; Vadstein, 1997).

Balıklar, patojenlerin istilasına karşı kendilerini korumak için hem spesifik hem de spesifik olmayan mekanizmaları kullanırlar. Balıkların birincil non-spesifik savunma sistemleri, deri ve mukustur. Patojenler vücuda girdiği zaman, hücresel ve humoral savunma sistemleri devreye girer. Fagositoz balıklarda; bakteriler, virüsler, parazitler de dahil olmak üzere patojenlere karşı spesifik olmayan bağışıklığın temel araçlarından biridir. Bu savunma olayına karışı en önemli hücreler fagositlerdir (Dalmo ve diğ, 1997; Verlhac ve Gabaudan, 1999; Yano, 1996). Levreğin (*Dicentrarchus labrax*) böbrek hücrelerinde, patojenik bakteri (*Aeromonas salmonicida*) ve mantar (*Candida albicans*) ajanları tarafından uyarıldıktan sonra immün sistemi fagositik aktivite gerçekleştirmektedir (Savina ve Amigorena, 2007). Gökkuşluğu alabalıklarında, *Y. ruckeri* enjeksiyonu sonrasında çok hızlı bir yangısal reaksiyon başladığı ve yangı bölgesine fazla miktarda fagositik hücre göçü olduğu gösterilmiştir (Evans, 1998). Ayrıca, balıklardaki mukusun içerisinde bulunan IgM (immüoglobülin M) ve antibiyotik özellikteki bazı maddeler epidermis ve dermisdeki salgı hücreleri tarafından salgılanmaktadır (Kearn, 1976). İmmün organ ve hücreler çoğunlukla aynı yapı ve işlevi gösterir. Fakat sıcakkanlıların aksine balıkların bağışıklık sistemi içinde yaşadığı sucül ortamda ortaya çıkan sıcaklık, pH, tuzluluk, çözülmüş O₂ miktarları gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerden etkilenmektedir (Magnadottir, 2006). Doğal ve edinsel immünite olmak üzere iki tip

bağışıklık vardır. Doğal immünite, sistemin doğuştan kendinden olmayanı tanıyarak ve tehlike sinyallerini algılayarak, hastalığa neden olan patojenin protein yapılarından kurtulmak için harekete geçirdiği mekanizmadır. Doğal immünitenin bütün mekanizmaları, mikropları tanıyabilir ve tepki gösterirler, ancak enfeksiyona yol açmayan yabancı maddelere karşı herhangi bir tepki vermezler (Arda ve diğ., 2002). Antibakteriyel peptitler, lizozim, transferin, prostaglandinler (PGE2), sitokinler, kemokinler, lektinler ve toll-like reseptörleri (TLR) doğuştan immün cevap oluşturan bazı molekülüdür (Randelli ve diğ., 2008).

Edinsel immünitenin hücreleri (lenfositler) ise mikropların üretmiş olduğu farklı maddeleri ve enfeksiyon oluşturmeyen molekülleri de tanıyan reseptörler taşırlar. Edinsel immün yanıtlar, farklı tipteki mikroplara karşı korunmak için özel mekanizmalar oluşturur. Örneğin; antikorlar hücrenin dışında, T lenfositler ise hücre içerisinde yaşayan mikropları yok ederler. Günümüze kadar balıklarda farklı edinsel immünite parametreleri tespit edilmiştir (Magnadottir, 2006). Hüморal ve hücreyel immünite olarak adlandırılan iki tip edinsel immünite vardır (Abbas ve Lichtman, 2007). Hüморal immünite, B lenfositlerin ürettiği antikor proteinler tarafından oluşturulur ve hücre dışı mikrobik antijenleri tanır (Magnadottir ve diğ., 2005). Hücreyel immünite ise T lenfositler aracılığıyla hücre içerisinde gerçekleşir ve hücre içerisine yutulan mikropların ürettiği antijenleri tanırlar. İmmün sistemin en az bir milyar farklı antijeni ve antijen parçalarını birbirlerinden ayırt edebilme yeteneği mevcuttur (Akaylı, 2001).

1.2.1 Bağışıklık sisteminin regülatörleri: Sitokinler, İnterlökinler

Sitokinler küçük moleküler ağırlıklı proteinler olup, interlökin (IL), kemokin, monokin ve büyüme faktörlerini içerir (Watanuki ve diğ., 2009). Bu proteinler arasındaki IL-1 β , TNF- α , IL-8 ve tip I-IFN, doğal bağışıklık sistemine çok önemli ölçüde hizmet eder. Sitokinler, immün cevaplarda ve inflamatuvar işlemlerde önemli bir rol oynar (Sethi ve Hotamisligil, 1999). Aynı zamanda, inflamatuvar sürecin düzenlenmesinde ve başlatılmasında önemli bir role sahiptir (Aoki ve diğ., 2008). Hem IL-1 β hem de TNF- α , inflamatuvar yanıtı kolaylaştıran aynı zamanda azalmasında görev alan sitokinlerdir. TNF- α çeşitli hücreyel yanıtlarda, hücre çoğalmasında, diğer sitokinlerin farklılaşmasında ve indüksiyon dahil olmak üzere önemli iken, IL-1 β mikrobiyal işgale karşı aracılık eder, otoimmün hastalıklar da

dahil olmak üzere doku hasarı ve immünolojik reaksiyonlar için yanıt olarak önemli bir rol oynar (Wei ve diğ, 2009).

İmmün cevapta düzenleyici olarak bulunan balık sitokinleri çok az çalışılmıştır. Sitokinlerin önemli bir çoğunluğu teleostlarda (kemikli balıklar) aktiftir (Secombes, 1996). Ancak memelilere kıyasla çok az veri mevcuttur (Holland ve diğ, 2002). Sitokin sinyallenmesi hücreler arası iletişim için gereklidir. Bunun yanında, birçok hücre tipinin aktivitesinin düzenlenmesinde, immün ve inflamatuvar süreçlerin kontrolünde aynı zamanda da doğal ve bağışıklık immün cevapların oluşumunu sağlar. Antijenik uyarımdan sonra, sitokin düzeylerindeki artış efektör hücrelerinin aktivasyonu, B ve T hücre gelişim ve farklılaşması, inflamasyon gibi birçok işlemlere aracılık eder (Rogatsky ve Ivashkiv, 2006).

İnterlökinler ise immün sistemin hücre içi regülasyonunu içeren sitokinlerin bir alt grubudur. 1977’de IL-1’in keşfedilmesinden önce 40’dan fazla sitokin IL olarak tayin edilmiştir (Akdis ve diğ, 2011). İnterferonlar (IFN’ler), omurgalıların virüs enfeksiyonuna karşı savunmasında önemli bir rol oynar ve hücrelerde antiviral bir durum sebep olduğunda salgılanır (Samuel, 2001). IFN ilk olarak, ısı ile inaktive influenza virüsü ile tedaviden sonra civciv hücreleri tarafından salınan bir antiviral madde olarak Isaacs ve Lindenmann tarafından seçildi ve keşfedilmiş oldu (Isaacs ve Lindenmann, 1957). İlk IFN, insanda 1980 yılında IFN-a ve IFN-b olarak klonlandı (Taniguchi ve diğ, 1980). IFN benzeri aktivite balıkta en erken 1967 yılında tanımlandı. Ayrıca, double-stranded RNA (dsRNA) tedavisi ile birlikte ya da viral enfeksiyondan sonra balık türlerinin birçoğunun organ ve hücrelerinde ortaya çıkarıldı (Graham ve Secombes, 1990).

IFN’nin iki ailesi (Tip I, Tip II) protein yapıları, gen sekansları ve fonksiyonel sekansların temeli üzerine ayırt edilmiştir (Pestka ve diğ, 2004). Tip I IFN’lar, klasik IFN- α / β ’ları içerir. Birçok virüs tarafından hücrenin indüklenme şeklidir. Oysa, tip II IFN, IFN-g ile aynıdır. Aynı zamanda IL-18, mitojenler, antijenler ve interlökin-12 (IL-12)’ye tepki olarak doğal öldürücü hücreler (NK hücreleri) ve T lenfositler tarafından üretilir (Vilcek ve Sen, 1996; Samuel, 2001). Balıklarda, interferon aktivitesiyle moleküller üretildiği bilinir (De Kinkelin ve Dorson, 1982). Diğer sitokinler ve düzenleyici moleküller, birçok interlökin içeren balıklarda rapor edilmiştir. Bunlar; (IL-6, IL-8, IL-10, IL-12) ve Tumor Growth Factor (TGF)- β , ve interferon regulatory factor (IRF)-1’dir (Zou ve diğ, 2003; Collet ve diğ, 2003). Buna

göre, ilgili sitokinler omurgalılarda korunmuştur ve bu moleküllerin birçoğunun bütün hayvan gruplarında benzer roller gösterdiği anlaşılmaktadır (Tort ve Balasch, 2003).

1.2.1.1 TNF- α , IL-1 β

İmmün cevabın genel indikatörleri olan TNF- α , IL-1 β ; iki önemli proinflamatuvar sitokindir. Ayrıca, ifade düzeyleri genellikle inflamatuvar bir yanıt olup olmadığının bir göstergesi olarak kabul edilir (Secombes, 2008; Secombes ve diğ., 2001).

İnterlökin-1 (IL-1) ailesinin dört üyeye sahip olduğu bulunmuştur. Bunlar; IL-1 α , IL-1 β , IL-1 reseptör antagonisti (IL-1ra) ve IL-18'dir (Dinarello, 1997). IL-1 α , IL-1 β %23 aminoasit benzerliği gösterir. Her ikisi de bir sinyal peptidi olmadan öncül moleküller için üretilebilir (Vigers ve diğ., 1997). İnterlökin-1 β , temel olarak makrofajlar tarafından üretilen, kemikli balıklar ve kıkırdaklı balıkların yanısıra kuşlar da dahil olmak üzere farklı hayvan grupları olan amfibiler ve memelilerde de karakterize edilmiştir (Secombes ve diğ., 2001). Mikrobiyal saldırıya karşı cevaplarda ve doku yaralanmasında önemli bir arabulucudur. Aynı zamanda, makrofajlar, NK hücreleri ve lenfositleri aktif hale getirerek diğer sitokinlerin salınmasını teşvik edebilir ya da aktive lenfositler tarafından immün cevabı uyarabilir (Zou ve diğ., 1999; Low ve diğ., 2003). İnterlökin-1 β , enfeksiyona bağlı cevaplarda inflamasyonun önemli bir düzenleyicisidir (Holland ve diğ., 2002). IL-1 β , erken ifade olan proinflamatuvar sitokinlerden biridir ve organizmada, enflamasyona yol açan reaksiyonların biyokimyasal tepkime dizisi olan kaskadları uyararak enfeksiyona hızlı cevap sağlar (Huisinç ve diğ., 2004). Bunun yanında, çeşitli hücre tipleri tarafından üretilir. Bunlar, monositler, makrofajlar, T ve B lenfositler, fibroblastlar, epidermal ve epiteliyal hücreler tarafından üretilir (Oppenheim ve diğ., 1986).

Memeli olmayan canlılardan elde edilen ilk IL-1 β , gökkuşuğu alabalığı IL-1 β 'nın tamamen kodlanan bölgelerinden sekanslanmıştır (Secombes ve diğ., 1997; Zou ve diğ., 1998). IL-1 β 'nin cDNA'sı 97 bp'lik 5' kısa bir UTR ve 466 bp'lik 3' UTR olmak üzere, 780 baz çiftlik ORF'ye sahiptir. Bu sonuçlar, genin ikincil yapısı içerisinde benzerlik göstermekle birlikte aynı zamanda tahmin edilen amino asit sekansının memeli IL-1 β 'ların aminoasit benzerliğine oranının % 49-56 arasında olduğunu göstermiştir (Lennard, 1995). Gökkuşuğu alabalığında IL-1 β geni, altı

ekzon ve beş introndan meydana gelir. Memelilerde bu oran yedi ekzona altı intron şeklindedir (Eisenberg ve diğ, 1991). IL-1 β intronları memelilerden daha kısadır (Zou ve diğ, 1999).

Tümör nekroz faktörü (TNF), normal ya da patolojik durumlar altında birçok enflamatuar ve immunolojik yanıtlarda önemli bir rol oynar. TNF; makrofajlar, monositler, lenfositler, mast hücreleri, astrositler ve memelilerde tümör hücreleri gibi çok çeşitli hücre tipleri tarafından üretilir (Vassalli, 1992). Lipopolisakarit (LPS) ile uyarılan aktive makrofajlar, TNF- α 'nın en büyük kaynağıdır. (Aggarwal ve Natarajan, 1996).

Balıklarda, TNF için klonlanmayla belirlenmiş ilk gen Japon dil balığında (*Paralychthys olivaceus*) bulunmuştur (Hirono ve diğ, 2000). Buna ilave olarak, gökkuşağı alabalığı mRNA'sında TNF- α ile karakterize edilmiş ve bildirilmiştir (Laing ve diğ, 2001). Zou ve diğ. (2002) yılı çalışmalarında ise, iki farklı TNF'nin mevcut olduğunu kanıtlamışlardır. Bunlar TNF-1 ve TNF-2'dir. Önce TNF-2 sonra TNF-1 karakterize edilmiştir (Bobe ve Goetz, 2001; Laing ve diğ, 2001).

TNF- α , bir anti-tümör ajan olarak belirlenen çeşitli biyolojik etkileri olan bir pro-inflamatuar sitokindir (Michaelson ve diğ, 2000). TNF- α 'nın yerel üretimi, yerel enfeksiyonları kontrol altına alma ve ortadan kaldırılmasında önemli bir rol alır (Ross ve diğ, 1985). Ancak serbest bırakılan TNF- α sistemik olarak, septik şokla ilgili bağlantılardan sorumludur (Di Carlo ve Fiore, 1958). TNF- α 'nın ifadesi bu nedenle, transkripsiyonel, post-translasyonel ve translasyonel düzeyde sıkı bir şekilde düzenlenir (Michaelson ve diğ, 2000). LPS gibi uyarılara karşı monositler ve makrofajlar, TNF- α 'yı serbest bırakır. T hücreleri tarafından, TNF- α salınımı, T hücre reseptör aktivasyonu tarafından başlatılır. TNF- α 'nın çeşitli etkileri, iki reseptör olan TNFR1 ve TNFR2 tarafından gerçekleşir (Michaelson ve diğ, 2000). Sitokin üretiminde artış, makrofajlar üzerinde TNF- α 'nın etkisini içerir aynı zamanda anitimikrobiyal ve fagositik aktiviteyi artırır. Endotel hücreleri, TNF- α 'ya cevapta lökosit adezyon moleküllerini düzenler. Ayrıca TNF- α , hücre proliferasyonu, farklılaşması ve ölümüne de katılmaktadır (Di Carlo ve Fiore, 1958). TNF- α 'nın anti-tümör etkisi; tümör kan damarlarının zararı ve vücudun tümöre karşı immün yanıtları aktivasyonunda bulunduğu, tümör hücrelerine karşı doğrudan sitotoksikite kaynaklı olduğu ileri sürülmüştür (Michaelson ve diğ, 2000).

TNF- α çeşitli balık türlerinde klonlanmıştır (Garcia-Castillo ve diğ, 2002). Ayrıca, TNF'nin, protein aktivitesi gibi apoptozu teşvik ettiği de gösterilmiştir (Qin ve diğ, 2001). Bununla birlikte, balıklarda yapılan bazı çalışmalarda immun endokrin etkileşimleri arasında TNF'nin önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir (Lister ve van de Kraak, 2002). Bağışıklık sisteminin yanısıra, balıkta TNF'nin biyolojik aktiviteleri ile ilgili çalışmalar hala yetersizdir.

1.3 İmmünostimülan Maddeler

İmmünostimulanlar, bağışıklık sistemini harekete geçirerek kuvvetlendiren, sentetik veya doğal bazlı maddelerdir. Bu bağışıklık uyarıcılar, spesifik olmayan savunma mekanizmalarını veya spesifik immün cevabı yükselten bir kimyasal madde, ilaç veya bitki yada bitkisel mamuller olarak nitelendirilebilir. Balık hastalıklarının kontrolü ve kültür balıkçılığında immünostimülanların kullanımı önemlidir. İmmünostimülan olarak bakteriyel bileşikler, kimyasal ajanlar, polisakkaritler, bitkisel veya hayvansal ekstraktlar, besleyici maddeler ve sitokinler örnek olarak verilebilir. Birçok immünostimülant madde, doğal öldürücü (NK) hücreleri, lizozim ve balıklarda antikor oluşumunu uyarabilir (Anderson ve Jeney, 1992b). İmmünostimülan, patojenlerin yıkımında da kullanılabilir. Bunları da, bazı enzimlerin üretiminde hücreleri aktive eden fagosit ve lenfositlerin hücre yüzeylerinde bulunan spesifik reseptörlere bağlanarak gerçekleştirir. Bunun yanında immünostimülanlar, bazı kimyasal taşıyıcılar olan interferon, interlekinler ve kompleman proteinlerin üretimini de artırır. Sonrasında bu taşıyıcılarda bağışıklık sisteminin diğer bireylerini uyararak T ve B lenfositlerin aktivitesinin artmasını sağlar (Kitao ve Yoshida, 1986).

Balıkları birçok hastalıklardan korumak ve ölüm oranını azaltmak için immünostimülanlar kullanılsa da bütün hastalıklara karşı korunma sağlanamaz (Altınterim, 2011). Bağışıklık sistemini güçlendirmek, koruyucu önlemlerin en önemlisidir (Aoki, 1992). Ayrıca, akuakültürde hastalıkların tedavisinde maliyeti düşürmekte, daha kaliteli ürünlerin elde edilmesini sağlamaktadır. İmmünostimülanlar, adjuvanlar (yardımcı maddeler) ve aşılarda balık kültürlerinde özellikle hastalık kayıpları için eşsiz bir yaklaşımdır (Douglas, 1992). Aşılarda, su ürünleri yetiştiriciliğinde etkili olan profilaktik bir yöntemdir. Ancak, balıklarda

yüksek maliyetinin olması ve stres oluşturmaları gibi dezavantajları vardır (Wang ve diğ, 2010).

Balık yetiştiriciliğinde sınırlı veya zor uygulamalar yerine patojenlere karşı daha iyi profilaktik ve terapötik önlemler tercih edilmektedir. Bu nedenle alternatif tekniklere ve uygulamalara ihtiyaç duyulmakta, bu yöndeki araştırma sayılarının da son yıllarda arttığı görülmektedir (Sakai, 1999). Akaukültürde ve özellikle balık yetiştiriciliğinde hastalıkların önlenmesi ve kontrolünde en umut verici yöntemlerden biri, balık immün sistemini güçlendirici etkisi olan immüностimülanların kullanılmasıdır (Sakai, 1999). Bağışıklığı uyarıcı maddenin, aşılamadaki bağışıklık sisteminin henüz tam gelişmediği ve hastalık gelişimine karşı koruyuculuk sağlamadığı durumdan farklı bir etki mekanizması vardır. Aşılama iyi bir koruma sağlar, ancak etkisi belirli sürelerle sınırlıdır (Bednarska ve diğ, 2007).

Canlıyı stres altında bırakan ve fiziksel metabolizmasını bozan sıcaklık ve diğer çevresel değişiklikler ile birlikte larvalardaki yem geçişleri, boylama ve benzeri gibi evrelerde parazit ve patojenik mikroorganizmalarının etkisi artış gösterir. Bu dönemler bağışıklığın güçlü olması gerekmektedir. Bu nedenle, gelişim evrelerinde enfeksiyonlara karşı oldukça hassas olan canlılarda (karides ve deniz balığı larva dönemi, cinsel olgunlaşma dönemi vb.) immüностimülanlar kullanılabilir (Magnadottir, 2006).

İmmüностimülanların belirlenmiş çok çeşitli faydaları mevcuttur (Magnadottir, 2006). Bunlardan bazıları;

- Canlıların genel performansını artırıcı ve enfeksiyon kaynaklı ölüm oranlarını azaltıcı etkiye sahiptir.
- Patojenlerden kaynaklanan ölüm yüzdesinde düşürücü etki sağlar.
- Virüslerden kaynaklanan hastalıkları önler.
- Parazitlere ve hastalıklara karşı direnci yükseltir.
- Yavru balıklarda ölüm oranını azaltır.
- Antibiyotiklerle birlikte tedavi etme etkisini artırıcı gibi çeşitli yararları bulunmaktadır.

Fakat immünoestimulanların tek başına tedavi edici etkisi bulunmaz. Bu bileşikler temelde koruyucu olarak canlının genel savunma sistemini güçlendirir ve sonrasında da hastalık riskini azaltmak için kullanılır.

Tablo 1.2: İmmünoestimulanlarla tedavi edilen balıklarda görülen önemli cevaplar (Bricknell, 2005).

İn Vivo Etkiler	İn Vitro Etkiler
Bakterilere karşı çıkarak hayatta kalmayı artırır. Deniz bitinin düşük yerleşimini içeren anti-parazitik etkiler, Artan interferon düzeylerine ve viral enfeksiyona karşı direnci geliştirir. Büyüme, Aşırı takiben artan antibiyotik gelişimi, Artan lizozim düzeyleri,	Artan makrofaj aktivitesini içerenler, • Fagositozis, • Serbest radikal üretimi, • Enzim aktivitesi, • Göç aktivitesi, • Sitokinlerin üretimi, • NO üretimi, • Bakteriye ölüm. Artan sitotoksinite, Artan lizozim aktivitesi, Artan sitokin indüksiyonu, Artan oksijen radikal indüksiyonu, Artan hücre çoğalması.

Konakçıya veya vücuda yabancılık, stabilite, kimyasal ve yapısal karmaşıklık, vücuda verilmiş yolu ve immünojenin miktarı bağışıklık uyarıcılarda olması gereken özelliklerden bazılarıdır (Abbas ve Lichtman, 2007). Balıklarda immünoestimulanlar vücuda verilmiş biçimlerine göre; yeme karıştırarak ağız yoluyla, suya karıştırarak banyo şeklinde, enjeksiyon ya da balığın vücuduna sürme şeklinde farklılıklar gösterir (Altınterim, 2011). Balıklarda uygulama dozu ve yönteminin uyarıcı maddenin fonksiyonunda çok önemli olduğu belirtilmiştir (Sakai, 1999). Bunların haricinde, immünoestimulanın etkinliğine yaş, immünolojik durum ve türler arasındaki farklılık da yansımaktadır (Mulero ve diğ., 1998).

1.3.1 Balıklarda kullanılan immünoestimulanlar

Sakai (1999)'nin yapmış olduğu deneyde; gökkuşuğu alabalığının solungaçlarına yapışarak balıklarda solunum güçlüğü ve ölüme sebep olan *Loma salmonae*'e karşı β -1,3 ve β -1,6 glukon maddelerinin etkisini araştırmış ve periton içi enjeksiyon ile verilen immünoestimulanların balığın bu patojene karşı bağışıklık sisteminin güçlüğünü ortaya çıkarmıştır.

Siwicki ve diğ. (1989)'da, gökkuşuğu alabalığında oksolinik asit (0, 1, 10 mg/kg), oksitetrasiklin (10 mg/kg), levamisol (5 mg/kg) ve *Yersinia ruckeri* O-antijen (100 µg) uygulamasının spesifik ve spesifik olmayan immün yanıt etkilerini araştırmışlardır. Levamisol verilen grupta diğerlerine göre uyarılmış spesifik olmayan savunmanın fazla olduğunu, oksolinik asit verilen grupta, spesifik immün yanıtın yüksek olduğunu, oksitetrasiklin uygulanan grupta ise her iki immün yanıtın düşük olduğunu belirlemişlerdir.

Kajita ve diğ. (1990)'da, gökkuşuğu alabalığına uyguladıkları levamisolün fagositik aktivite, kemiluminesens yanıt (CL) ve doğal öldürücü hücre aktivitesi (natural killer cell activity, NCA) ile *Vibrio anguillarum*'a karşı oluşan serum bakterisidal aktivitesi ve alternatif kompleman aktivasyonu yolağına (ACP) olan etkisini araştırmışlardır. Levamisol uygulandıktan sonra balıklarda fagositik aktivite kemiluminesens cevap, doğal öldürücü hücre aktivitesi ve alternatif yoldan kompleman aktivasyonunda artış olduğunu, fakat serum bakterisidal aktivitesinde ise değişiklik olmadığını saptamışlardır.

Siwicki ve diğ. (1990)'da, gökkuşuğu alabalığının dalak kesitlerine in-vitro olarak uygulanan üç farklı levamisol dozunun (5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml) kombine olarak iki farklı *Y.ruckeri* O-antijen dozu (10 µg/dalak ve 100 µg/dalak) ve 100 µg DNP-Ficoll (dinitrophenol-Ficoll) verilmesi sonucunda, spesifik ve spesifik olmayan savunmayı arttıran en etkili levamisol dozunun 5 µg/ml olduğunu ve bu antijenlerin tek başlarına spesifik olmayan savunmayı uyardıklarını, 50 µg/ml ve 25 µg/ml levamisol seviyelerinin antijenle kombine uygulanmasının ise sinerjistik bir etki oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Günümüzde su ürünleri yetiştiriciliğinde, çok farklı immünoestimülant maddeler kullanılmakta ve halen bu konudaki çalışmalar devam etmektedir (Sakai, 1999). Ancak, ulaşabildiğimiz bilgiler içinde fungal metabolitlerin immünoestimülant olarak balıklarda uygulandığı bir denemeye rastlanmamıştır. Bu tez çalışması kapsamında Ege kıyılarından toplanan süngerlerden izole edilen bir fungal özütün immünoestimülant etkisi alabalığın immün sistemle ilişkili genleri seviyesinde araştırılmıştır.

1.4 Sekonder Metabolitler

Metabolik faaliyetler sonucu canlılarda oluşan ürünlere metabolit adı verilir. Büyüme, gelişme ve çoğalma için ihtiyaç olan maddeler primer metabolit adını alırken, logaritmik fazın sonunda üretilen, düşük molekül ağırlıklığına sahip doğal bileşiklere ise sekonder metabolitler denilmektedir (Harborne, 2001). Sekonder metabolitler, farklı metabolik döngüler sonucunda oluşur. Primer metabolizma ürünlerine oranla daha az miktarlarda sentezlenirler ve hücrede birikmiş olan bileşiklerin hücreden uzaklaştırılmasını sağlar (Oskay, 2009; Topal ve diğ., 2000). Sekonder metabolitler önemli metabolitler olup, endüstriyel alanda da oldukça kullanılmaktadır. Bu metabolitlerin başlıca özellikleri şunlardır;

- ✓ Sekonder metabolitler gelişme ve çoğalma için gerekli olmayan bir özelliktedir.
- ✓ Besiyerinin bileşimine bağlı olarak ekstra büyüme şartlarında oluşur.
- ✓ Sıklıkla bir gruba bağlı olarak üretilir. Örnek olarak, *Streptomyces*'in bir türünün tek bir suşunun, 30'un üzerinde ürünle alakalı olduğu bulunmuştur. Ancak bunlar, farklı antraksilin antibiyotikleridir.
- ✓ Sekonder metabolitlerin yüksek üretimi çoğunlukla mümkün iken, genellikle primer metabolitlerin aynı ölçüde üretilmeleri mümkün değildir (Madigan ve diğ., 2003).

Mikrobiyal sekonder metabolitler, günümüzde daha fazla sağlık, endüstri ve tarım alanlarında kullanılmaktadır (Robinson ve diğ., 2001). Genelde çok farklı yapılara sahiptirler ayrıca oluşumları itibarıyla de besinler, büyüme oranı, geri bildirim kontrol, enzim aktivasyonu ve enzim indüksiyonuyla düzenlenmişlerdir. Bakterilerde bulunan kromozomal DNA ve nadir olarak plasmid DNA daki genlerin kodları, sekonder metabolitlerin sentezini sağlar. Sekonder metabolizmaya nazaran primer metabolizma süreçleri hala tam olarak anlaşılammıştır. Bundan dolayı, sekonder metabolitler; enzimoloji, kontrol ve farklılaşma üzerine yapılan çalışmalarda araştırmacılara fırsatlar sunar (Demain, 1998).

Mikroorganizmalar vasıtasıyla polisakkaridler, antigenler, enzimler, antibiyotikler, ve zehirler gibi çok sayıda sekonder metabolit üretilebilmektedir (Schlegel, 1992; Demain, 1999). Sekonder metabolitler daha kararlı ürün oluşturmaları ve daha az

enerji gereksinimlerine sahip olmalarından dolayı endüstri alanında kullanımları tercih edilmektedir (Demain, 1998). Ayrıca sekonder metabolitlerin seçiminde, suşların endüstriyel kullanım alanları ve yüksek üretim kapasiteleri de önemlidir (Leisinger ve diğ, 1979).

1.4.1 Antimikrobiyal etkili fungal metabolitler

Günümüzde teknolojinin gelişmesiyle birlikte özellikle moleküler biyoteknolojide funguslar üzerine yapılan çalışmalar artış göstermektedir. Ayrıca, fonksiyonel olarak gen çalışmalarında da kullanılmaktadır (Akkara ve diğ, 2014)

İnsanlar için birçok faydalı fungus türü endüstriyel ve ticari olarak üretilebilmektedir. Bunun yanında funguslardan elde edilen metabolitler de endüstriyel işlemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Seidl, 2006). Sekonder metabolit üretiminde bitkilere alternatif olarak funguslar ortaya çıkmıştır. Dünya genelinde fazla bir şekilde yayılım gösteren funguslar, besin döngüsünde, toprak formasyonunun oluşmasında, bitkilere besin sağlamada ve atıkların kullanılabilir duruma gelmesinde büyük öneme sahip mikroorganizma topluluğu olarak gösterilir. Fungusların farklı yaşam koşullarına adaptasyon mekanizmaları gelişmiştir ve biyoteknolojik önemi de gün geçtikçe artış göstermektedir. Funguslardan elde edilen metabolitlerin ilk kullanımları arasında; Yunan doktorların etkisini bilmemelerine rağmen bazı enfeksiyon kaynaklı hastalıklara çare bulmak amacıyla funguslardan elde ettikleri özütleri kullanması gösterilmiştir (Harborne, 2001). Daha sonrasında, *Aspergillus niger*'den sitrik asit ve oksalik asit üretimi 1892-1893 yıllarında gerçekleşmiştir. 1900'lü yıllara gelindiğinde ise, *Penicillium*'dan elde edilen mikofenolik asidin organ nakillerinde kullanılması ile fungal metabolitlere karşı olan ilgi daha da artmıştır. Sırasıyla yapılan bu buluşlarda fumarik asit, kojik asit, penisillik asit, kinonlar gibi birçok metabolit funguslardan izole edilmiştir (Bentley, 2006). 1928 yılında Fleming'in *Penicillium chrysogenum*'dan (*Penicillium notatum* olarakta bilinir) penisilini keşfetmesiyle "antibiyotik çağı" denilen dönem başlamıştır ve bu tarihten sonra da birçok fungus türünden yeni antibiyotikler keşfedilmiştir (Fleming, 1929; Oskay ve Tamer, 2009). Metabolitlerin ayrıntılı olarak analiz edilmesi, 1950'li yıllarda spektroskopik yöntemlerin gelişmesiyle başlamıştır (Cantürk, 2015).

1993-2001 yılları arasında antibakteriyel, antifungal, antitümör etki gösteren 1500'den fazla fungal metabolit izole edilmiştir. Birçok fungus türünden

farmakolojik olarak çok önemli olan metabolitler son 40 yılda yapılan çalışmalarla elde edilmiştir. 2014 yılına kadar literatür çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre, *Penicillium* cinsine ait 1338 ve *Aspergillus* cinsine ait 1984 adet sekonder metabolit izole edilmiştir. Sekonder metabolitlerin funguslarda ifade edilmeleri ve çeşitliliği ışık, pH, sıcaklık, su aktivitesi, karbon ve azot kaynakları, demir açlığı gibi faktörlere bağlıdır. Farklı türler aynı metabolitleri izole edebilir ya da farklı metabolitler aynı türler tarafından üretilebilir (Frisvad, 2015).

Sardaryan, (2002, 2004) yapmış olduğu çalışmalarda, *Penicillium oxalicum* tarafından üretilen Arpink Red isimli kırmızı gıda boyası fungal orijinli gıda boyalarına örnektir. Gıda takviyesi olarak Arpink Red kullanılması kanseri önleyici etki göstermiştir. Gelecekte ise ekstrem ortamlardan izole edilen fungal sekonder metabolitlerin çok daha çeşitli ve etkili maddelere kaynak oluşturacağı düşünülmekte ve önemli araştırma konuları arasında daha fazla yer bulacağı beklenmektedir (Cantürk, 2015).

1.5 İmmünostimülanların TNF- α , IL-1 β Gen Expressiyonları Üzerine Etkileri

Son yıllarda, geleneksel hastalık kontrollerine alternatif olarak patojenik mikroorganizmaları önlemek veya kontrol etmek için yararlı mikroorganizmaların kullanımına karşı olan ilgi artmıştır (Dimitroglou ve diğ, 2011). Probiyotikler, konağın sağlığını yararlı olarak etkileyen şekilde uygulanabilir, bu da mikrobiyal yem takviyesi olarak tanımlanmıştır (Reid ve diğ, 2003).

Yine son yıllarda balıktan izole edilen sitokin genleri karakterize edilerek kayda değer ilerleme elde edilmiştir (Secombes ve diğ, 2001). Çalışmalarda ilerleme kaydedilen sitokinler, interlökin 1 beta (IL-1 β), interlökin-8 (IL-8), tümör nekroz factor (TNF- α) ve anti-inflamatuar sitokin olan IL-10'dur (Mulder ve diğ, 2007). Bu uyarıcı ve engelleyici moleküller gökkuşağı alabalığında çalışılan bağışıklık düzenleyici genlerde yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Bu sitokinlerin bakteri kolonizasyonu veya işgaline cevaben konağın savunma mekanizmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Kim ve Austin, 2006).

Pérez-Sánchez ve arkadaşlarının (2011) yılında yaptığı bir çalışmada, gökkuşağı alabalığının böbrek ve bağırsağında *L. garvieae* patojenine karşı probiyotikler

kullanılarak, dört sitokinifn ifadesine (IL-1 β , IL-8, IL10 ve TNF- α) bakılmıştır. Bu alışma sonunda, sitokin ifadelerinin yukseldiği görülmüştür.

Reyes-Becerril ve arkadaşlarının (2013) yılındaki çalışmasında, ipuranın (*Sparus aurata*) probiyotik ile zenginleştirilmiş yemlerle beslenmesiyle böbrek bağırsak dokusundan çıkan sonuçlarda immün genler üzerindeki inflamatuar etkilere bakılmıştır. Bu çalışmalarında, proinflamatuar sitokin genleri olan (aynı zamanda da inflamatuar markörleri olarak görev alan) IL-8 ve IL-1 β seçilmiştir. Bildirilen deneme sonuçlarına göre, bakteriyal kolonizasyona ya da invazyona cevaplarda savunma mekanizmalarına katkıda bulunduğu belirtilmiştir. Bunun yanında, bu sitokinlerin artan ifadelerinin inflamatuar proseslerin düzenlemesiyle ilişkili olduğu belirtilmiştir.

Sazanlarla (*Cyprinus carpio*) yapılmış olan bir çalışmada, bakteriyal sekonder metabolit verilen hastalandırılmış balıkların kan değerlerinde İNOS ve IL-1 β genlerindeki aktivite değişimlerine bakılmıştır (Wang ve diğ, 2010). Bu genlerin immün cevapta önemli derecede normalden daha fazla ifade olduğu bulunmuştur.

Ayrıca, bazı kimyasal taşıyıcıların (interferon, interlökinler ve kompleman proteinleri) retimi immünostimülanlar tarafından arttırılır. Bu taşıyıcılarda bağışıklık sisteminin diğer bireylerini uyardığında T ve B lenfositlerin aktivitesi artmış olur (Kitao ve Yoshida, 1986).

Balık immünolojisi hakkında yapılacak araştırmalar, daha sağlıklı balık üretimine ve balıkçılık sektörünün de gelişmesine katkı sağlanacağı için teşvik edilmektedir (Ocak, 2006). Karasal funguslarla yapılan sayısız çalışma fungal sekonder metabolitler için kaynak teşkil etmektedir. Denizel funguslarla ilgili araştırmaların henüz başlangıç evrelerinde bulunması büyük bir kaynak ve potansiyelin denizlerde olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak bu çalışmada fungal suşlardan izole edilen ve antimikrobiyal/antioksidant özelliği bilinen bir metabolitin gökkuşağı alabalığı bağışıklık sistemi üzerindeki bağışıklık düzenleyici etkilerinin belirlenmesine çalışılmıştır. Fungal metabolitlerin alabalıkların doğal bağışıklık yanıtını hüresel boyutta nasıl etkilediğini ve immün sistem ile ilişkili TNF- α , IL-1 β , β -actin ve EF1 gen ekspresyonlarına etkileri moleküler tekniklerle tespit edilmeye ve değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmaların tamamı balık sağlığının stratejik olarak geliştirilmesini amaçlayan sürdürülebilir akuakültür için fungus kaynaklı

doğal őrınlerin geliştirilmesine ve immőnostimőlant olarak kullanılmasına katkı sağlayacaktır. Ayrıca, bu araştırmayla, akuakőltürde ortaya çıkabilecek sağlık sorunlarının ۆnlenmesi hususunda denizel funguslardan elde edilen doğal immőnostimőlant ۆzüt ve bileşiklerinin kullanılabilceği bir ۆn çalışma olarak akademik ve girişimci paydaşlara sunulmaktadır.

1.6 Hipotez

Balık yetiştiriciliğinin hız kazanmasıyla birlikte balık hastalıklarında da aynı ۆlüde artış olmuştur (Popp, 1980).

Balıkların içerisinde yaşamını sőrđürdüđü su ortamları coğrafi, fiziksel, kimyasal ve biyotik açıdan çok sayıda ve türde patojenik veya patojenik olmayan mikroorganizmaların yaşamasına ve gelişmesine uygun bir ortam sağlar. Bundan dolayı, balıklar farklı birçok biyolojik ve mikrobiyal ajanlara maruz kalmakta ve hastalıklara yakalanmaktadırlar. Eğer evresel koşullardaki optimal değerlerde olumsuz değerişimler oluşur ve bu olumsuz koşullar kısa süre içerisinde düzeltilmezse balık kayıplarında artışlar meydana gelebilir (Yonar ve Silici, 2010).

Tatlı su balıkları arasında yetiştiriciliği yaygın olan tür gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'dır. Fakat evresel koşullarda oluşan olumsuzluklar sonucu bakteriyel, fungal ve paraziter hastalıkların arttığı görőlmekte ve çok fazla ۆlümlere bağlı ekonomik kayıplar oluşmaktadır. Bundan dolayı, ۆzellikle son yıllarda bu sıkıntının ortadan kaldırmasına yۆnelik hem sentetik hem de doğal immőnostimőlanlar uygulanmaya başlanmıştır (Anderson, 1992a; Sakai, 1999).

İmmőnostimőlan maddeler, balık metabolizmasını hastalıklara karşı koruyucu etki oluşturma yۆnünde uyarıcı yeteneğindedir (Yonar ve Silici, 2010; Kakuta, 1998; Dörücü ve diğ, 2005; Yonar ve diğ, 2011; Jagetia ve Aggarwal, 2007).

Aynı zamanda bu veriler işığında antimikrobiyal ve antioksidan etkili fungusların immőnostimőlant potansiyelinin olabileceği ve gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) immőn sistemini olumlu yۆnde etkileyebileceği ve bu etkinin de moleküler seviyede tespit edebileceği hipotezine gۆre tez çalışması planlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyaller

2.1.1 Kullanılan balık

Çalışmada kullanılan ortalama 60-70 gr ağırlığındaki gökkuşuğu alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) İzmir Bergama ilçesinde yerleşik özel bir alabalık çiftliğinden temin edilmiştir. Bu türün tercih edilmesinin nedenleri arasında ortama rahat adapte olması, yetişmesi için özel koşullar gerektirmemesi, en fazla üretimi yapılan türlerden biri olması ve tüketiciler tarafından fazla tercih edilmesi sayılabilir.

2.1.2 Kullanılan araç ve gereçler

Deneysel çalışmalar İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Uygulama ve Araştırma biriminde bulunan kapalı devre tank sistemi ile Biyoteknoloji Laboratuvarı imkanlarından faydalanılmıştır. Çalışma süresince kullanılan cihazlar aşağıda listelenmiştir.

1. **Saf Su Cihazı;** Çalışmalarımızda reaksiyon karışımlarının hazırlanmasında distile ve nükleaz suyun sağlanması amacıyla kullanılmıştır.
2. **Mikrobiyolojik Emniyet Kabini;** Gerek RNA, cDNA izolasyonu gerekse de diğer tüm deneysel aşamaların steril koşullarda gerçekleştirilmesi için kullanılmıştır.
3. **Mini Masa Üstü Santrifüj;** Moleküler genetik çalışmalarda merkez kaç kuvveti ile çökeltilerin oluşturulması amacıyla RNA izolasyonunda santrifüj aşamasında kullanılmıştır.
4. **Hassas Terazî, (0,0000g);** Çalışmamızda kullanılan immünoestimulanların tartımı için kullanılmıştır.
5. **Buz Makinesi/Scotsman AF80;** Moleküler genetik çalışmalarda kullanılan kimyasallar için oda koşullarında +4 °C ortamı oluşturmak için kullanılmıştır.

6. **Soğutmalı Santrifüj/Thermo Scientific MR 23i;** Moleküler genetik çalışmalarda merkez kaç kuvveti ile çökeltilerin oluşturulması amacıyla RNA izolasyonunda santrifüj aşamasında kullanılmıştır.
7. **Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR Cihazı;** Gen ekspresyonlarının analizi için kullanılmıştır.
8. **Roche Real Time PCR light Cycler 96** Gen ekspresyonlarının analizi için kullanılmıştır.
9. **Tek Işınlı Spektrofotometre/Thermo Electron Corporation Nicolet Evolution100;** DNA, RNA ve protein konsantrasyonları ve saflıklarının tespiti için yararlanılmıştır.
10. **Derin Dondurucu -86°C/Nuaire Glacier;** RNA izolasyonundan önce dokuların saklanması için kullanılmıştır.
11. **-20°C Dondurucu;** Numune ve analizlerde kullanılan hazır reaktifleri saklamada kullanılmıştır.
12. **+4°C Soğutucu;** Solüsyon saklamak için yararlanılmıştır.
13. **Thermal Cycler (1x96 lık);** cDNA amplifikasyonunda kullanılmıştır.
14. **pH metre/Hanna Instruments HI 2211;** Moleküler genetik çalışmalarında kullanılan solüsyonların Ph değerlerinin ölçümü için yararlanılmıştır.
15. **Homojenizatör;** Gerekli durumlarda solüsyonlarda homojenizasyon sağlanması için kullanılmıştır.
16. **Dik Tip Otoklav;** Pipet uçları, ependorf tüpleri, makas, bistüri vb. malzemelerin sterilizasyonunda kullanılmıştır.
17. **Mikrodalga Fırın;** Elektroforez çalışmalarında kullanılan agarın hazırlanmasında kullanılmıştır.
18. **Elektroforez;** Ara aşamalarda, elde edilen ürünlerin kontrol edilmesi için kullanılmıştır.
19. **Elektroforez Güç Kaynağı;** Elektroforez cihazının çalışması için gerekli voltaj ve amperi sağlamak için yararlanılmıştır.
20. **UV Görüntüleyici;** Agaroz jel üzerinden DNA miktarının görüntülenmesi için kullanılmıştır.
21. **Vorteks;** Moleküler çalışmalarda çözeltilerin karıştırılmasında kullanılmıştır.
22. **Etüv;** Belirli bir sıcaklık isteyen kurutma ve inkübasyon işlemlerinde kullanılmıştır.

23. İnce Tabaka Kromatografi (İTK): Antioksidan aktivitenin kantitatif taranması için kullanıldı.

2.1.3.Kullanılan Kimyasallar

- 1. 2-Fenoksi-etanol (0.5 ml/lt):** Bayıltma solüsyonu olarak kullanılmıştır. Tez kapsamında kullanılan balıklar üzerinde yapılan tüm işlemlerde, etik olarak balıklar bayılarak üzerinde çalışma yapılmıştır.
- 2. Dimetil Sülfoksit (DMSO):** Bazı fungal özütlerin enjeksiyon öncesinde solüsyon olarak hazırlanmasında homojen bir çözelti sağlamak amacıyla kullanılmıştır.
- 3. Etanol:** Fungal özütlerin enjeksiyon öncesinde solüsyon olarak hazırlanmasında homojen bir çözelti sağlamak amacıyla kullanılmıştır.
- 4. %8.5 Fizyolojik Tuzlu Su (FTS):** Kontrol balıklarına immünostimülant madde yerine enjekte edilmiştir.
- 5. Butillenmiş Hidroksi Toluen (BHT):** Sentetik antioksidandır. Fungusların antioksidan aktiviteleri serbest radikal temizleme yüzdeleri üzerinden BHT ile karşılaştırılarak taranmıştır.
- 6. Ekstraksiyon kimyasalları:** Etil asetat
- 7. Antioksidan kimyasalları:** Antioksidan aktivitenin ölçümü için DPPH kullanıldı.

2.1.4 Kullanılan kitler

Çalışmalarda RNA izolasyonunda;

- GeneAll marka Hybrid-R™ Blood RNA kiti,
- cDNA için HyperScript™ First strand Synthesis Kit,
- TaqMan® Real-Time PCR Master Mix,
- Qiagen Mini Kit ,
- Sybrgreen Real-Time PCR Master Mix kullanılmıştır.

2.2 Yöntem

2.2.1 Deneme dizaynı

Deneme öncesi İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Uygulama Araştırma Birimindeki 500 lt'lik tanklara transfer edilen balıklar 1 ay adaptasyona tabi tutulmuştur. Suyun sıcaklığı ve oksijen değerleri her gün sabah ve akşam ölçülerek kaydedilmiştir (12 ± 8 °C, Oksijen 6-8 mg). Suyun sürekli devir daimi ve hava sıcaklığına bağlı olarak tanktaki su sıcaklığını sabit tutmak için bir adet soğutucudan (Soğutma Kulesi) yararlanılmıştır.

Özütün balıklarda immünostimülant etkilerinin incelenmesi amacıyla çalışmada

1) Kontrol Grubu: Sadece 200 µl PBS

2) Metabolit Deneme Grubu: 200 µl PBS'de çözdürülmüş özüt

Tablo 2.1: Deneme dizaynı.

	Uygulama zamanı (gün)	Balık Sayısı (adet/grup)	Deneme 1 (2.7.2015)	Deneme 2 (10.7.2015)	Deneme 3 (19.8.2015)	Deneme 4 (20.4.2016)
Kontrol	0 (Enjeksiyon 1)	10				
	7 (Enjeksiyon 2)					
	12 (Örnekleme)					
n=5 balık örneklenen kan sayısı						
Metabolit	0 (Enjeksiyon 1)					
	7 (Enjeksiyon 2)					
	12 (Örnekleme)					
n=5 balık örneklenen kan sayısı						

2.2.2 Fungal özütler

Tez çalışmasında immünostimülant madde olarak kullanılan 1.1.2a özütü Saroz körfezindeki Kömür Limanı istasyon bölgesinden toplanan *Spirastrella cunctatrix* süngeriytle birlikte yaşayan ve *P. atrovenetum* olarak filogenetik tanımlaması yapılan fungustan elde edilmiştir.

2.2.2.1 Süngerden fungus izolasyonu

Toplanan sünger örnekleri yüzeylerindeki debrisin uzaklaştırılması için steril deniz suyu ile yıkanmıştır. Sünger örneklerinin dış yüzey sterilizasyonu için etanol ile ikinci kez yıkama yapılmıştır. Yıkamadan sonra steril sargı bezi üzerine örnekler konularak kurutulmuştur. Sterilizasyonun ardından yine steril bıçaklarla örnekler

1cm x 1cm boyutlarında kesilerek izolasyon için hazırlanmış malt ekstrakt agar (15 g/litre malt ekstrakt, 20 g/litre agar, 1 litre doğal deniz suyu, pH 7.4-7.8) bulunan petrilere yerleştirilmiş ve petrilere parafilmle sarılarak oda koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. İzolasyon aşamasında ilk petrilere bakteriyel üremeyi baskılamak için gentamisin eklenmiştir (Kjer ve diğ, 2010). Yaklaşık iki haftalık inkübasyon süresince fungusların üremeleri takip edilerek, büyüme durumlarına ve morfolojik farklılıklarına göre funguslar temiz petrilere aktırılarak saflaştırılmıştır.

2.2.2.2 Fermentasyon aşaması

Funguslardan metabolit eldesi için katı hal fermentasyonu yapılmıştır. Katı hal fermentasyonunda pirinç ortamı (1 L'lik erlenlere 100 gr pirinç ve 110 mL doğal deniz suyu) kullanılmıştır. Fermentasyon işlemi agar üzerinde büyüyen funguslardan bir parça alınıp üretim ortamlarına eklenerek başlatılmış ve 30 gün boyunca devam ettirilmiştir (Kjer ve diğ, 2010; El-Neketi ve diğ, 2013).

2.2.2.3 Özütlenme aşaması

Katı hal fermentasyonunun yapıldığı ortam içeren erlenlere, üretim sonunda 200 mL etilasetat eklenmiştir. Ardından çalkalayarak karıştırılmış ve bir gece bekletilmiştir. Gece boyu bekletilen örnekler filtre kâğıdı kullanılarak süzölmüştür. Özüt 40 °C'de kurutularak ilerleyen denemeler için saklanmıştır (Kjer ve diğ, 2010).

2.2.3 Biyoaktivite taraması

Süngerlerden izole edilen fungusların antibakteriyel ve antioksidan aktiviteleri taranmıştır.

2.2.3.1 Antibakteriyel aktivite

Fungal özütlerin antibakteriyel aktivitesi disk difüzyon metodu ile yapılmıştır. Disk difüzyon metodu için *L. garvieae*, *Y. ruckeri*, *V. anguillarum*, *V. salmoninarum* patojenleri deneme öncesi aktif hale getirilerek 24 saatlik genç kültürleri ile çalışmalar yürütölmüştür. Aktivasyon için test bakterileri bir gün boyunca triptik soy agar ortamında canlandırılmıştır. 0.5 McFarland bulanıklık standardına göre hazırlanan test organizması steril eküvyon çubuk yardımıyla petrilere, katı besiyerlerinin üzerine yayılarak ekimleri yapılmıştır. Aktivitesi incelenecek özütten toplamda 2 mg/disk olacak şekilde konsantrasyon hazırlanarak OXOID marka boş antibiyotik disklerle 30 µl/disk emdirilmiş ve kontrol antibiyotiği (20 µg/disk

oksitetrasiklin) ile birlikte petrilere steril bir pens yardımıyla yerleştirilmiştir. Petriler inkübasyon öncesi 2 saat +4°C’de özütlerin besiyerlerine daha iyi difüze olabilmeleri için bekletilmiştir. Ardından antimikrobiyal aktivitenin belirleneceği petriler 21°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 6 mm çapındaki kâğıt disklerin etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek antimikrobiyal aktivite değerlendirmeye alınmıştır (Clinical ve Laboratory Standards, 2002).

2.2.3.2 Serbest radikal temizleme aktivitesi

Fungal ekstraların DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picryl Hydrazil) radikalleri temizleme özelliği daha önce Blois (1958) ve Amarowicz ve diğ. (2000) tarafından yapılan çalışmalarda kullanılan yöntemler modifiye edilerek tespit edilmiştir. Funguslardan elde edilen özütlerden 20 - 2000 µg/ml (20, 40, 60, 80, 100, 500, 1000 ve 2000 µg/ml) arasında değişen konsantrasyonlar oluşturulmuştur. Oluşturulan konsantrasyonlar 1 ml % 0.004’ lük DPPH solüsyonu ile tamamlanarak 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 517 nm dalga boyunda absorbanları ölçülmüş ve elde edilen absorbanlar Butillenmiş Hidroksi Toluen (BHT) standardına karşı yüzdelik olarak değerlendirilmiştir. Azalan absorban, geriye kalan DPPH miktarını serbest radikal temizleme aktivitesi olarak vermiştir. Her bir konsantrasyon 3 tekrarlı olacak şekilde hazırlanmış ve sonuçlar tekerrürlerin ortalaması hesaplanarak verilmiştir. Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır:

$$\% \text{ Radikal Temizleme Kapasitesi} = [(Kontrol_{ABS} - \text{Örnek}_{ABS}) / Kontrol_{ABS}] \times 100$$

Formülde; *ABS* = Absorbans

2.2.4 Fungus türünün tanımlanması

Yüksek antibakteriyel ve antioksidan aktiviteyi birlikte gösteren özütün filogenetik tanımlaması rDNA ITS (internal transcribed spacer) bölgesi dizi analizlerine dayalı olarak yapılmıştır. Kültüre alınan izolatlardan 100 mg hücre pelleti besiyeri yüzeyinden kürdan yardımıyla kazınarak alınmış ve ticari fungus izolasyon kiti ile DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolatın ITS bölgelerinin PCR amplifikasyonları ITS1 (Forward, 5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’) ve ITS4 (Reverse, 5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’) evrensel primerler kullanılarak Termal Cycler cihazında gerçekleştirildi (White ve diğ., 1990). Polimeraz zincir reaksiyonları için

Hot Start Master Mix kullanılmıştır. Hazırlık aşamasında, 50 µl çözelti için, 25 µl Hot Start Master Mix, 1 µl ITS1 primeri, 1 µl ITS4 primeri, 2 µl kalıp DNA ve 21 µl nükleaz içermeyen su kullanılmıştır. Polimeraz reaksiyon şartları, 95°C’de 2dk (ön denatürasyon), 95°C’de 1dk, 55°C’de 1 dk, 72°C’de 1dk (30 döngü) ve 72°C’de 5dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri dizileme çalışması öncesinde PCR pürifikasyon kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği koşullarda temizlenmiştir. ITS bölgelerinin dizilenmesi ve filogenetik analizleri ITS1 (Forward) ve ITS4 (Reverse) evrensel primerleri kullanılarak hizmet alımı ile Macrogen Inc. (Güney Kore) firması tarafından gerçekleştirilmiştir. Sekans sonucu elde edilen dizi verisi PHYDIT programı ile manuel olarak birleştirilip, EzTaxon-e Server (Kim ve diğ., 2012)’da bulunan global hizalama algoritmaları kullanılarak en yakın akraba organizmalarla olan nükleotit benzerliği belirlenmiştir.

2.2.5 Özütün balıklara verilmesi

“1.1.2a” koduyla izole edilen *P. atrovenetum* özütü 40 mg/kg dozda karın içine enjekte edilmiştir. Özüt 200 µl PBS içerisinde çözündürülerek balıklara karıncı enjeksiyon yoluyla ve 7 gün arayla 2 kez yapılmıştır. Enjeksiyon pelvik yüzgeç ile anüs ortasına abdominal bölgeye yapılmıştır. Balıklar enjeksiyon öncesinde etik kurallara uygun olarak 0.5 ml/L fenoksietanol solüsyonu ile bayıltılmıştır. Kontrol grubundaki balıklara aynı miktarda PBS enjeksiyonu uygulanmıştır.

2.2.6 Balıklardan kan örneklerinin alınması

Balıklara yapılan ikinci metabolit enjeksiyonundan 5 gün sonra her gruptan 5 balık olacak şekilde kan örnekleme alınmıştır. Kan örnekleri şırınga (2 ml) yardımıyla balıkların kuyruk kısımlarından her balıktan 0.5-1.5 ml olacak şekilde EDTA’lı tüplerin içerisine toplanmıştır. Kan örnekleri ayrıca, sonradan yapılacak RNA izolasyonları için, örnekleme bittikten sonra Trizol solüsyonu ya da RNA later içerisinde 7-15 gün +4 °C’de stoklanmıştır. Daha uzun süreli bekletmeler için ise örnekler RNA izolasyonu aşamasına kadar -86°C’de muhafazaya alınmıştır.

2.2.7 RNA izolasyonu

RNA hassas bir molekül olup RNA izolasyonu aşamalarının hepsi buz üzerinde yapılmıştır. Santrifüj basamakları soğutmalı santrifüjde ya da soğuk oda ortamında gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında daha önceki literatür bilgileri ışığında kan

dokusu ile çalışılmıştır. Ancak kan dokusu hassas ve çalışması riskli bir dokudur. Bu nedenle kanın RNA later içerisinde izolasyona kadar muhafaza edildiğinde uygulanan RNA later solüsyonun protokolü takip edilerek izolasyona geçilmiştir. Kandan RNA izolasyonunda farklı kitlerden (Qiagen mini kit protokolü ve GeneALL Tech Mini Kit modifiye protokol) yararlanılmıştır.

Kandan RNA İzolasyon Protokolü (Modifiye protokol)

1. RNA later içerisindeki kan örneklerinden kan örnekleri 2 ml ependorf tüplerinde $\frac{1}{2}$ oranında PBS ile dilüe (100 μ l kan + 200 μ l PBS) edilir.
2. Pipetaj ile yavaşça karıştırılıp, hücreleri parçalamamak için 1500 rpm 15 dakika soğutmalı santrifüjde santrifüj edilir. Tüplerden süpernant uzaklaştırılır.
3. Hücre pelletlerin üzerine 600 μ l RTL + β -merkaptolanol eklenir. (RTL ticari kitin içerisinde geliyor. β -merkaptolanol ise, satın alınması gerekiyor. 1 ml RTL+ 10 μ l β -merkaptolanol olacak şekilde bir stok hazırlanır.
4. Kan dokusunda bu aşamada santrifüj yapılmaz. Ancak doku ile çalışılıyorsa ticari izolasyon kitine göre istenilen hızda santrifüj yapmak gerekir.
5. 4. Maddedeki ependorfun üzerine bir hacim kadar %70 etanol eklenir.
6. Ependorf tüpündeki karışımdan 700 μ l spin kolonuna eklenir.
7. Örnekler 10000 rpm 30 saniye santrifüf edilir.
8. Spin kolonun toplama tüpündeki sıvı kısım dökülür. İstenilirse aynı toplama tüpü ile ya da yeni bir toplama tüpü kullanılır.
9. 6. aşama ependorfta kalan diğer sıvıda spin kolona eklenir.
10. Spin kolon 10000 rpm' de 30 saniye santrifüj edilir.
11. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılır ve spin kolona 350 μ l RW1 solüsyonu eklenir.
12. Spin kolon 10000 rpm 1 dak. santrifüj edilir.
13. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılır ve gDNA uzaklaştırma aşamasına geçilir. Bu aşamada RapidOut DNA Removal Kit protokolüne göre yapılır. Herbir örnek için 10 μ l DNA + 70 μ l RDD olacak şekilde bir ependorf DNAase stoğu hazırlanır ve örneklerin üzerine eklenir. ≥ 15 minimum oda koşullarında beklenir. Biz bu süreci 30 dakika olarak tuttuk.
14. 30 dakika oda koşullarında DNAase ile bekletilen örneklere 12. aşamadaki işlem aynen yapılır. Spin kolona 350 μ l RW1 solüsyonu eklenir.
15. Spin kolon 10000 rpm 1 dak. santrifüj edilir.

16. Santrifüjden sonra toplama tüpündeki sıvı dökülür ve 500 µl RPE buffer ile etanol eklenir. (Kitin içerisinde sadece RPE olarak gelir. Kite belirtildiği şekilde üzerine etanol eklenir. Etanol eklenen RPE solüsyonunun üzerindeki kutucuk işaretlenir ve izolasyonlarda kullanılır).
17. Spin kolon 10000 rpm 1 dak. santrifüj edilir.
18. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılır ve spin kolona 500 µl %80 etanol eklenir.
19. Spin kolon 10000 rpm 1 dak. santrifüj edilir.
20. Toplama tüpündeki sıvı uzaklaştırılır ve bir kez daha 10000 rpm 1 dak. santrifüj edilir.
21. Spin kolon steril bir ependorf tüpüne alınır ve üzerine 30-50 µl RNAase free water eklenir ve oda koşullarında 1 dak. beklenir.
22. Son olarak 10000 rpm 1 dak. santrifüj edilir.
23. İzole edilen RNA ependorf tüp içerisinde saf olarak elde edilir.

İzole Edilen RNA Konsantrasyon Ölçümü

- Saf olarak elde edilen RNA örneklerinin hemen konsantrasyon miktarı ölçülecekse buz üzerinde daha sonra ölçüm yapılacaksa -20°C muhafaza edilir.
- RNA konsantrasyonlarının ölçümü Nanodrop cihazında yapılır.
- Öncelikle Nanodrop' un bağlı olduğu bilgisayar açılır, Program başlatılır.
- Programda ölçüm yapılacak nükleik asit, konsantrasyon birimi (µg/ µl) seçilmiştir. Konsantrasyon hesaplamalarında kolaylık olsun diye µg/ µl olarak seçtikten sonra ilk olarak cihaz kalibre edilmiştir.
- Kalibrasyon için 1 µl RNAase free water cihaza okuma bölmesine dikkatlice konulur ve kapağı kapatılarak blank butonuna basılır.
- Örneklerin isimleri programa yazılıp sonrasında 1 µl alınarak okuma haznesine konulur ve ölçüm butonuna basılır. Kalibrasyondan sonra temiz bir peçete ile örnek konulan yer silinir.
- Her bir örnekten sonra temiz bir peçete yarımıyla okuma bölmesi silinir.
- Ölçümler tamamlandıktan sonra sonuçlar programdan rapor şekilde excell dosyası olarak kaydedilip USB' ye kaydedilir ve gerekli yerlerde kullanılır.

2.2.8 cDNA sentezi

cDNA sentezi için RNA konsantrasyonu hesaplanmıştır.

Örnek hesaplama;

RNA konsantrasyonu=0.329 µg/µl

1 µl 0.329 µg

$\frac{x \mu l}{1 \mu g} = \frac{1 \mu g}{0.329 \mu g/\mu l}$ $x=1/0.329=3.04 \mu l$ RNA solüsyonu

Eklenecek H₂O (µl) = 10-3.04=6.96 µl

RNA izolasyonu sonucunda elde ettiğimiz miktar üzerinden cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezi için 1 µg RNA gerekmektedir. Nanodrop analizinde ölçülen µg/µl konsantrasyon kullanılarak cDNA için kullanılacak miktar (µl) belirlenmiştir. cDNA için toplamda 10 µl RNA solüsyonundan gerekmektedir. Hesaplamalar sonucunda eksik kalan miktar moleküler grade su ile tamamlanmıştır.

cDNA Sentezi Protokolü

1. RNA miktarı = 1µg RNA içeren solüsyondan 10 µl (Gerekli hesaplamalar ile hazırlanmıştır.)
2. Primer DT = 3 µl eklenir. (Forward primer, Reverse primer)
3. Toplam hacim 13 µl olan PCR tüpleri etiketleri yapıldıktan PCR cihazında 70° C 2 dak. inkübe edilir. İnkübasyondan sonra örnekler hızla buz üzerine alınır. Buzun üzerinde 2 dak. inkübe edilir.
4. Tüplere; 4 µl Buffer (Reaction Buffer Reverse AİD)
2 µl DNTP's
1 µl RevertAid TR (RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/ µl)
eklenir. (ThermoScientif Catalog number: EP0441)
5. PCR tüplerinde son hacim 20 µl olduktan sonra Termal Cycle cihazında cDNA sentezi için protokole uygun şekilde program kurulur.
6. Tüpler cihaza yerleştirilir ve program başlatılır.
7. cDNA sentezi için kurulan program: 42° C - 1 saat
45° C - 30 dakika
50° C - 30 dakika
90° C - 5 dakika

2.2.9 Real-Time PCR

Tez çalışması kapsamında, cDNA sentezi protokolüne göre sentezlenen örnekler ile Real-Time PCR (Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR) cihazında gen ekspresyonlarına bakılmıştır.

Real Time PCR reaksiyonunda, cDNA sentezi tamamlanan örnekler ile hemen çalışılmayacaksa -20°C kaldırılmalıdır. Real-Time PCR reaksiyonlarında hangi cihaz ile çalışıldığı, kaçlık plate kullanıldığı ve kullanılan programların detayı, kullanılan boylar cihazın marka modeline göre değişiklik göstermektedir. Ancak reaksiyon şartları ve örnek karışımları birbirine benzemektedir.

- Real Time PCR aşamasında ilk basamak cihazın programının açılması ve deneme dizaynının programa aktarılması olmuştur.
- Programda dizayn edilen deneme kaydedilmiş ve bir tanede çıktısı alınarak buna göre plate hazırlanmıştır.
- Programda dizayn kısmı önemli olup program nasıl kodlandıysa örnekler ona göre hazırlanmalıdır.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	control EP	Metabotax EP		IL1b EP	control TNFa	Metabotax TNFa		IL1b TNFa	control IL1b	Metabotax IL1b		IL1b
B	control EP	Metabotax EP		IL1b EP	control TNFa	Metabotax TNFa		IL1b TNFa	control IL1b	Metabotax IL1b		IL1b
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Şekil 2.1: RT-PCR plate deneme dizaynı

- Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR Cihazı kullanılırken TaqMan Master Mix, son denemede Roche Real Time PCR light Cyler 96 cihazında da Sybrgreen Master Mix kullanılmıştır.
- Satın alınan primerler stok hacmine göre çalışmada kullanılacak şekilde primer solüsyonu hazırlanmıştır.

Stok forward primer	→	100 nM	} Ticari olarak 50 nmol, 100 nmol, 200nmol olarak satın alınabilir. (-20° C stoklanır.)
Stok reverse primer	→	100 nM	
Çalışma için kullanılacak primer solüsyonu	→	+ 10 µl Forward Primer (100 nM) + 10 µl Reverse Primer (100 nM) + 80 µl H ₂ O <hr/> 100 µl Kullanım için hazır (10 nM)	
Not: Hazırlanan 100 µl stok solüsyonu -20° C bitene kadar kullanılabilir.			

- Kullanılacak primer solüsyonundan her bir kuyucuğa 0.6 µl kullanılmıştır.
- Real Time PCR plateleri hazırlanmadan önce eklenecek maddeler miktarları hesaplanarak karışım solüsyon hazırlanmış ve bu karışımdan her bir kullanılacak kuyucuğa 8 µl olarak eklenmiştir.

Real Time Mix karışımı; 1 gen ve 1 örnek	}	5 tekrarlı için 15 kuyucuk gerekiyor.
*2,4 µl H ₂ O		*2,4x15=36 µl H ₂ O
*0,6 µl Primer		*0,6x15=9 µl Primer
*5 µl Sybrgreen		* 5x15=75 µl Sybrgreen
		<hr/> Mix total= 120 µl

- Kullanılacak tüm kuyucuklara Real Time için gerekli mix. eklendikten sonra örneklerden 2 µl kuyucuklara eklenmiştir.
- Programda dizayn edilen tabloya göre hazırlanan plate üzeri plate seal ile dikkatlice kapatılmıştır. Plate cihaza konulmadan önce 5-6 sn. santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjden sonra bilgisayarda deneme dizaynı ile birlikte yapılacak cycle ve diğer koşullar belirlenerek kaydedilmiş ve komut dosyası cihazda çalıştırılmıştır.
- Plate cihaza dikkatlice yerleştirilmiş ve program seçilerek başlatılmıştır.

Tablo 2.2: RT-PCR için kullanılan program.

İnkübasyondan	90°C - 600 sn
40 amplifikasyon için	95°C - 10 sn
	60°C - 10 sn
	72°C - 10 sn *İlk kaydedilen sinyal
Melting point	95°C - 10 sn
	65°C - 60 sn
	97°C - 10 sn *Kaydedilen sinyal devamı
Soğuma Aşaması	4.4°C / sn soğuma ile 97°C'den 4°C'ye soğur.

Program sonlandıktan sonra tüm sonuçlar ana bilgisayardan program açılarak analize başlanmıştır.

- Genlerin ekspresyon düzeyleri $2^{-(\text{Target gene CT}-\text{Houskeeping gene CT})}$ formülü ile hesaplanmıştır.

2.2.10 İstatistiksel analiz

Real Time PCR verilerinin düzenlenmesi, analizi ve grafiklerle gösterilmesi Microsoft Office Excel 2013 programına göre yapılmıştır. Aritmetik ortalama ve standart sapma olarak ifade edilen veriler ANOVA ile değerlendirilmiştir. Gen ekspresyonları ile ilgi değişim verilerinin istatistiki olarak önemlilik dereceleri ($p<0.05$) ve değerler arasındaki farklar SPSS programında Tukey testi ile yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1 Fungusların Antimikrobiyal Aktiviteleri

Süngerlerden izole edilen fungusların etil-asetat özütlerinin disk difüzyon sonuçları Tablo 3.1’ de verilmiştir. Bu sonuçlara göre en az bir balık patojenine karşı oluşturduğu 34.1 ± 2.5 mm’lik inhibisyon zonu ile 1.1.2a fungal özütünün çok yüksek antimikrobiyal aktivite potansiyelinin olabileceği görülmüştür.

Tablo 3.1: Fungal özütlerin balık patojenlerine karşı disk difüzyon sonuçları, (inhibisyon zonu = mm).

Fungal özütler	<i>L. garvieae</i>	<i>Y. ruckeri</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. salmoninarum</i>
<i>P. atrovenetum</i> (112a)	34.1 ± 2.5	-	13.9 ± 2.0	-
1.7.1	-	15.1 ± 2.0	-	-
1.7.3	-	-	-	-
1.3.5a	-	-	11.1 ± 1.0	-
3.6.2	12 ± 0.7	-	-	12 ± 1.1
3.3.1b	-	-	-	10 ± 0.9
1.17.3	-	-	-	-
5.1.2c	-	-	-	-
*Oksitetrasiklin	18.9	14.5	20.0	30.0

*Kontrol antibiyotiği (20 µg/disc)

3.2 Fungal Özütlerin Serbest Radikal Temizleme Aktiviteleri

Fungusların antioksidan aktiviteleri serbest radikal temizleme yüzdeleri üzerinden BHT ile karşılaştırılarak taranmıştır. Denemeler sonucunda ham özütlerin 20-2000 µg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda sırasıyla fungal izolat 1.7.3 (% 69.4-96.6), *P. atrovenetum* (% 62.8-96.1) ve izolat 1.7.1 (% 60.8-95.2) özütleri BHT (% 79-93.4) ile karşılaştırıldığında benzeri antioksidan potansiyel göstermişlerdir

($p>0.05$). Daha yüksek konsantrasyonlara çıkıldıkça BHT' ye yakın antioksidan aktivite potansiyeli gösteren fungal suşların sayısı artış göstermiştir. Fungus özütlerinin antioksidan kapasite sonuçları BHT ile karşılaştırmalı olarak Tablo 3.2' de verilmiştir. BHT ile karşılaştırıldığında, düşük konsantrasyonlarda DPPH radikal temizleme kapasitesi %60 ve altında bulunan fungal izolatlar değerlendirmeye alınmamıştır.

Tablo 3.2: Özütlerin serbest radikal temizleme aktiviteleri.

	Konsantrasyonlar ($\mu\text{g ml}^{-1}$)							
	20	40	60	80	100	500	1000	2000
BHT (kontrol)	79	87.2	91.0	92.3	93.4	93.0	92.4	90.9
Fungal özütler								
<i>P. atrovenetum</i> (112a)	62.8	70.6	77.6	83.8	89.7	96.1	94.3	90.7
1.7.1	60.8	62.8	66.3	67.4	73.2	89.9	95.1	95.2
1.7.3	69.4	83.5	91.2	94.8	96.6	94.5	91.1	84.1
1.17.3	53.5	Diğer suşlara göre düşük konsantrasyonlarda daha az antioksidan potansiyeli gösterdiklerinden yüksek konsantrasyonlarda ölçmeye gerek duyulmamıştır.						
1.3.5a	49.2							
5.1.2c	52.2							
3.6.2	-							
3.3.1b	-							

Yüksek antimikrobiyal aktivite potansiyeline sahip fungal izolat 1.1.2a aynı zamanda önemli bir antioksidan potansiyeli göstermiştir. Buna göre belirlenen bu fungus izolatında tür tanımlaması yapılmıştır. Yapılan tür tanımlaması sonucu, bu tez kapsamında immünostimülant madde olarak süngerden izole edilen *P. atrovenetum* fungusundan fermente edilerek üretilen özüt kullanılmıştır.

3.3 RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Tez kapsamında dört farklı zamanda dört deneme yapılarak metot geliştirilmeye çalışılmıştır. İlk üç denemede RNA izolasyonu ticari kitlere göre yapılmış olup son

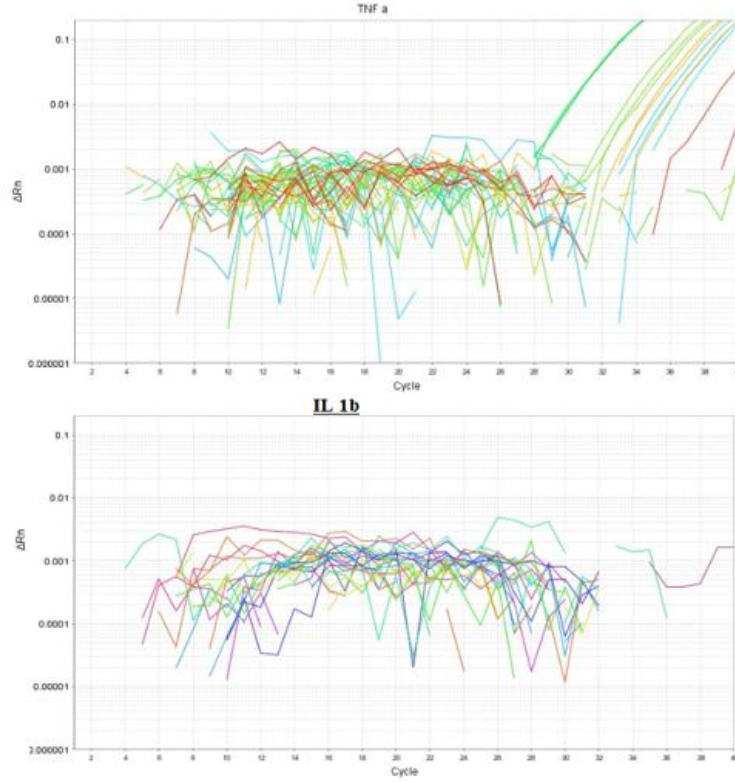
denemede ticari kit protokolü çalışma koşullarına göre uyarlanmıştır. Son çalışmada, RNA örneklerinde genomik DNA' yı uzaklaştırmak için ek olarak DNAase aşaması eklenmiştir. Tablo 3.3'de yapılan tüm RNA izolasyonu konsantrasyonları $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ değerinde verilmiştir. Ayrıca, bir sonraki aşama olan cDNA sentezi için kullanılacak 1 μg RNA için solüsyondan kaç μl alınacağı ve üzerine kaç μl H₂O ekleneceği hesabı yapılmıştır. Gruplar 3 tekrarlı olarak hazırlanmış olup konsantrasyon değeri en yüksek olan grup ile çalışmaya devam edilmiştir.

Tablo 3.3: RNA izolasyonu yapılan örneklerin miktarları ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Denemeler	Gruplar	RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	260/280	cDNA için kullanılacak miktar (μl)	Eklenecek H ₂ O (μl)
02.07.2015	Kontrol	0.329	2.08	3.04	6.96
	Metabolit	0.301	2.03	3.32	6.68
10.07.2015	Kontrol	0.289	2.06	3.46	6.54
	Metabolit	0.763	2.11	1.31	8.69
19.08.2015	Kontrol	0.111	2.08	9	1
	Metabolit	0.086	1.94	11.67	0
20.04.2016	Kontrol	0.085	1.92	11.76	0
	Metabolit	0.171	1.91	5.85	4.2

3.4 Real Time PCR için Metot Optimizasyonu

Çalışmanın ilk denemelerinde Real Time PCR aşamasında TaqMan® Real-Time PCR Master Mixes ve housekeeping gen olarakta β ta-aktin kullanılmıştır. Şekil 3.1'de görüldüğü gibi amplifikasyon pikleri verilen hedef genlerde tüm örneklerde çok sayıda tekrar eden kesikli birçok pik gözlemlenmiştir. Bu sonuçların genomik DNA kontaminasyonu, yanlış primer tasarımı gibi sebeplerden kaynaklandığı öngörülmüştür. Bu nedenle denemeler ikinci kez tekrarlanarak RNA izolasyonuna DNAase aşaması eklenmiştir. DNAase aşaması örneklerdeki genomik DNA uzaklaştırmak için kullanılmıştır. Devam eden denemelerde Real Time PCR aşamasında master mix değişikliğine gidilmemiştir.



Şekil 3.1: Real Time PCR optimizasyonunda hatalı amplifikasyon pikleri

İkinci ve üçüncü denemelerde genomik DNA kaynaklanacak kontaminasyonların önüne geçmek için DNAase aşaması RNA izolasyonuna eklenmiştir. Örneklere RNA aşamasından sonra protokole uygun olarak cDNA sentezi yapılmış ve TaqMan® Real-Time PCR Master Mix ile gen ekspresyonlarına bakılmıştır. Tablo 3.5’de görüldüğü gibi houskeeping gen eksprese olurken hedef genlerin ekspresyonları hesaplanamamıştır. Bu deneme dizisi bir sonraki deneme için yeniden primer tasarımı zorunlu kılmıştır. Yeni primer tasarımı ile birlikte TaqMan® Real-Time PCR Master Mix ekonomik olarak daha uygun olan Sybgreen Real-Time PCR Master Mix kullanımına karar verilmiştir (Tablo 3.4). Ayrıca bu deneme dizisi bize ilk deneme dizisinde genomik DNA kontaminasyonu olduğunu ve aynı zamanda primer tasarımının yanlış olduğunu göstermiştir.

Tablo 3.4: Real Time PCR optimizasyonunda denenen primerler

Gen	Forward	Reverse	Uzunluk	Genbank
TNF- α	TCTCCCTCAGATACCCACCA	CTAGCCCACGAGACATTTGC	20 baz	AJ278085
IL-1 β	ATTGCCAACCTCATCATCGC	TCTTCCACAGCACTCTCCAG	20 baz	AJ223954.1
Beta Aktin	TATGTGCAAAGCCGGATTG	CACGTAGCTGTCTTTCTGGC	20 baz	AF157514

Tablo 3.5: Real Time PCR optimizasyonunda Beta-aktin denemesi

Örnekler		Gen Adı	C _T	C _T Ort.	C _T SD	C _T Eşik Değeri
Kontrol	Housekeeping	Beta-aktin	38.91	38.91		0.02
Kontrol	Hedef gen	TNF- α	Tanımlanamadı			
Kontrol	Hedef gen	IL-1 β	Tanımlanamadı			
Metabolit	Housekeeping	Beta-aktin	36.54	35.87	0.59	0.02
Metabolit	Hedef gen	TNF- α	Tanımlanamadı			
Metabolit	Hedef gen	IL-1 β	Tanımlanamadı			

3.5 Real-Time PCR

Dördüncü denemede, ilk çalışmalarda kan örneklerinden yüksek konsantrasyonda RNA izolasyonu elde etmek için kullanılan ticari RNA izolasyon kiti çalışmaya uygun hale getirilmiştir. Genomik DNA'yı örneklerden uzaklaştırmak için DNAase aşaması eklenmiştir. Gökkuşluğu alabalıklarında ekspresyon düzeyleri çok iyi belirlenmiş olan EF (elongation factor) geni housekeeping gen olarak seçilmiş ve β -aktin yerine kullanılmıştır. Real Time PCR Master Mix olarak daha ekonomik olan ve TaqMan master mix ile hemen hemen aynı sonuçları veren Sybrgreen Master Mix ile devam edilmiştir. Hedef genler için primerler PRIMER 3 programı kullanılarak tasarlanmıştır. NCBI gen bank sitesinden genin tüm sekansı kopyalanarak PRIMER 3 programına yapıştırılmıştır. Programın otomatik olarak tasarladığı ve önerdiği primer setleri sipariş edilmiş ve satın alma gerçekleştirildikten sonra PCR çalışmasına başlanmıştır. Bu değişikliklerden sonra elde edilen RT-PCR sonuçları diğer sayfada verilmiştir (Tablo 3.6).

Tablo 3.6: Son çalışma için PRIMER 3 programında tasarlanan primerler

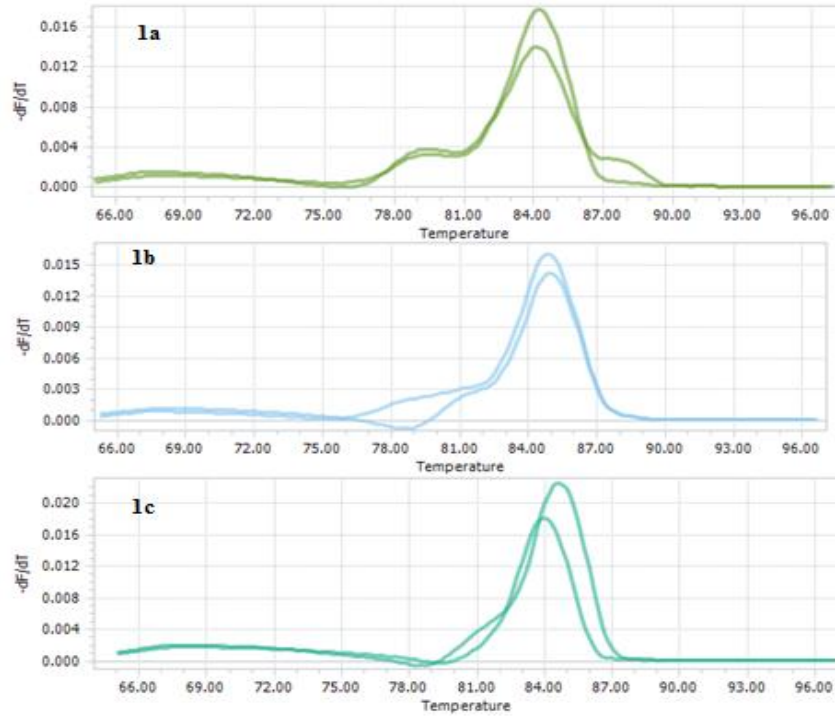
	Gen	Primerler
Housekeeping	EF Forward	GATCCAGAAGGAGGTCACCA
	EF Reverse	TTACGTTCGACCTTCCATCC
Hedef Gen	TNF- α Forward	CCACACACTGGGCTCTTCTT
	TNF- α Reverse	GTCCGAATAGCGCCAAATAA
	IL1b Forward	GACATGGTGC GTTTCC TTTT
	IL1b Reverse	ACCGGTTTGGTGTAGTCCTG

3.5.1 Melting Point Grafikleri

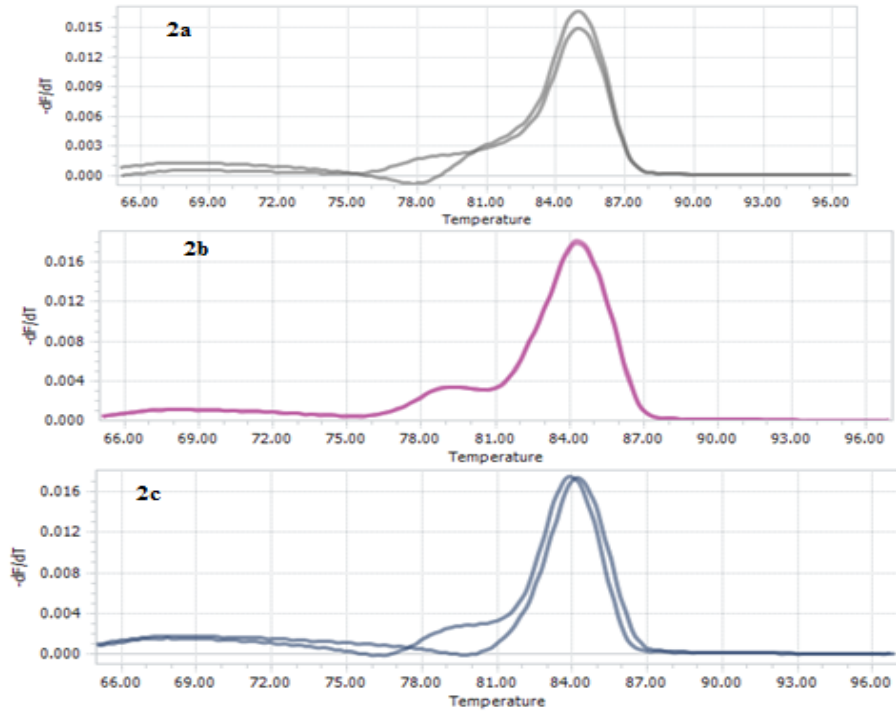
RT-PCR sonuçları C_q (quantification cycle value) sayısal değerler ile hesaplanabildiği gibi melting point grafikleri ile de yorumlanabilir. RT-PCR’de melting point analizleri RNA örneklerinde genomik DNA kontaminasyonu, gen ekspresyonu sonuçlarının analizini etkileyen primer-dimerler ve farklı splice formlarının neden olduğu sonuçların ortaya konulması açısından önemlidir (Ririe ve diğ, 1997).

EF housekeeping geni (1a), TNF- α (1b) ve IL-1 β (1c) hedef geninin kontrol grubunun melting point grafiği Şekil 3.2’deki gibi gözlemlenmiştir. Her iki tekrarda pikler tek olup RNA örneklerinin temiz ve cDNA sentezinin başarılı olduğunu göstermektedir. EF housekeeping geni (1a) 78-81°C aralığında genin farklı exonlarının amplikonundan kaynaklandığı düşünülen çok küçük bir pik gözlemlenmiştir. Ancak bu pik çalışma sonuçlarının analizini etkilememektedir. TNF- α (1b) ve IL-1 β (1c) hedef genlerinin melting point grafikleri temiz bir RNA izolasyonu, başarılı bir cDNA sentezi ve doğru primer seçimi olduğunu göstermektedir.

EF housekeeping geni (2a), TNF- α (2b) ve IL-1 β (2c) hedef geninin metabolit verilen grubunun melting point grafiği Şekil 3.3’de ki gibi gözlemlenmiştir. Genel olarak sonuçları etkileyen bir kontaminasyon gözlenmemiştir. TNF- α (2b) geninin her iki tekrarında 80°C aralığında genin farklı exonlarının amplikonundan kaynaklandığı düşünülen çok küçük bir pik gözlemlenmiştir. Ancak bu pik çalışma sonuçlarının analizini etkilememiştir.



Şekil 3.2: EF (1a), TNF- α (1b) ve IL-1 β (1c) genlerinin kontrol grubundaki melting point grafiği



Şekil 3.3: EF (2a), TNF- α (2b) ve IL-1 β (2c) metabolit verilen gruptaki melting point grafiği

3.5.2 Cq değerlerine göre analiz sonuçları

Gen ekspresyonları için EF housekeeping gen, TNF- α ve IL-1 β hedef genleri iki tekrarlı olarak hazırlanmış ve analizleri yapılmıştır. Genlerin eksprese pik aralıkları ve ortalamaları Tablo 3.7’de verilmiştir.

Tablo 3.7: Gen ekspresyon oranları ve ortalamaları.

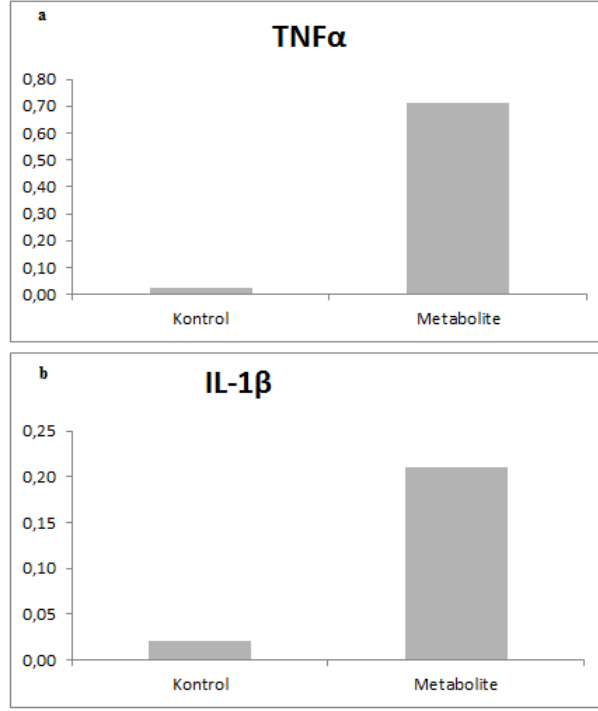
Gruplar	Gen		1.Tekrar	2.Tekrar	Cq Değeri
Kontrol	EF	Housekeeping	23.53	23.80	23.67
Metabolite	EF		21.89	22.00	21.95
Kontrol	TNF- α	Hedef Gen	28.67	29.28	28.98
Metabolite	TNF- α		22.30	22.57	22.44
Kontrol	IL-1 β		29.13	29.29	29.21
Metabolite	IL-1 β		24.37	24.03	24.20

Genlerin ekspresyonlarının hesaplanmasında Cq değeri kullanılmıştır. RT-PCR programlarında gen ekspresyonlarının eşik değerlerini sayısal olarak Cq değeri olarak ifade edilmektedir. Tablo 3.7’de hesaplanan ortalama Cq değerleri ile hedef genlerin ekspresyonu **$2^{-(\text{Hedef gen Cq} - \text{Housekeeping gen Cq})}$** formülü ile hesaplanmıştır (Tablo 3.8).

Tablo 3.8: Hedef genlerin ekspresyon değerlerinin hesaplanması.

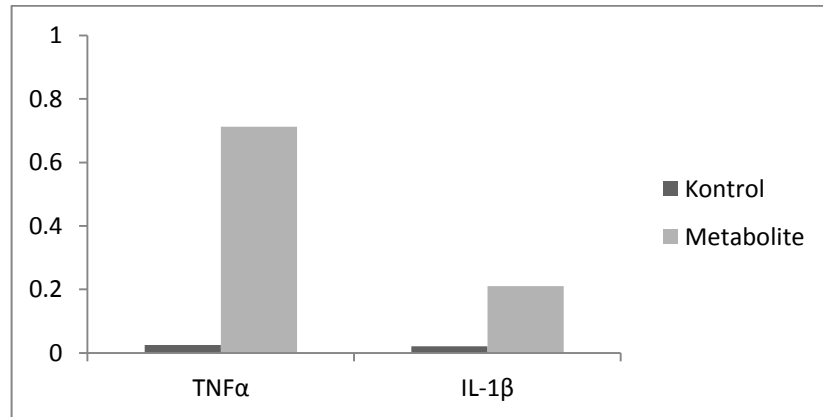
	Cq Değeri (Ortalama Tekrar)		$2^{-(\text{Hedef gen Cq} - \text{Housekeeping gen Cq})}$
	EF	TNF- α	TNF- α
Kontrol	23.67	28.98	0.02521
Metabolit	21.95	22.44	0.71203
	EF	IL-1 β	IL-1 β
Kontrol	23.67	29.21	0.02149
Metabolit	21.95	24.2	0.21022

Housekeeping gene karşı hesaplanan TNF- α ve IL-1 β hedef genlerin kontrol grubu ile metabolit karşılaştırması yapıldığında metabolit verilen balıkların gen ekspresyonlarında belirgin bir artış olduğu Şekil 3.4’ deki grafikte belirgin olarak görülmektedir.



Şekil 3.4: Hedef genlerin kontrol ve metabolit verilen gruplardaki ifadeleri

TNF- α ve IL-1 β genlerinin hem kontrol grubu hem de metabolit grubunda ekspresyon seviyeleri Şekil 3.5’de bir arada verilmiştir. Burada görüldüğü gibi metabolit verilen grupta ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre TNF- α geninde yaklaşık olarak 36 kat, IL-1 β geninde yaklaşık olarak 11 kat artış göstermiştir. Her iki gen karşılaştırıldığında metabolit (*P. atrovenetum* özütü) verilen gruptaki TNF- α ekspresyonu, IL-1 β ekspresyonuna göre çok daha yüksek olmuştur.



Şekil 3.5: Metabolitin hedef gen ifadelerine olan farklı etkisi

4. TARTIŞMA

Bu tezin amacı süngerlerden izole edilerek kültüre alınan funguslardan elde edilen kültür özütlerinin gökkuşuğu alabalığına enjeksiyonuna yanıt olarak bağışıklıkla ilişkili IL-1 β ve TNF- α gen ekspresyonlarının çalışılmasıdır. Kan örneklerinin alınması basit bir prosedür olup alınan örneklerden mRNA izolasyonu yapılmıştır. Genel olarak izole edilen mRNA'nın yüksek kalitede olması ve PCR'dan elde edilen sonuçlar uygulanan metotların bu çalışmanın hedeflerine ulaşmak için yeterli olduğunu göstermektedir. Sonuçların geçerliliğini tam anlamıyla sağlamanın ve güvenilirliği artırmanın bir yolu üç balıktan daha fazla paralel kullanmaktır ki bu çalışmada uygulanmıştır. Fazla örnekleme ile en düşük ve en yüksek değerlerin hesaplamadan çıkarılması mümkün olacağından denemede kullanılan özütün immünoestimülant kapasitesi daha iyi temsil edilecektir. Bu verilere göre Şekil 3.4'de görüldüğü üzere balıklara enjekte edilen fungal özütün, her iki TNF- α ve IL-1 β genlerinin transkripsiyonunu güçlü bir şekilde teşvik ettiği kanıtlanmıştır. Ham özüt verildiği düşünüldüğünde, elde edilen sonuçların oldukça dikkat çekici olduğu söylenebilir. Ham özütlerin fraksiyonlara ayrıldığında bazı fraksiyonların biyoaktivitesinin ham özüte göre daha etkili olabileceği daha önceki çalışmalardan bilinmektedir (Agarwal ve diğ, 2000; Dellai ve diğ, 2010; Gao ve diğ, 2013). Dolayısıyla çalışılan fungal özütün saf bileşiklere ayrılmasıyla daha etkili bileşik veya molekülün bulunması mümkün olabilir. Bu nedenle elde edilen bu sonuçlar ileri basamaklara geçmek için fungusun immünoestimülant potansiyelini göstermek açısından oldukça önemli deliller sunmaktadır.

Gıda güvenliği ve insan sağlığının korunmasına günümüzde daha çok ihtiyaç duyulduğundan kimyasallara olan hassasiyetler de artmıştır. Tarımda korunma ve tedavi amacıyla bilinçsizce kullanılan ilaçlar ve kimyasallar dirençli bakterilerin oluşması yanında ekonomik kayıplar artmakta çalışanların ve tüketicilerin sağlığı etkilenmektedir (Sapkota ve diğ, 2008). Son yıllarda ilaç kullanımının çevresel etkilerinden dolayı yeni doğal ürün araştırmalarına önem verilmiştir. Bu tez

konusuyla, kültür alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) üretiminin doğaya ve canlılara olan etkilerinin fungal metabolitlerden elde edilen immün uyarıcılar ile azaltılabileceği öngörülmektedir. Düşük konsantrasyonlarda daha etkili, doğal ve yeni molekül yapılara sahip, olabildiğince az kimyasal değişime uğratarak kullanılabilecek moleküllerin araştırılması önemli bulunmaktadır (Zhang ve Demain, 2005). Bu anlamda alglerin, süngerlerin, mangrove ağaç özütlerinin ve bitkisel bileşiklerin antimikrobiyal olarak kullanıldığı bilinmektedir (Selvin ve Lipton, 2004; Bansemir ve diğ., 2006; Harikrishnan ve diğ., 2011; Sudheer ve diğ., 2011; Özkaya ve diğ., 2013).

Türkiye’de akuakültür üretiminin yarısını kültür alabalığı oluşturmaktadır ve son yıllarda bu üretimde Avrupa’da ilk sırada yer almaktadır. Ülkemizde ve dünya genelinde büyük öneme ve üretim miktarlarına sahip olması ve dolayısıyla araştırma sonuçlarının uygulanmasında geniş bir potansiyel oluşturmasından dolayı hedef organizma Gökkuşluğu Alabalığı olarak belirlenmiştir. Bu seçimde salmonid ailesinin büyüklüğü ile türlerinin kültür balığı olarak dünya ve Türkiye açısından ticari öneminin etkisi de büyük olmuştur.

Son yıllarda tarımsal faaliyetlerde ve hayvancılıkta olduğu gibi akuakültürde yoğun üretilere geçilmesiyle birlikte balıklarda immünohistimülant kullanımına yönelik ihtiyaç ve talep giderek daha çok artmaktadır (Sarker ve diğ., 2006; Yin ve diğ., 2006). Sıcaklık, ışık ve su kalitesi gibi çevresel faktörler balıkları bütün gelişim dönemleri süresince oldukça geniş ölçüde etkilemektedir (Kjørsvik ve diğ., 2004). Ayrıca, patojenlerin üremesi için sudaki yetiştiricilik ortamları karadakilere oranla çok daha elverişlidir ve balıklar larvadan pazar boyuna kadar bu patojenlere maruz kalırlar (Korsnes ve diğ., 2006). Belirli bir patojene karşı balık direncini artırmak diğer patojenlere karşı koruma sağlamadığından kültür balıkçılığı bu çok sayıdaki farklı patojenlere karşı savunmasızdır (Wu ve diğ., 2012). Bunun yanında, erken dönemde başta larvalar olmak üzere bağışıklık sistemi tam gelişmemişken veya ileriki yaşlarda direncin zayıf düştüğü zamanlarda balıklar patojenlere karşı hassas durumdadırlar. Buna karşın balıklarda doğal bağışıklık sisteminin güçlendirilmesiyle enfeksiyonlara karşı geniş spektrumlu direnç sağlanabilir. Bu yöntemin kültür balıkçılığında sağlıklı balık üretiminin geliştirilmesinde kullanıldığı ve başarılı sonuçlar alındığı bilinmektedir (Gopalakannan ve Arul, 2006). Bu amaçla günümüzde birçok çiftlik ve kuluçkahaneler viral, bakteriyel, parazitel ve fungal

hastalıkları önlemek için antibiyotikler (profilaktik), aşılar ve kemoterapötik ajanlar yanında immünoestimülant etkili bileşikler de kullanılmaktadırlar (Anderson, 1992a; Düğenci ve diğ, 2003). Ticari immünoestimulanların elde edildikleri kaynaklar bakteriler, bitkiler ve alglerden türetilenler, hayvanlardan türetilenler, immünoestimülant olan besinsel faktörler ve hormonlar/sitokinlerdir (Sakai, 1999). Bitkisel kökenli sekonder metabolitlerin (Goyal ve Maheshwari, 2012) yanında bakteriyel hücre duvarından elde edilen bileşiklerin varlığı uzun yıllardır bilinmektedir (Nikl ve diğ, 1993; Kodama ve diğ, 1993; Matsuo ve Miyazano, 1993; Solem ve diğ, 1995; Meena ve diğ, 2013).

İmmünoestimulantların akuakültürdeki yararlı kullanımına rağmen mevcut maya kökenli ticari formülasyon ürünler β 1-3, β 1-6 glukanlarda olduğu gibi oldukça sınırlıdır ve Macroguard markası altındaki (Immersion Grade, AquaSol gibi) ürünler bunlara örnek verilebilir (Bricknell ve Dalmo, 2005). Diğer bir başarılı ticari immünoestimülant olarak aljinat ve polisakkarit içeriği zengin alg unu kökenli Ergosan sayılabilir. Tek doz 1 mg Ergosan alabalıklarda enjeksiyondan bir gün sonra nötrofil oranını çoğaltmış, fagositoz düzeyini ve interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-8 (IL-8) ve peritoneal lökositlerde TNF- α ifadelerini artırdığı bildirilmiştir (Peddie ve diğ, 2002). Ancak bu bileşiklerin bütün hastalıklara karşı etkili olamayacağı da önemle vurgulanmaktadır (Sakai, 1999). Bu duruma bağlı olarak, ilgili araştırmalar artarak devam etmekte ve günümüzde bilim dünyası mevcut kaynaklar yerine çoğunlukla mikrobiyal kaynaklı sekonder metabolitlerin biyoaktif bileşenleri üzerinde yoğunlaşmıştır (Wang ve diğ, 2010).

Balık hastalıklarının önlenmesinde ve kültür balıkçılığında doğal immünoestimülant kullanımı umut verici görülmektedir (Anderson, 1992b). Doğal ürün araştırmalarında amaç farklı kimyasal yapılarda küçük doğal bileşiklerin izole edilmesi olmakla birlikte doğal ürünlerin ekolojik olması ve insan sağlığına zararlı bileşikleri içermemesi yönüyle de önem kazanmıştır. Denizel funguslar arasından antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri yüksek metabolitlerin seçilerek bağışıklığı teşvik edici potansiyelleri yönüyle alabalıklarda ilk kez sunulan bu tez çalışması ile incelenmiştir. Sakai (1999)'a göre immünoestimulanlar geldikleri kaynaklara bağlı olarak bakteriyel, alg kökenli, hayvansal kökenli, hormonlar, sitokinler ve besinsel faktörler olarak birkaç gruba ayrılmış ve bunların arasında fungus kökenliler yer

almamıştır. Bu nedenle çalışma bulguları ile önceki araştırma bulgularını tam anlamıyla karşılaştırmak mümkün olmayabilir.

Su ürünleri yetiştiriciliğinde hastalık etmenlerine karşı doğal antibiyotik, antioksidan ve immünoestimülant özellik gösteren doğal ürünlerin kullanımı ve bu özelliklere sahip kaynakların potansiyel ürün olarak araştırılması yaygın bir uygulamadır (Awad ve diğ, 2013; Vaseeharan ve Thaya, 2014; Reverter ve diğ, 2014; Roohi ve diğ, 2016; Veerasamy ve diğ, 2014). Doğal immünoestimulanlar biyolojik olarak uyumlu, parçalanabilen ve çevre ve insan sağlığı için güvenlidirler (Meena ve diğ, 2013). Bu özelliklerinden dolayı günümüzde akuakültürde hastalıkların kontrolünde yoğun olarak kullanılmakta olan ilaçlara, kimyasallara ve antibiyotiklere alternatif oluşturmaktadırlar. Bitkiler, ağaçlar, algler, denizler gibi birçok konakçıda ve çeşitli ortamda yaşayan fungal kaynaklardan doğal bileşiklerin izolasyonu yapılmakta ve bunlar farmasötik, tıp, ziraat gibi alanlarda kullanılmaktadır (Schulz ve diğ, 2002; Proksch ve diğ, 2003). Konakçı ile karşılıklı yararlılık ilişkisi içinde bulunan endofitik funguslar, konakçısı olduğu bitkilerin abiyotik ve biyotik streslere karşı toleransını artırmaktadır (Bae ve diğ, 2008). Konakçı dışında kültürü yapıldığında ise bu fungusların immün baskılayıcıları da içeren sayısız önemli metabolitleri ürettikleri bilinmektedir (Lien, 1990; Priti ve diğ, 2009). Bu tez çalışmasında, süngerlerle birlikte yaşayan fungusların da immünoestimülant aktivite gösterdikleri önceki çalışmalara benzer olarak ve ayrıca genetik ifadeler üzerinden ortaya konulmuştur. Karasal bazı fungal türlerin antimikrobiyal ve antioksidan gibi doğal ürün potansiyelleri birçok çalışmada ortaya çıkmıştır (Özkaya ve diğ, 2013). Ayrıca, endofitik funguslardan elde edilen sekonder metabolitlerin bitkisel metabolitlere oranla avantajları da rapor haline getirilmiştir (Priti ve diğ, 2009). Bütün bu veriler değerlendirildiğinde denizel süngerlerle birlikte yaşayan bazı fungal türlerin immünoestimülant etkili doğal ürün potansiyellerinin olabileceği hipotezi bu tez çalışması kapsamında doğrulanmıştır.

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda fungal kaynaklar arasından, *Candida albicans* ve ekmek mayası *Saccharomyces cerevisiae* üzerine yoğunlaştığı ve fungusların hücre duvarında PAMPs (patojen ilişkili moleküler kalıplar) olarak kabul edilen β -glukanların immün sistemin uyarılmasında sıklıkla kullanıldığı anlaşılmaktadır (Jouault ve diğ, 1995; Douglas ve diğ, 1997; Tada ve diğ, 2002). 1.3/1.6 β -glukan dallanmasından oluşan MacroGard® balıklar da dahil olmak üzere çiftlik

hayvanlarının yem içeriğinde kullanılmaktadır (Pionnier ve diğ, 2013). β -glukan verildikten sonra salmonid türü balık makrofajlarında fagositosiz gibi doğal bağışıklık cevaplarının arttığı çeşitli araştırmalarda tespit edilmiştir (Meena ve diğ, 2013). İmmünostimulan etkili bileşikler hem spesifik hem de spesifik olmayan bağışıklık sistemlerinin gelişmesine bağlı olarak enfeksiyon hastalıklara karşı direnci artırmaktadır (Altınterim, 2011). İmmün sistem β -glukanda olduğu gibi patojen ilişkili moleküler kalıplar (PAMP) vasıtasıyla takviye kuvvetleri tecrübe eder ve bunların varlığıyla Mercan *Pagrus auratus*, Çipura *Sparus aurata* ve Levrek *Dicentrarchus labrax* balıklarında bildirildiği üzere makrofaj sayısını ve aktivitesini, fagositozu, sitotoksiteyi ve lizozim aktivitesini artırabilir (Cook ve diğ, 2003; Rodríguez ve diğ, 2003; Vazzana ve diğ, 2003). Yakın zamanda funguslar ve konakçılarının doğal immün sistemi arasında da PAMP ve kalıp tanıma reseptörleri (PRR) ile bağlantılı benzeri ilişkiler tanımlanmıştır (Sorrell ve Chen, 2009). PRR molekülleri patojenler veya hücrel stresle ilgili molekülleri tanımak için bağışıklık sistemi hücrelerince üretilen proteinlerdir (Rebl ve diğ, 2010) ve enflamasyonu teşvik eden sitokinlerin akışını başlatarak fagositoz, solunum patlaması, sitotoksik yetenekler, antiviral aktivitelerin ve kademeli olarak bütün aktivitelerin artırılmasını teşvik edebilirler (Solem ve diğ, 1995; Tadiso ve diğ, 2011).

Tez çalışması kapsamında yapılan deneyler sonucunda fungal suşlardan elde edilen özütün gökkuşadı alabalığı immün genleri üzerinde etkileri olduğu moleküler analizler sonucunda ortaya konulmuştur. Ülkemiz kıyılarında yaşayan *Spirastrella cunctatrix* süngerinden izole edilen *P. atrovenetum* fungal özütünün doğal ürün potansiyeli antibakteriyel ve antioksidan aktivitesi yönüyle taranmıştır. İzole edilen funguslar içinde en yüksek antibakteriyel ve antioksidan aktivite gösteren bu fungusun ham özütünün bağışıklık sistemine olan etkisi ise *in vivo* olarak tespit edilmiştir.

Atlantik salmonlarda (*Salmo salar*) β -glukanların oksidatif patlama aktivitesini stimule ettiği *in vitro* olarak gösterilmiştir (Jorgensen ve Robertsen, 1995). Aynı zamanda yem ile verilen β -glukanların faydalı etkileri *in vivo* olarak gözlenmiştir (Manes ve diğ, 1999). Zebra balığı (*Danio rerio*) larvaları ile yapılan *in vivo* tarama modellerinde ise β -glukan uygulanan larvalarda *Vibrio anguillarum*'a karşı artan dirençle beraber TNF- α gibi sitokinlerin ekspresyonunun uyarıldığı görülmüştür (Oyarbide ve diğ, 2012).

Önceki çalışmalar dikkate alındığında, bağışıklık uyarıcı maddelerin başlıca ve büyük etkilerinin sitokinler ve immün sistemle ilişkili genler üzerinde olduğu görülebilir (Meijer ve diğ., 2005; Rojo ve diğ., 2007; Watzke ve diğ., 2007; Rodriguez ve diğ., 2008; Novoa ve diğ., 2009; Pressley ve diğ., 2005; Oyarbide ve diğ., 2012). Bunlara ilaveten, çalışmalarımızda seçilen genler IL-1 β ve TNF- α , ortamda bir inflamatuvar cevap olup olmadığının anlaşılmasında indikatör görevi gördükleri bilinmektedir (Pérez-Sánchez ve diğ., 2011). Elde ettiğimiz sonuçlar fungal özütün bir inflamatuvar cevap oluşturduğunu kanıtlamaktadır.

Gen ekspresyonu, DNA'da mevcut olan genetik bilginin mRNA ve protein düzeyinde ifade edilmesidir (Yüzbaşıoğlu, 2008). mRNA transkripsiyonu seviyelerindeki değişiklikler pek çok biyolojik süreç için kritik olup organ, doku ve hücrelerin özgül olarak gen düzeyinde kantitatif analiz fırsatı vermektedir. RT-qPCR çeşitli bileşiklerin veya çevresel koşulların organizmaları ve hücreleri moleküler seviyede nasıl etkilediği ve hangi ölçüde bir genin belli bir zamanda eksprese olduğunun ölçülmesinde sıklıkla uygulanmaktadır (Carey, 2007). Bu metot birçok biyolojik matriste ve uygulamada sınırlı sayıdaki genler için çok farklı örnekte ekspresyon seviyelerinin ölçülmesine olanak sağlamaktadır (Bustin ve diğ., 2009). Örneğin bitkisel kaynaklı çalışmalardan biri olarak, kakao bitkisi *Theobroma cacao*'nun kuraklık ve diğer stresli ortamlarda vermiş olduğu cevaba göre değiştirmiş olduğu gen ifadeleri incelenebilmektedir (Bae ve diğ., 2008). Burada en önemli olan ayrıntı ise ilgilenilen genin ekspresyon düzeyinin incelenebilmesi için, farklı şartlarda ekspresyonu değişmeyen bir başka gen ürünü mRNA ile normalizasyon gerekliliğidir. Bunun için çeşitli doku ve hücre tiplerinde ekspresyon düzeyi en az değişim gösteren β -actin, GAPDH ya da elongasyon faktör alfa (EF1- α) gibi genler kullanılmaktadır (Cerezuela ve diğ., 2013). Sunulan bu çalışmada referans olarak uzama faktörü kullanılmıştır ve kontroller ile metabolit uygulanan balıklarda seçilen genlerin karşılaştırmaları buna göre yapılmıştır.

Yapılan literatür çalışmalarında, immün yanıt ile ilişkili olan araştırmalarda bazı sitokin ve interlökinlerin ekspresyonlarına bakılmaktadır. Sitokinler hücrelerin birbirleriyle iletişimini sağlayan protein grubu olup Watanuki ve diğ. (2009), araştırmalarda bunlardan TNF- α ve interlökinlerin sıklıkla tercih edildiği görülmüştür. Bu genler çoğunlukla enflamasyon yolağında önemli rol oynar (Laing ve diğ., 2001; Aoki ve diğ., 2008; Saurabh ve Sahoo, 2008; Hjelmeland ve diğ., 1983;

Grind ve diğ., 1988; Panigrahi ve diğ., 2011; Fierro-Castro ve diğ., 2013). Sekonder metabolitlerin kullanım alanları ile ilgili yapılan araştırmalar yine son yıllarda artış göstermekle birlikte bu maddelerin balıklarda antimikrobiyal ajan olarak kullanımı veya immün genlerle olan etkileşimleri ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Plasmid DNA, lactoferrin ve β -glucan gibi immünoestimulanların denendiğı bir çalışmada, Zhang ve diğ. (2009) tarafından, yavru gökkuşuğı alabalığına (iki farklı dozda (0.1 mM, 1.0 mM), bir hafta arayla 4 kez ve banyo yoluyla verilmesi incelenmiş, yöntemin balıkta hastalık direncini arttırdığı bildirilmiştir. Çalışmada bütün immünoestimulant gruplarında, ilk banyodan sonra 1 ve 3'üncü günde TNF- α ekspresyonunda önemli derecede artış sağlanmıştır. Aynı zamanda bu çalışmada, banyo sonrası 24 saatte bütün gruplarda IL-1 β ve TNF- α 'nın inflamatuvar cevaplara karşı (bakteriyal ve viral enfeksiyon) ifade olduğu gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında elde ettiğimiz gen ekspresyonlarını Zhang ve diğ. (2009)'nin çalışma sonuçlarıyla karşılaştırdığımızda ilk dikkat çeken konu gen ifadelerinin kaç kat değiştiğidir. Bu araştırmacılar denedikleri 3 farklı saf immünoestimulant ile IL-1 β için yaklaşık 20 kat ve TNF- α için yaklaşık 7 kat fazla ifade değişimi bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise ham özüt (20 mg) ile iki doz uygulandıktan beş gün sonra IL-1 β için daha düşük, TNF- α için ise çok daha yüksek oranlar bildirilmesine rağmen, etken bileşiğinin ham özüt içerisindeki miktarının çok düşük düzeylerde bulunduğu ve ham özüt içerisindeki oransal miktarına göre etkinin değiştiğı unutulmamalıdır (Sarker ve diğ., 2006). Bu durumda ilerleyen aşamalarda molekül düzeyinde yapılacak çalışmaların önemi artmaktadır. İki çalışma arasındaki diğere önemli farklılık ise immünoestimulant maddenin balıklara verilış yöntemleridir. Yavru balıklara enjeksiyondan ziyade banyo veya ağız yoluyla yem içinde uygulama yapılması gerekmektedir ve bizim çalışmamızda henüz sadece enjeksiyon denemeleri yapıldığından yavru balıklardaki etkileri de çalışılabilecek diğere önemli araştırma konusu olarak dikkat çekmektedir. Benzeri şekilde β -glukanların immün uyarıcı etkileri diğere balıklarda da gösterilmiştir. Örneğinin ağız yoluyla verildiğinde doğal bağışıklık sistemine ait faktörlerin miktarında olduğu kadar bakteriyel enfeksiyonlara karşı olan dirençte de artış sağlamaktadır (Bagni ve diğ., 2005; Misra ve diğ., 2006). Daha önceki araştırmacılar tarafından β -glukan ile zebra balığı larvaları üzerinde daldırma denemeleri yapılmış ve TNF- α ekspresyonunu artırdığı, daha uzun süreli muamelenin ve yaşca daha büyük olan larvaların daha fazla etkilendiğı bildirilmiştir.

Buna göre β -glukan kullanımında olduğu gibi enjeksiyonla immünostimülant etkisi bilinen fungal özüt ile balıklar banyo yoluyla muamele edildiğinde benzeri etkiler beklenebilir.

Başka bir doğal ürün çalışmasında *L. garvieae* patojenine karşı probiyotikli yemlerle 36 gün boyunca beslenen gökkuşacağı alabalığı böbrek ve bağırsaklarında dört sitokin ifadesine (IL-1 β , IL-8, IL10 ve TNF- α) bakılmıştır (Pérez-Sánchez ve diğ., 2011). Araştırmacılar bu çalışmaları sonunda, IL-1 β , IL10 ve TNF- α ifadelerinin önemli derecede artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Yine yapılan bu çalışmada, IL-1 β yaklaşık 10 kat ve TNF- α 'nın ise yaklaşık 25 kat üretiminin uyarıldığı bulunmuştur. Çalışmamızda immünostimülant madde olarak kullandığımız fungal özütün IL-1 β ve TNF- α gen ekspresyonları üzerine etkisi, Pérez-Sánchez ve diğ. (2011)'nin kullandıkları probiyotiklere yakın oranlarda artış sağlarken, yine benzer olarak TNF- α üzerine daha etkili bulunmuştur. Ayrıca çalışılan dokular karşılaştırıldığında, gökkuşacağı alabalığının böbrek ve bağırsağındaki immün ilişkili gen ifadelerine bakılan önceki çalışmaya karşın sunulan tez çalışmamızda kan değerlerindeki sitokin ifadeleri incelenmiş ve sonuçta, sitokin gen ifadelerinin benzeri değişimler gösterdiği bulunmuştur.

Wang ve diğ. (2010) yaptıkları çalışmada sazanlarda (*Cyprinus carpio*) bakteri kökenli immünostimülant maddenin fraksiyonlarını (cyclo-(L-Pro-Gly)₂ ve 4-trans-hydroxy-L-proline) balıklara karıncı enjeksiyonla vermişlerdir. Kan parametrelerinin gen ekspresyonları sonucunda INOS ve IL-1 β gibi immun genleri önemli ölçüde up-regüle ettiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda fraksiyonlanmamış fungal kökenli ham özütün TNF- α ve IL-1 β gen ekspresyonlarını artırması diğer biyoaktivitelere (antimikrobiyal, antioksidan, antifungal) olduğu gibi bağışıklık düzenleyici olarakta bakteriyel ve fungal sekonder metabolitlerin benzer etkiler gösterdiklerini ortaya koymuştur. Her iki çalışmada kullanılan gen olarak IL-1 β karşılaştırıldığında ise önceki araştırmacılar uygulamadan yedi gün sonra bir kat 14 gün sonra en yüksek 1.5 kat ifade artışı ile kullandığımız fungal ham özütten daha düşük uyarıcı etki bildirmişlerdir. Ham özütle bakteriyel kökenli bileşiğin karşılaştırıldığı düşünüldüğünde fungal özütün çok daha etkili bir doğal ürün potansiyeli taşıdığı söylenebilir. Bu aşamada önemli olan eksiklik ham özütün gösterdiği etkinin belli bir bileşik veya tek bir molekül düzeyinde var olduğunun ya da farklı bileşiklerin etkileşimi sonucu sadece ham özütte bulunduğu tespiti

konusudur. Bu durumda ham özütün kimyasal karakterzasyonunun ve bileşikler düzeyinde denemelere devam edilmesinin zorunluluğu anlaşılmaktadır.

Balıklar için immünostimülant olarak bazı medikal bitkilerin kullanılması, doğal immünostimülant kullanımına dikkat çeken önemli uygulamalardandır. Dügenci ve diğ. (2003) bir araştırmalarında gökkuşağı alabalıklarının *Zingiber officinale* bitkisinin %1'lik dozuyla beslenmesi sonucunda nötrofillerin 3 hafta boyunca uyarıldığını göstermiştir. alışmalarında, zencefil ile beslenen balıkların, diğer diyetler ile beslenen balıklara göre ekstraselüler aktivitesinin önemli derecede daha fazla olduğu bulunmuştur. Bir başka araştırmada ise, β -glukanın farklı dozlarıyla beslenen Atlantik salmon (*Salmo salar*), gökkuşağı alabalığı ve sazan (*Cyprinus carpio*) balığı türlerinde intraselüler aktivitenin arttığı rapor edilmiştir. Bunun yanında, hücre içi aktivitenin, 3 farklı immün uyarıcı (MacroGard, *Candida Utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*) besin maddesi ile beslenen balıklardan özellikle alabalıkta yüksek olduğu bildirilmiştir. Sonuçta, bitkisel metabolitin kan parametreleri üzerine etkisine bakılmış ve kan lökositlerin fagositik aktivitesi yüksek bulunmuştur. Kan lökositlerin fagositik aktivitesi, bitki özleri içeren gıdalarla beslenen alabalıkta artış göstermiştir. Bizim alışmamızda özütün etkisi yine kanda incelenmiş fakat bu çalışmada moleküler düzeyde ortaya konulmuş ve gen ifadelerinin fungal metabolit enjeksiyonu sonrası etkilendiği anlaşılmıştır. Özellikle, inflamatuvar yanıtta önemli bir mediyatör ve bağışıklık cevapta teşvik edici olarak bilinen IL-1 β (Low ve diğ, 2003) ifadesinde yaklaşık 11 kat artış sağlanması *P. atrovenetum* fungusunun bu anlamda alabalığın bağışıklık sistemi üzerinde dikkat çekici bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

Watanuki ve diğ. (2006) yapmış oldukları çalışmada, hastalık direncini arttırıcı özelliği için bir alg türü olan *Spirulina* kullanmışlardır. *Spirulina* ile beslenen sazan (*Cyprinus carpio*) balıklarından uygulama sonrası 1, 3 ve 5. günlerde yapılan örneklemelele fagositoz ve süperoksit anyon üretimi dahil olmak üzere spesifik olmayan (non-spesifik=doğal) savunma mekanizmalarının parametrelerini incelemişlerdir. Çalışma sonunda, spirulinanın böbrek fagositik hücrelerinde, fagositik aktivite ve süperoksit anyon üretimi yanıtlarını arttırdığını göstermiştir. Ayrıca, bizim çalışmamıza paralel olarak IL-1 β ve TNF- α genlerinin de ekspresyonları spirulina uygulanan balıklarda yükselmiştir.

Yüksek fagositik aktivite ile IL-1 β genindeki ifade artışı arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir (Low ve diğ, 2003). Bu bağlamda, gen ifadelerindeki artışla birlikte fungal özüt verilen alabalıklarda da fagositik aktivite ve süperoksit anyon üretimi gibi benzeri aktivitelerde de artış gözlemlenebilir. Bu amaçla bundan sonraki çalışmalarda bu aktivitelerin de incelenmesi gerekmektedir. Aynı zamanda, spirulina ile IL-1 β ve TNF- α genlerinin ifadesinin balık tedavisinde iyileştirici yönde katkısının olduğu bulunmuştur (Watanuki ve diğ, 2006). Ayrıca, huIFN- α uygulanan balıklarda IL-1 β ekspresyonunun artması gelişen bir bağışıklık yanıtın güçlü belirtisi olarak ifade edilmektedir (Watanuki ve diğ, 2009). İmmüno stimulant verilen Atlantik somon balığında, alabalıklarda ve sazanlarda IL-1 β gen ekspresyonundaki artışı gösteren başka çalışmalar da bulunmaktadır (Jørgensen ve diğ, 2001; Kono ve diğ, 2002). Buna göre denemede kullanılan fungal özütün de balıklarda görülen hastalıklarda in vivo olarak çalışılması düşünülebilir. Bütün bu bulgular ve diğer çalışmalardan anlaşılan, enjekte edilen fungal özütün alabalıkların doğuştan gelen immün sistemi üzerinde immüno stimulant etkileri olduğunu kanıtlamaktadır. Buna ilaveten diğer balıklarda da immün fonksiyonun gelişmesine katkıda bulunabileceğini aynı zamanda, artan hastalık direnci, hayatta kalma ve büyüme oranlarının gelişimini arttırıcı etkilerinin bulunabileceğini göstermektedir. Reyes-Becerril ve diğ. (2013) çipura balıkları üzerinde yaptıkları çalışmada, *Navicula* mikro alg ve *L. sakei* 5-4 probiyotiği ile zenginleştirilerek oluşturulan silajı, ayrı ayrı yem içeriğinde kullanmışlar ve bağışıklıkla ilişkili genlerin ekspresyonlarına bakmışlardır. Balıkların böbrek ve bağırsaklarından alınan dokularında IL-1 β gen ekspresyonu incelendiğinde ve bizim çalışmamız ile karşılaştırıldığında, 2. hafta da yapılan örneklemede sadece mikroalg verilende yaklaşık olarak böbrekte 8, bağırsakta 9 kat, zenginleştirilmiş silaj verilen balıklarda ise yaklaşık olarak böbrekte 10, bağırsakta 70 kat artışlar bildirilmiştir. 4. hafta yapılan örneklemede ise gen ekspresyonlarının ciddi oranda (1000 kat) artarak up-regüle olduğu rapor edilmiştir. Uzun süreli beslenmenin verilen doz miktarını artırdığı düşünüldüğü zaman, bizim çalışmamızda kullandığımız fungal özütün miktarının bu çalışmaya göre çok az kaldığı, ham özüt yerine etken bileşiğin izole edilerek balığa verilmesi durumunda benzeri yüksek etkilere daha az doz kullanımlarıyla ulaşılması mümkün olabilir. Mikroalg ile yapılan diğer bir çalışmada *N. gaditana*, *T. chuii* ve *P. tricornutum* türlerinin immün gen ekspresyonları üzerine etkisi yine çipura balıklarında

çalışılmıştır. Alg örnekleri balıklara 4 hafta boyunca yem ile verilmiş, 2. ve 4. hafta sonlarında bağırsak ve böbrek dokularından örnek alınarak EF-1 α , IgM_H, TCR- β , MHC I α , MHC II α , CSF-1R ve β -defensin gibi immun genlerde ekspresyonu analiz edilmiştir. *N. gaditana* ve *T. chuii* alglerinin MHC II α , CSF-1R ve β -defensin genlerini önemli oranda eksprese ettiği, *P. tricornutum* türünün ise ekspresyonları çok az etkilediği rapor edilmiştir (Cerezuela ve diğ, 2012).

Bir başka çalışmada ise yem içeriğinde inülin, mikroalgler (*Tetraselmis chuii* ve *Phaeodactylum tricornutum*) ve *Bacillus subtilis* (tek olarak veya inülin veya alglerle kombine edilerek) verilmesinin yine çipura bağırsaklarındaki farklı genlerin ifadeleri üzerine etkilerine bakılmış ancak IL-1 üzerinde önemli bir değişim sağlanmadığı bildirilmiştir (Cerezuela ve diğ, 2013).

İmmünostimülan maddelerle yapılan bir diğer çalışmada, Kristian Raida ve Buchmann (2009) *Yersinia ruckeri* ile birincil ve ikincil enfeksiyonlara karşı gökkuşağı alabalığında doğal immün yanıtı incelemişlerdir. Araştırmacılara göre *Y. ruckeri* aynı ve değişen dozlarda balığa verilmesiyle ölüm oranının önemli derecede azaldığı ve hayatta kalma oranının pozitif yönde değiştiği gözlenmiştir. Aynı zamanda, enfeksiyonun üçüncü gününde karaciğer sitokinlerinden IL-1 β (67.5 kat) ve TNF- α (13 kat) genlerinde belirgin bir artış bildirilmiştir. Ayrıca, TNF- α 'nın inflamasyon ve immünitede önemli bir role sahip olduğunu belirtmişlerdir. TNF ile ilgili olarak ayrıca, LPS uygulanan alabalıktan izole edilen böbrek lökositlerinde ve bir makrofaj hücre hattında TNF- α ifadesinin uyarıldığı gösterilmiştir (Raida ve Buchmann., 2009). Buna ek olarak yine alabalıklarda, rekombinant TNF- α (rTNF- α)'nın in vitro fagositozu ve lökosit göçünü yükselttiği ve IL-1 β , IL-8, TNF- α 1, TNF- α 2 ve COX2 gibi çeşitli genlerin ekspresyonunu başlattığı gösterilmiştir (Raida ve Buchmann, 2009). Bütün bunların sonucunda *Y. ruckeri*'nin enfeksiyonunu takiben ortaya çıkan TNF- α gen ifadesi bu sitokinin erken inflamatuvar reaksiyonlarında rol aldığı görüşünü desteklemektedir. Sunulan tez çalışmasında, aynı genin daha yüksek oranda up-regüle olduğu bulunmuştur. Bu sonuçların enfekte balık ile özüt verilen balıktaki durumun karşılaştırılması açısından önemli ve özütün deneysel enfeksiyonda kullanımının araştırılması için ilgi çekici olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca ileriki aşamalarda bu sitokinin ham özüt yerine bileşik düzeyinde taranması veya farklı fungal özütlerle denenmesi daha iyi sonuçların çıkmasına sebep olabilir. Behera ve diğ. (2011) yılındaki çalışmasında,

intraperitoneal olarak enjeksiyon yoluyla curcumin uygulanan *Labeo rohita* türü balıklarda nonspesifik immün parametrelerin arttığı belirlenmiştir. Curcuminin farklı dozlarının oral yolla uygulandığı bu çalışmada da lökosit düzeyinde belirlenen artış araştırmacının sonuçlarını destekler niteliktedir. Sonuç olarak incelenen parametreler çerçevesinde, curcuminin balıklarda bazı hematolojik parametreleri olumlu yönde etkilediği vurgulanmıştır. Elde edilen bu bulgular ışığında güçlü bir antioksidan olan curcuminin oksidatif strese karşı kullanılabilirliğinin yanı sıra balıklarda immünoestimülant olarak kullanılabilme potansiyelinin olduğu, fakat bu bulguların farklı parametreler kullanılarak farklı balık türlerinde yapılacak yeni çalışmalarla desteklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Bizim çalışmamızda da yüksek antimikrobiyal ve antioksidan özelliğe sahip fungal özüt intraperitoneal olarak balığa enjeksiyon yoluyla verilmiştir. Bu özelliklerle immünoestimülant aktivite arasında bağlantı olup olmadığı bilinmemekle birlikte doğal ürün taramasında, sitotoksik olmamak kaydıyla, bu özellikleri taşıyan özütlerin öncelikli olarak taranması uygun olabilir. Bu anlamda yeni çalışmaların planlanması gerektiği ve varsa bu bağlantıların araştırılması uygun olacaktır.

Probiyotik beslenmenin bağışıklığın düzenlenmesi üzerine etkisine bakılan bir diğer çalışmada, Panigrahi ve diğ. (2007) probiyotik (*L. rhamnosus*, *E. Faecium*, *B. subtilis*) ilave edilmiş yemlerle beslenen gökkuşuğu alabalığının böbrek ve dalağında sitokin genlerin ekspresyonlarına bakılmıştır. Önceki yapılan çalışmalarda, probiyotiklerle aynı etkiye sahip olan ve aynı zamanda metabolit olan ACH 50' nin non-spesifik humoral cevapları arttırdığı gösterilmiştir. Ancak bu çalışmada ilginç olan, *E. faecium* ve *L. rhamnosus*'un kontrol gruplarıyla karşılaştırılmasıyla böbrek ve dalakta IL-1 β ifadesinin önemli derecede artarken IL-1 β 2 ekspresyonunda herhangi bir etki olmadığı gösterilmiştir. IL-1 β 1 molekülü memelilerde doğrudan ve dolaylı antibakteriyel etkileri uygulayıcı olarak bilinmektedir (Panigrahi ve diğ, 2007). Sonuç olarak, bu araştırmacılar probiyotik beslenme ile gökkuşuğu alabalığında sitokin genlerden IL-1 β ve TNF1 ifadelerinde β -aktine nispeten 40-45 kat artışlar bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda kullandığımız kontrol grubu farklı olup gen ifadeleri IL-1 β açısından düşük kalmıştır.

Dörücü ve diğ. (2005), yaptıkları çalışmada, iki farklı dozda 21 gün süreyle uygulanan antioksidan ve immünoestimülant özellikteki likopenin pullu sazanda hematokrit düzeyini istatistiksel olarak arttırdığını gözlemlemişlerdir. Bir başka

çalışmada, immünoestimülant özellik gösteren curcuminin hematokrit düzeyini arttırdığı belirlenmiştir (Jagetia ve Aggarwal, 2007). Sonuç olarak, yapılan tüm bu çalışmalara bakıldığında; bitkisel, hayvansal, bakteriyel, algal v.b. organizmalardan izole edilen ve antimikrobiyal/antioksidant gibi özellikleri bilinen metabolitlerin balık bağışıklık sistemi üzerindeki immün modülatör etkilerinin de olduğu anlaşılmaktadır. Sunulan bu araştırmayla birlikte fungal metabolitlerin de antimikrobiyal/antioksidant aktiviteleri yanında alabalıkların doğal bağışıklık yanıtını hücresel boyutta etkilediği tespit edilmiş ve potansiyel immünoestimülant etkili metabolit kaynağı olarak *P. atrovnetum* fungusunun değerlendirilebileceği önerilmiştir.

Farklı fiziksel ve kimyasal koşullar altında yaşayan denizel mikroorganizmalar yeni kimyasal yapıların sentezinde önemli bir kaynak oluşturmaktadırlar ve henüz bu çeşitliliğin çok az bir kısmının aydınlatılabildiği düşünülmektedir. Doğal ürün araştırmalarında özellikle mikroorganizmaların küçük ve farklı doğal molekül potansiyelleri büyük ilgi çekmektedir. Dünya genelinde yapılan doğal ürün araştırmalarında amaç farklı kimyasal yapılarda küçük doğal bileşiklerin izole edilmesidir. Sunulan çalışma ile bu ürünlerin önemli üreticilerinden denizel funguslar Ege Deniz'inden toplanan örnekler üzerinden araştırılmıştır. Sucul bakteriyel patojenlere karşı antibakteriyel aktivite yanında dünyada ilk kez balıklarda immünoestimülant etkiye sahip fungusların keşfi de tez konusunun en önemli bulgularından biri olmuştur. Yeni ya da daha aktif moleküller mevcut olanların alternatifi olabilir.

Büyük oranda yurt dışı kaynaklı olan benzeri ürünlerin ülkemiz ihtiyaçları doğrultusunda ve ülke kaynakları kullanılarak geliştirilmesi ise dışa bağımlılığı azaltabilir. Yeni ürün eldesine yönelik çalışmaların ülke kaynaklarının korunması, sektördeki küresel rekabet gücümüzün artırılması ve katma değeri yüksek ürünlere dönüşme potansiyeli taşıyan yeni moleküllerin yine ülkemiz sınırları içerisinde ürüne dönüştürülmesinin önemi ölçüsünde değerlendirilip desteklenmesinin zorunlu olduğu düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında yapılan denemeler sonucunda fungal suşlardan elde edilen özütün gökkuşağı alabalığı immün genleri üzerinde etkileri olduğu moleküler analizler sonucunda ortaya konulmuştur. Ülkemiz kaynaklarından elde edilen *P. atrovenetum* fungal özütü doğal immünostimülant potansiyeli yönüyle taranmıştır. İzole edilen funguslar içinde en yüksek antibakteriyal ve aktioksidan aktivite gösteren bu fungusun ham özütünün bağışıklık sistemine olan etkisi in vivo olarak ilk kez bu tez çalışması kapsamında tespit edilmiştir.

Bu amaçla, metabolitlerin balığın bağışıklık sistemi üzerinde immün sistem ile ilişkili TNF- α , IL-1 β ve EF1 gen ekspresyonlarına etkileri moleküler tekniklerle incelenmiş, bir moleküler ve işlevsel tanımlama yapılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmaların tamamı balık sağlığının stratejik olarak geliştirilmesini amaçlayan sürdürülebilir akuakültür için fungus kaynaklı doğal ürünlerin değerlendirilmesine ve immünstimülan olarak yeni ürünlerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

İmmünostimülan etkisi tespit edilen ham özütün kimyasal içeriğinin tanımlanması ve sonrasında etkili bileşiklerin saflaştırılarak molekül düzeyinde taramalara devam edilmesi gerekmektedir. Ayrıca, başka kaynaklar ve yeni örnekler üzerinde tarama çalışmalarına devam edilmesi daha etkili bileşiklerin keşfinde en önemli unsurlardan biridir.

Elde edilen bulgular göstermiştir ki fungal metabolitlerin çok yönlü biyoaktif özellikleri ve farklı alanlarda kullanım potansiyeli değerlendirilebilir. Mevcut kimyasal, antimikrobiyal ve immünostimülanların yerine kullanılabilecek yeni doğal bileşiklerin eldesi ve sonrasında yeni ürün olarak geliştirilmesine bu alandaki çalışmaların desteklenmesi ile imkân sağlanabilir.

KAYNAKLAR

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H.** (2007). Temel İmmünoloji, İstanbul Medikal Yayıncılık, Editörler: Prof. Dr. Yıldız Camcıoğlu, Prof. Dr. Günnur Deniz. 1–223 s.
- Aggarwal, B.B., Natarajan, K.** (1996). Tumor Necrosis Factors: Developments during the last decade. *European Cytokine Network*, 7, 93–124.
- Agarwal, S.K., Sushma, V., Singh, S.S., Tripathi, A.K., Khan, Z.K., Sushil K.** (2000). Antifeedant and Antifungal Activity of Chromene Compounds Isolated from *Blepharispermum sbsessile*. *J. Ethnopharmacol*, 71, 231–234.
- Ahne, W.** (1993). Presence of Interleukin (IL-1, IL-3, IL-6) and the Tumor Necrosis Factor (TNF alpha) in Fish Sera. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 13; 106–107.
- Akaylı, T.** (2001). Kültür Çipura Balıklarında (*Sparus auratus*, L., 1758) Vibriosis'in Elisa ve Bakteriyolojik Yöntemlerle Teşhisi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Su Ürünleri Yetiştiriciliği Ana Bilim Dalı (Hastalıklar Bilim Dalı). Doktora Tezi.
- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Ouaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M., Akdis, C.A.J.** (2011). Interleukins, from 1 to 37, and Interferon- γ : Receptors, Functions, and Roles in Diseases. *Allergy Clin Immunol*, Mar;127 (3): 701-21.1-70.
- Akkara, M., Tosun, H.** (2014). Funguslardan Elde Edilen Endüstriyel Ürünler *Journal of Food Technologies*, 9, No: 2, 46-53.
- Albayrak, H., Özcan E.** (2010). Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792*) İnfeksiyöz Pankreatik Nekrozis ve İnfeksiyöz Hematopoietik Nekrozis Virüs Enfeksiyonlarının Varlığının Araştırılması. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 57, 125-129.

- Altınterim, B.** (2011). Balık İmmünolojisi, Bitkisel ve Kimyasal İmmünostimulantlar Fish Immunology, Herbal And Chemical İmmünostimülans; Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der. / Iğdır Univ. *J. Inst. Sci. Tech.* 1(4): 69-76.
- Amarowicz, R., Naczek M., Shahidi, F.** (2000). Antioxidant Activity of Various Fractions of Non-Tannin Phenolics of Canola Hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (7), 2755-2759.
- Anderson, D.P.** (1992a). İmmünostimülans, Adjuvants and Vaccine Carriers in Fish: Applications to Aquaculture. *Annual Review Fish Diseases*, 2: 281–307.
- Anderson, D.P., Jeney, G.** (1992b). İmmünostimülans Added to Injected *Aeromonas Salmonicida* Bacterin Enhance The Defense Mechanisms and Protection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 34: 379–389.
- Anonim.** (2000). Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Genişletilmiş 2. Baskı, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını, Sim Matbaası, 3(13), 522 s.
- Anonim.** (2008). Türkiye İstatistik Kurumu Su Ürünleri İstatistikleri 2007. 48, Ankara.
- Aoki, T.,** (1992). Chemotherapy and Drug Resistance in Fish Farms in Japan. *Diseases in Asian Aquaculture*, vol. 1. Fish Health Section. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 519 – 529 pp.
- Aoki, T., Takano, T., Santos, M.D., Kondo, H., Hirono, I.** (2008). Molecular Innate Immunity in Teleost Fish: Review and Future Perspectives. Fisheries for Global Welfare and Environment, 5th World Fisheries Congress; 263–76.
- Arda, M., Seçer, S., Sarıeyyüpoğlu, M.** (2002). Balık Hastalıkları, Medisan Yayınevi, Ankara, 1-36 s.
- Atay, D., Korkmaz, A.Ş., Polatsüs, S., Rad, F.** (1995). Su Ürünleri Tüketici Projeksiyonları ve Üretim Hedefleri, Doğu Anadolu Bölgesi I. (1993) ve II.(1995) Su Ürünleri Sempozyumu, 201-220, Erzurum.
- Atay, D., Bekcan, S., Ölmez, M., Atar, H.H.** (2002). Ginogenetik Teknikler Ve Hormonun (17 α -Metilttestosteron) Birlikte Uygulanmasıyla Dişi Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) Üretimi. Tübitak Proje Raporu, Proje No: VHAG-1458.
- Awad, E., Austin, D., Lyndon, A.R.** (2013). Effect of Black Cumin Seed Oil (*Nigella sativa*) and Nettle Extract (Quercetin) on Enhancement of Immunity in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*, 388–391, pp. 193–197.

- Bae, H., Kim, S-H., Kim, M.S., Sicher, R.C., Strem, M.D., Natarajan, S., Bailey, B.A.** (2008). The drought response of *Theobroma Cacao* (cacao) and the Regulation of Genes Involved in Polyamine Biosynthesis by Drought and Other Stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46: 174-188.
- Bagni, M., Romano, N., Finoia, M.G., Abelli, L., Scapigliati, G., Tiscar, P.G., et al.** (2005). Short and Long-Term Effects of a Dietary Yeast B-glucan (Macrogard) and Alginic Acid (Ergosan) Preparation on Immune Response in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Immunology*, 18: 311–325.
- Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S., Lindequist, U.** (2006). Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*, 252, 79–84.
- Behera, T., Swain, P., Sahoo, S.K., Mohapatra, D., Das, B.K.** (2011). Immunostimulatory Effects of Curcumin in Fish, *Labeo rohita* (H.). *Indian J Nat Prod Resour*, 2, 18.
- Behnke, R.J.** (2002). "Genus *Oncorhynchus*". *Trout and Salmon of North America*. Tomelleri, Joseph R. (illustrator). New York: The Free Press. pp. 10–21.
- Bednarska, M., Bednarski, M., Polechonski, R.** (2007). Current Problems of Streptococcal Infections in Fish. *Med Weter*, 63: 783-5.
- Bentley, R.** (2006). From Iso, Sake And Shoyu To Cosmetics; A Century of Science for Kojic Acid. *Nat. Prod. Rep*, 23: 1046.
- Bjornn, T.C., Reiser, D.W.** (1991). Habitat Requirements of Salmonids in Streams. *American Fisheries Society Special Publication*, 19: 83-138.
- Blois, M.S.** (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
- Bobe, J., Goetz, F.W.** (2001). Molecular Cloning and Expression of a TNF Receptor and Two Ligands in the Fish Ovary. *Comparative Biochemistry and Physiology B. Biochemistry and Molecular Biology*, 129, 475–481.
- Bricknell I., Dalmo, R.A.** (2005). The Use of Immünostimülans in Fish Larval Aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 19; 457-472.
- Buonocore, F., Randelli, E., Bird, S., Secombes, C.J., Facchiano, A., Costantini, S.** (2007). Interleukin–10 Expression by Real–Time PCR and Homology Modelling Analysis in the European Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax L.*). *Aquaculture*, 270, 512–522 pp.

- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T.** (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55 (4), 611-622.
- Cantürk, Z.** (2015). Aspergillus ve Penicillium Cinslerine Ait Sekonder Metabolitler ve Sınıflandırılması. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, Cilt: 13, Sayı: 2, Sayfa: 1-8.
- Carey, C. M., Kirk, J.L., Ojha, S., Kostrzynska, M.** (2007). Current and Future Uses of Real-time Polymerase Chain Reaction and Microarrays in the Study of Intestinal Microbiota, and Probiotic Use and Effectiveness. *Canadian Journal of Microbiology*, 53, 537-550.
- Cengizler, İ., Azizoglu, A.Ş.** (2000). Seyhan Baraj Gölü ve Seyhan Nehrinde Yaşayan Aynalı Sazan (*Cyprinus carpio*, linnaeus, 1758)'larda Bazı Kan Parametrelerinin Belirlenmesi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 24: 205-214.
- Cerezuela, R., Guardiola, F. A., González, P., Meseguer, J., Esteban, M. Á.** (2012). Effects of dietary *Bacillus subtilis*, *Tetraselmis chuii*, and *Phaeodactylum tricornutum*, singularly or in combination, on the Immune Response and Disease Resistance of Sea Bream (*Sparus aurata* L.). *Fish & shellfish immunology*, 33 (2), 342-349.
- Cerezuela, R., Meseguer, J., Esteban, M. Á.** (2013). Effects of dietary inulin, *Bacillus subtilis* and microalgae on intestinal gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol*, 34 (3): 843-8.
- Collet, B., Hovens., G.C., Mazzoni, D., Hirono, I., Aoki, T., Secombes, C.J.** (2003). Cloning and Expression Analysis of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Interferon Regulatory Factor 1 and 2 (IRF-1 and IRF-2). *Dev Comp Immunol*, 27: 111-126.
- Cook, M., Hayball, P., Hutchinson, W., Nowak, B., Hayball, J.** (2003). Administration of a Commercial İmmünostimulan Preparation, EcoActiva as a Feed Supplement Enhances Macrophage Respiratory Burst and the Growth Rate of Snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae (Bloch and Schneider) in winter. *Fish Shellfish Immunol*, 14: 333-345.
- Çakmak, E., Kurtoğlu, İ.Z., Çavdar, Y., Aksungur, N., Firidin, Ş., Başçınar, N., Aksungur, M., Zengin, B., Ak, O., Esenbuğa, H.** (2007). Karadeniz Alabalığı (*Salmo trutta labrax Pallas*, 1844)'nın Yetiştiriciliği ve Balıklandırma Amacıyla Kullanımı. Proje Raporu, TAGEM, Proje no: TAGEM/HAYSÜD/2001/07/01/20.
- Çelikkale, M.S.** (1988). İç Su Balıkları ve Yetiştiriciliği. Cilt 1, K. T. Ü. Yayın No:124, 419 s, Trabzon.

- Çelikkale, M.S.** (1994). İç su Balıkları ve Yetiştiriciliği Cilt I. II. Baskı, K.T.Ü. Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Yayınları No: 2, K.T.Ü Basımevi Trabzon, 419 s.
- Çelikkale, M.S., Düzgüneş, E. ve Okumuş, İ.** (1999). Türkiye Su Ürünleri Sektörü; Potansiyeli, Mevcut Durumu, Sorunları ve Çözüm Önerileri. İTO Yay. No:1999-2, İstanbul.
- Dalmo, R.A., Ingebrigtsen, K., Bøgwald, J.** (1997). Non-specific Defence Mechanisms in Fish, with Particular Reference to The Reticuloendothelial System (RES). *Journal of Fish Diseases*, 20, 241–273.
- De Kinkelin, P., Dorson, M.** (1982). Hattenberger-Baudouy AM. Interferon synthesis in Trout and Carp after viral infection. *Dev Comp Immunol*, 2: 167–74.
- Dellai, A., Laroche-Clary, A., Mhadhebi, L., Robert, J., Bouraoui, A.** (2010), Anti-inflammatory and Antiproliferative Activities of Crude Extract and its Fractions of the Defensive Secretion from the Mediterranean Sponge, *Spongia officinalis*. *Drug Dev. Res*, 71: 412–418.
- Demain, A.L.** (1999). Pharmaceutically Active Secondary Metabolites of Microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52: 455-463.
- Di Carlo, F.J., Fiore, J.V.** (1958). On the Composition of Zymosan. *Science*, 127, 756–757.
- Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Carnevali, O., Picchiatti, S., Avella, M., Daniels C, et al.** (2011). Microbial Manipulations to Improve Fish Health and Production - A Mediterranean perspective. *Fish Shellfish Immunol*, 30:1-16.
- Dinarello, C.A.** (1997). Interleukin-1. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 8, 253–265.
- Douglas P.** (1992). İmmünostimülans, Adjuvants, and Vaccine Carriers in Fish: Applications to Aquaculture Anderson; *Annual Rev. of Fish Diseases*, pp. 281-307.
- Douglas, C.M., Ippolito, J.A.D., Shei, G.J., Meinz, M., Onishi, J., Marrinan, J.A. Li, W., Abruzzo, G.K., Flattery, A., Bartizal, K., Mitchell, A., Kurtz, M.B.** (1997) Identification of the *FKS1* Gene of *Candida albicans* as the Essential Target of 1,3-Beta-D-glucan Synthase Inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother*, Vol. 41, No. 11, s. 2471-2479.

- Dörücü, M., İspir, Ü., Türk, C.** (2005). Levamisolün Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, W)'nın Bazı Kan Parametrelerine Etkisinin Araştırılması. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17(2):405-411.
- Dügenci, S.K., Arda, N., Candan, A.** (2003). Some Medicinal Plants as İmmünostimulan for Fish. *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 99–106 pp.
- Eisenberg, S.P., Brewer, M.T., Verderber, E., Heimdal, P., Brandhuber, B.J., Thompson, R.C.** (1991). Interleukin-1 Receptor Antagonist is a Member of the Interleukin-1 Gene Family: Evolution of a Cytokine Control Mechanism. *Proc. Natl Acad. Sci*, 88, 5232±5236.
- Ellis, A.** (1988). Ontogeny of the Immune System in Teleost Fish. (A.E., Ellis, Eds.). Fish Vaccination. *Academic Press Ltd*. London, 20-32 pp.
- El-Neketi, M., Ebrahim, W., Lin, W., Gedara, S., Badria, F., Saad, H.E.A., Proksch, P.** (2013). Alkaloids and Polyketides from *Penicillium citrinum*, an Endophyte Isolated from the Moroccan Plant *Ceratonia siliqua*. *Journal of natural products*, 76 (6), 1099-1104.
- Evans, H.D.** (1998). The Physiology of Fishes. Second Edition, *CRC Pres Boca Raton*, Chapter 6, New York, USA.
- FAO**, (2012). Fisheries and Aquaculture Department, The State of World Fisheries and Aquaculture.
- Fleming, A.** (1929). On The Antibacterial of Cultures of A *Penicillium*, with Special Reference to Their Use in Isolation of B. İnfluenzae. *Brit J Exp Pathol*, 10: 226-36.
- Frisvad, J.C.** (2015). Fungal Biomolecules: Sources, Applications and Recent Developments editör: Vijai Kumar Gupta, Robert L. Mach ,S. Sreenivasaprasad.
- Gao, M., Su, R., Wang, K., Li, X., Lu, W.** (2013). Natural Antifouling Compounds Produced by a Novel Fungus *Aureobasidium Pullulans* HN Isolated from Marine Biofilm. *Mar Pollut Bull*, 77: 172–176.
- Garcia-Castillo, J., Pelegrin, P., Mulero, V., Meseguer, J.** (2002). Molecular Cloning and Expression Analysis of Tumor Necrosis Factor Alpha from a Marine Fish Reveal its Constitutive Expression and Ubiquitous Nature. *Immunogenetics*, 54: 200-207.
- Geldiay, R. ve Balık, S.** (1996). Türkiye Tatlısu Balıkları Ders Kitabı. E. Ü. Su Ür. Fak, No: 46, Ders Kitabı No: 16, İzmir.
- Graham, S., Secombes, C.J.** (1990). Do Fish Lymphocytes Secrete İnterferon-Gamma?. *J Fish Biol*, 36 (4): 563-73.

- Gopalakannan, A., Arul, V.** (2006). Immunomodulatory Effects of Dietary Intake of Chitin, Chitosan and Levamisole on the Immune System of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture* 255: 179–87.
- Goyal, A., Maheshwari, P.** (2012). Frontiers on Recent Developments in Plant science, *Bentham Science Publishers*, s. 182.
- Gökoğlu, N.** (2002). Su Ürünleri İşleme Teknolojisi. Su Vakfı Yayınları, ISBN; 975-9703-48-3. İstanbul, 157.
- Güner, Y.** (2003). Alabalık Yetiştiriciliği. (E. Ü. Su Ürünleri Fakültesi). Ege Üniversitesi; Tarımsal Uygulama Ve Araştırma Merkezi, Çiftçi Broşürü: 43, Ekim.
- Harborne, J.B.** (2001). Twenty Five Years of Chemical Ecology. *Nat. Prod. Rep*, 18, s. 361.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M.S.** (2011). Impact of Plant Products on Innate and Adaptive Immune System of Cultured Ffish and Shellfish. *Aquaculture*, 317, 1–15.
- Hirono, I., Nam, B., Kurobe, T & Aoki, T.** (2000). Molecular Cloning, Characterization, and Expression of TNF cDNA and Gene from Japanese Flounder, *Paralichthys Olivaceus*. *Journal of Immunology*, 165, 4423–4427.
- Holland, J.W, Pottinger, T.G, Secombes, C.J.** (2002). Recombinant Interleukin- 1 Beta Activates the Hypothalamic-pituitary-interrenal Axis in Rainbow Trout, (*Oncorhynchus mykiss*). *J Endocrinol*, 175: s. 261- 267.
- Huising, M.O., Stet, R.J., Savelkoul, H.F., Verburg-van Kemenade, B.M.** (2004). The Molecular Evolution of the Interleukin-1 Family of Cytokines; IL-18 in Teleost Fish. *Dev. Comp. Immunol*, 28, s. 395–413.
- Isaacs, A., Lindenmann, J.** (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond*;147:258-67.
- İnan, G. A., Pınarkara, M.** (2013). Ulusal Kop Bölgesel Kalkınma Sempozyumu.
- Jagetia, G.C., Aggarwal, B.B.** (2007). “Spicing Up” of the Immune System by Curcumin. *Journal of Clinical Immunology*, 27(1):19-35.
- Jang, S.I., Hardie, L.J. & Secombes, C.J.** (1995a). Elevation of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophage respiratory burst activity with macrophage derived supernatants. *Journal of Leukocyte Biology*, 5; 943–947

- Jørgensen, J.B., Robertsen, B.** (1995). Yeast β -glucan Stimulates Respiratory Burst Activity of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Macrophages. *Developmental & Comparative Immunology*, 19, 43–57.
- Jørgensen, J.B., Johansen, A., Stenersen, B., Sommer, A.I.** (2001). CpG Oligodeoxynucleotides and Plasmid DNA Stimulate Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) leucocytes to Produce Supernatants with Antiviral Activity. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 313–321.
- Jouault, T., Lepage, G., Bernigaud, A., Trinel, P.A., Fradin, C., Wieruszkeski, J.M., Strecker, G., Poulain, D.** (1995). Beta-1,2-linked Oligomannosides from *Candida albicans* Act as Signals for Tumor Necrosis Factor Alpha Production. *Infect Immun*, Vol. 63, No. 6, 2378-2381.
- Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S., Kobayashi, M.** (1990). The Immunomodulatory Effects of Levamisole on Rainbow Trout, (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Pathology*, 25: 93-98.
- Kakuta, I.** (1998). Reduction of Stress Response in Carp, (*Cyprinus carpio*) L., Held under Deteriorating Environmental Conditions, by oral administration of bovine lactoferrin. *Journal of Fish Diseases*, 21: 161-167.
- Karabulut, H.A. ve Yandı, İ.** (2006). Su Ürünlerindeki Omega-3 Yağ Asitlerinin Önemi ve Sağlık Üzerine Etkisi. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 23, 1, 339-342.
- Kaya, Y., Duyar, H.A. ve Erdem, M.E.** (2004). Balık Yağ Asitlerinin İnsan Sağlığı İçin Önemi. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 21, 365–370.
- Kearn, G.C.** (1976). Body Surface of Fishes. In: *Ecological Aspects of Parasitology*. Amsterdam, The Netherlands: North-Holland Publishing Company. 185-208 pp.
- Kim, D.H., Austin, B.** (2006). Cytokine Expression in Leucocytes and Gut Cells of Rainbow Trout, (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum), Induced by Probiotics. *Vet Immunol Immunopathol*, 114: 297-304.
- Kitao, O.T., Yoshida, T.** (1986). Effect of an Immunopotentiator on *Aeromonas Salmonicida* Infection in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Vet. Immunol. Immunopathol*, 12, 287–291 pp.
- Kitao, T., Yoshida, T., Anderson D.P., Dixon, O.W., Blanch, A.** (1987). Immunostimulation of Antibody–Producing Cells and Humoral Antibody to Fish Bacterin by a Biological Response Modifier. *J. Fish Biol*, 31, 87–91 pp.
- Kjer, J., Debbab, A., Aly, A.H., Proksch, P.** (2010) Methods for Isolation of Marine Derived Endophytic Fungi and Their Bioactive Secondary Products. *Nat. Protoc.* 5, 479-490.

- Kjørsvik, E., Pittman, K., ve Pavlov, D.** (2004). From Fertilisation to the end of Metamorphosis-functional Development. *In: E. Moksness, E. Kjørsvik ve Y. Olsen (Eds.)*”, Culture of Cold-Water Marine Fish, 204-278. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Kocabatmaz, M. ve Ekingen, G.** (1982). Değişik Tür Balıklardan Kan Örneği Alınması ve Hematolojik Metodların Standardizasyonu. TÜBİTAK Veteriner ve Hayvancılık Araştırma Grubu. Proje No: VHAG – 557. 72 s.
- Kocabatmaz, M.E., Ekingen, G.** (1984). Değişik Tür Balıklarda Kan Örneği Alınması ve Hematolojik Metodların Standardizasyonu. *Doğa Bilim Dergisi*, 2, 149- 159.ü
- Kocaman, E.M., Bayır, A., Sirkecioğlu, A.N., Bayır, M., Yanık, T., ve Arslan, H.** (2009). Comparison of Hatchery Performances of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Brown Trout (*Salmo trutta fario*) and Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) under the Same Environmental Conditions. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8: 7, 1429-1431.
- Kodama, H., Hirota, Y., Mukamoto, M., Baba, T., & Azuma, I.** (1993). Activation of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* phagocytes by muramyl dipeptide). *Developmental & Comparative Immunology*, 17 (2), 129-140.
- Kono, T., Watanuki, H., Sakai, M.,** (2002). The activation of interleukin-1 in Serum of carp, (*Cyprinus carpio*), Injected with Peptidoglycan. *Aquaculture*, 212, 1–10.
- Korsnes, K., Nicolaisen, O., Skar, C. K., Nerland, A. H. ve Bergh, O.** (2006). Bacteria in the Gut of Juvenile Cod, *Gadus morhua*, Fed Live Feed Enriched with Four Different Commercial Diets. *ICES Journal of Marine Science*, 63 (2), 296-301.
- Laing, K.J., Wang, T., Zou, J., Holland, J., Hong, S., Bola, N., Hirono, I., Aoki, T & Secombes, C.J.** (2001). Cloning and Expression Analysis of Rainbow Trout, (*Oncorhynchus mykiss*), Tumor Necrosis Factor-alpha. *European Journal of Biochemistry*, 268; 1315–1322.
- Leisinger, T., Margraff, R.** (1979). Secondary Metabolites of The Fluorescent Pseudomonads. *Microbiological Reviews*, 43, 422-442.
- Lennard, A.C.** (1995). Interleukin-1 Receptor Antagonist. *Crit. Rev. Immunol*, 15, 77±105.
- Lien, E. J.** (1990). Fungal Metabolites and Chinese Herbal Medicine as İmmünostimülans. *In Progress in Drug Research Vol. 34:395.*

- Lister, A., Van der Kraak, G.** (2002). Modulation of Goldfish Testicular Testosterone Production in vitro by Tumor Necrosis Factor Alpha, Interleukin-1 beta and Macrophage Conditioned Media. *Journal of Experimental Zoology*, 292; 477–486.
- Low, C., Wadsworth, S., Burrells, C., Secombes, C.J.** (2003). Expression of Immune Genes in Turbot (*Scophthalmus Maximus*) Fed a Nucleotide-Supplemented Diet, *Aquaculture*, 221 23–40 pp.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker J., Brock.** (2003). Chapter 12 & Chapter 30: Biology of Organisms. Tenth Edition, (416-444) & (966-972).
- Magnadottir, B.** (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*, Vol. 20, 137-151 pp.
- Magnadottir, B., Lange, S., Gudmundsdottir, S., Bøgwald, J., Dalmo, R.A.** (2005). Ontogeny of Humoral Immune Parameters in Fish. *Fish Shellfish Immunol*, 19, 429–439 pp.
- Mañes, S., Mira, E., Gómez-Moutón, C., Lacalle, R.A., Keller, P., Labrador, J. P., Martínez, A.C.** (1999). Membrane Raft Microdomains Mediate Front-rear Polarity in Migrating Cells. *The EMBO Journal*, 18, 6211–6220.
- Matsuo K., Miyazano I.** (1993). The Influence of Long-Term Administration of Peptidoglycan on Disease Resistance and Growth of Juvenile Rainbow Trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59: 1377e9.
- Meena D., Dad P., Kumar S., Mandal S., Prusty A, et al.** (2013). Beta-glucan: an Ideal Immünostimülans in Aquaculture (a review). *Fish Physiol. Biochem*, 39: 431-457.
- Meijer, A.H., Verbeek, F.J., Salas-Vidal, E., Corredor-Adamex, M., Bussman, J., Van der Sar, A.M., et al.** (2005). Transcriptome Profiling of Adult Zebrafish at the Late Stage of Chronic Tuberculosis due to Mycobacterium Marinum Infection. *Mol Immunol*, 42: 1185–1203.
- Michaelsen, T.E., Gilje, A., Samuelsen, A.B., Hogasen, K., Paulsen, B.S.** (2000). Interaction Between Human Complement and a Pectin Type Polysaccharide Fraction, PMII, from the leaves of Plantago major L. *Scand. J. Immunol*, 52, 483–490.
- Misra, C.K., Das, B.K., Mukherjee, S.C., Pattnaik, P.** (2006). Effect of Long Term Administration of Dietary B-glucan on Immunity, Growth and Survival of Labeo Rohita Fingerlings. *Aquaculture*, 255: 82–94.
- Mulder, I.E., Wadsworth, S., Secombes, C.J.** (2007). Cytokine Expression in the Intestine of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) during Infection with Aeromonas salmonicida. *Fish Shellfish Immunol*, 23: 747-59.

- Mulero, V., Esteban, M.A., MUNOZ, J., Meseguer, J.** (1998). Dietary Intake of Levamisole Enhances the Immune Response and Disease Resistance of the Marine Teleost Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 8: 49-62.
- Nikl L., Evelyn TPT., Albright L.J.** (1993). Trials with an Orally and Immersion-Administrated β -1,3 Glucan as an Immunoprophylactic against *Aeromonas Salmonicida* in Juvenile Chinook Salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 17: 191e6.
- Novoa, B., Bowman, T.V., Zon L., Figueras, A.** (2009). LPS Response and Tolerance in the Zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol*, 26: 326–331.
- Ocak, F.** (2006). Balıklarda Lenfoid Organlar ve İmmun Sistemin Özellikleri. *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg.* 3(1) 61-66.
- Oppenheim, J.J., Kovacs, E.J., Matsushima, K., Durum, S.K.** (1986). There is more than one Interleukin-1. *Immunol Today*, 7: 45-56.
- Oskay, D., Oskay, M.** (2009). Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoteknolojik Önemi, *Journal of New World Sciences Academy*, Volume: 4, Number: 2, Article Number: 5A0006.
- Oskay, M., ve Tamer, A.** (2009). Streptomyces Kökenli Antibiyotiklerin Dünyü, Bugünü ve Yarını. *Journal of New World Science Academy*, 4: 48-60.
- Oyarbide, U., Rainieri, S., Pardo, M.A.** (2012). Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae as a System to Test the Efficacy of Polysaccharides as İmmünostimülans. *Zebrafish*, 9, 74-84.
- Özkaya, F.C., Erdoğan, C., Altunok, M.** (2013). Denizel Biyoaktif Bileşikler. *Ege J Fish Aqua Sci*, 30 (2): 85-92.
- Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hirono, I., Kobayashi, T., Sugita, H., Puangkaew, J., Aoki, T.** (2007). Immune Modulation and Expression of Cytokine Genes in Rainbow Trout *Oncorhynchus Mykiss* upon Probiotic Feeding. *Dev Comp Immunol*, 31 (4): 372-82.
- Peddie, S., Zou, J., Secombes, C.J.** (2002). Immunostimulation in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Following Intraperitoneal Administration of Ergosan. *Vet Immunol Immunopathol*, 86, 101–113.
- Pender, D.R., Kwak, T.J.** (2002). Factors İnfluencing Brown Trout Reproductive Success in Ozark Tailwater Rivers. *Transactions of the American Fisheries Society* 131: 698-717.

- Pérez-Sánchez, T., Luis Balcázar, J., Merrifield, D.L., Carnevali, O., Gioacchini, G., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I.** (2011). Expression of Immune-Related Genes in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* Infection. *Fish and shell Fish Immunology*, Volume. 31, Issue: 2, Pages 196–201.
- Pestka, S., Krause, C.D., Walter, M.R.** (2004). Interferons, Interferon-Like Cytokines, and Their Receptors. *Immunol Rev*, 202: 8-32.
- Pionnier, N., Falco, A., Miest, J., Frost, P., Irnazarow, I., Shrive, A., Hoole, D.** (2013). Dietary β -glucan Stimulate Complement and C-reactive Protein Acute Phase Responses in Common carp (*Cyprinus carpio*) during an *Aeromonas Salmonicida* infection. *Fish Shellfish Immunol*, 34: 819-31.
- Pressley, M.E., Phelan, P.E., Witten, P.E., Mellon, M.T., Kim, C.H.** (2005). Pathogenesis and Inflammatory Response to *Edwardsiella Tarda* Infection in the Zebrafish. *Develop Comp Immunol*, 29: 501–513.
- Priti, V., Ramesha, B.T., Singh, S., Ravikanth, G., Ganeshiah, K.N., et al.** (2009). How Promising are Endophytic Fungi as Alternative Sources of Plant Secondary Metabolites?. *Curr. Sci*, 97: 477–78.
- Proksch, P., Ebel, R., Edrada, R.A., Wray, V., Steube, K.** (2003). Bioactive Natural Products from Marine Invertebrates and Associated Fungi. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 37,117-142.
- Popp, W.** (1980). Bakterien Als Erreger Infektiöser Fischkrankheiten. Krankheiten und Schädigungen der Fische. Ed. By H.-H. Reichebach-Klinke, 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 105-161.
- Qin QW, Ototake M, Noguchi K, Soma GI, Yokomizo Y, Nakanishi T.** (2001). Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-alpha)-Like Factor Produced by Macrophages in Rainbow Trout, (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol*, 11: 245-256.
- Raleigh, R.F., Hickman, T., Solomon, R.C., Nelson, P.C.** (1984). Habitat Suitability Information: Rainbow Trout. *US Fish and Wildl. Serv*, FWS/OBS-82/10, 60. 64 pp.
- Raida, M.K., Buchmann, K.** (2009). Innate Immune Response in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) against Primary and Secondary Infections with *Yersinia ruckeri* O1. *Dev Comp Immunol*, 33 (1): 35-45.
- Randelli, E., Buonocore, F., Scapigliati, G.** (2008). Cell Markers and Determinants in Fish Immunology. *Fish & Shellfish Immunology*, 25, 326 p.
- Rebl, A., Goldammer, T., Seyfert, H.M.** (2010). Toll-Like Receptor Signaling in Bony Fish. *Veterinary immunology and immunopathology*, 134 (3), 139-150.

- Reid, G., Sanders, M.E., Gaskins, H.R., Gibson, G.R., Mercenier, A., Rastall, R.A., et al.** (2003). New Scientific Paradigms for Probiotics and Prebiotics. *J Clin Gastroenterol*, 37: 105-18.
- Reverter M., Bontemps N., Lecchini D., Banaigs B., Sasall P.** (2014). Use of Plant Extracts in Fish Aquaculture as an Alternative to Chemotherapy: Current Status and Future Perspectives. *Aquaculture*, 433, 50-61.
- Reyes-Becerril, M., Guardiola, F., Rojas, M., Ascencio-Valle, F., Esteban, M.Á.** (2013). Dietary Administration of Microalgae *Navicula* sp. Affects Immune Status and Gene Expression of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). *Fish Shellfish Immunol*, Sep; 35 (3): 883-9.
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., Wittwer, C. T.** (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry*, 245(2), 154-160.
- Robinson, T., Singh, D., Nigam, P.** (2001). Solid-State Fermentation: A Promising Microbial Technology for Secondary Metabolite Production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 284-289. 8.
- Rodríguez, A., Cuesta, A., Ortuño, J., Esteban, M.A., Meseguer, J.** (2003). Immunostimulant Properties of a Cell Wall-modified Whole *Saccharomyces cerevisiae* Strain Administered by Diet to Seabream (*Sparus aurata* L.). *Vet. Immunol. Immunopathol*, 96: 183-192.
- Rodríguez, I., Novoa, B., Figueras, A., Rodríguez, I.** (2008). Immune Response of Zebrafish (*Danio rerio*) against a newly Isolated Bacterial Pathogen *Aeromonas Hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol*, 25: 239–249.
- Rogatsky, I., Ivashkiv, L.B.** (2006). Glucocorticoid Modulation of Cytokine Signalling. *Tissue Antigens*, 68:1-12.
- Rojo, I., de Ila'rduya, O'.M., Estonba, A., Pardo, M.A'.** (2007). Innate Immune Gene Expression in Individual Zebrafish after *Listonella anguillarum* Inoculation. *Fish Shellfish Immunol*, 23: 1285– 1293.
- Roohi F.M., Dinesh S., Mekata T., Sudhakaran R.** (2016). Therapeutic efficiency of *Portieria Hornemannii* (Rhodophyta) against *Vibrio parahaemolyticus* in Experimentally Infected *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*, Volume. 450, s. 369-374.
- Ross, G.D., Cain, J.A., Lachmann, P.J.** (1985). Membrane Complement Receptor Type Three (CR3) has Lectin-Like Properties Analogous to Bovine Conglutinin and Functions as a Receptor for Zymosan and Rabbit Erythrocytes as well as a Receptor For IC3b. *J. Immunol*, 134, 3307– 3315.
- Sakai, M.** (1999). Current research status of fish immunostimulans. *Aquaculture*, 172, pp: 63–92.

- Samuel, C.E.** (2001). Antiviral Actions of Interferons. *Clin Microbiol Rev*, 14(4): 778-809.
- Sapkota, A., Sapkota, A.R., Kucharski, M., Burke, J., McKenzie, S., Walker, P., Lawrence, R.** (2008). Aquaculture Practices and Potential Human Health Risks: Current Knowledge and Future Priorities. *Environ Int*, 34 (8): 1215-26.
- Sardaryan, E.** (2002). Strain of The Microorganism Penicillium Oxalicum Var. Armeniaca and its Application. *US Patent*, 6: 340-586, B1.
- Sardaryan, E.** (2004). Food Supplement. *US Paten*, 0105864, A1.
- Sarker, S.D., Latif, Z., Gray, A.I.** (2006). Natural Products Isolation, Second Edition. *Humana Press*, New Jersey, 28–37.
- Savina, A., Amigorena, S.** (2007). Phagocytosis and Antigen Presentation in Dendritic Cells. *Immunol Rev*, 219:143-56.
- Schlegel, H.** (1992). Produktion Sekundärer Metabolite. *Allgemeine Mikrobiologie, Georg-Thieme Verlag*, 362-371.
- Secombes, C.J.** (1996). Cytokines in fish: an update. *Fish Shellfish Immunol*, 6: 291-304.
- Secombes, C.J.** (2008). Will Advances in Fish Immunology Change Vaccination Strategies?. *Fish Shellfish Immunol*, 25: 409–16.
- Secombes, C.J., Zou, J., Hardie, L.J., Laing, K., Daniels, G.D., Cunningham, C.** (1997). Rainbow Trout Cytokine Genes. *Dev. Comp. Immunol*, 21, 138.
- Secombes, C.J., Wang, T., Hong, S., Peddie, S., Crampe, M., Laing, K.J, et al.** (2001). Cytokines and Innate Immunity of Fish. *Dev Comp Immunol*, 25: 713-723.
- Seidl, M.** (2006). Industrial uses of Fungi. *The Environmental Reporter*, 4 (9).
- Selvin, J., Lipton, A.P.** (2004), Dendrilla nigra, a Marine Sponge, as Potential Source of Potential Source of Antibacterial Substances for Managing Shrimp Diseases. *Aquaculture*, 236, 277–283 pp.
- Sethi, J.K & Hotamisligil, G.S.** (1999). The role of TNF in adipocyte metabolism. *Seminars in Cell Developmental Biology*, 10; 19–29.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Dixon, O.W.** (1989). Comparisons of nonspecific and specific immunomodulation by oxolinic acid, oxytetracycline and levamisole in Salmonids. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 23: 195-200.

- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Dixon, O.W.** (1990). In vitro Immunostimulation of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Spleen Cells with Levamisole. *Development and Comparative Immunology*, 14: 231-237.
- Steffens, W.** (1981). *Moderne Fischwirtschaft*. Verlag J. Neumann-Neudamm. 375 s. Melsungen. Berlin. Basel. Wien.
- Solem ST., Jørgensen J.B., Robertsen B.** (1995). Stimulation of Respiratory Burst and Phagocytic Activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Macrophages by Lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology*, 5: 475e91.
- Sorrell, T.C., Chen, S.C.** (2009). Fungal-derived Immune Modulating Molecules. *Adv Exp Med Biol*, 666:108-20.
- Sudheer, N.S., Philip, R., Singh, I.S.B.** (2011). In Vivo Screening of Mangrove Plants for Anti WSSV Activity in *Penaeus monodon*, and Evaluation of *Ceriops tagal* as a Potential Source of Antiviral Molecules. *Aquaculture*, 311, 36–41 pp.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A-K., Krohn, K.** (2002). Endophytic Fungi: a Source of Novel Biologically Active Secondary Metabolites. *Mycological Research*, 106, 996-1004 pp.
- Tada, H., Nemoto, E., Shimauchi, H., Watanabe, T., Mikami, T., Matsumoto, T., Ohno, N., Tamura, H., Shibata, K.I., Akashi, S., Miyake, K., Sugawara, S., Takada, H.** (2002), *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*, Derived Mannan Induced Production of Tumor Necrosis Factor Alpha by Human Monocytes in a CD14- and Toll-Like Receptor 4-Dependent Manner. *Microbiology and Immunology*, 46: 503–512.
- Tadiso, T.M., Kransnov, A., Skugor, S., Afanasyev, S., Hordvik, I., Nilsen, F.,** (2011). Gene expression analyses of immune responses in Atlantic salmon during early (*Lepeophtheirus salmonis*) revealed biphasic responses coinciding with the cope podchalimustransition. *BMC Genomics*, 12, 141.
- Taniguchi, T., Mantei, N., Schwarzstein, M., Nagata, S., Muramatsu, M., Weissmann, C.** (1980). Human Leukocyte and Fibroblast Interferons are Structurally Related. *Nature*, 285 (5766): 547-9.
- Topal, Ş., Pembeci, C., Borcaklı, M., Batum, M. ve Çeltik, Ö.** (2000). Türkiye'nin Tarımsal Mikroflorasının Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz. *Turk J. Biol*, 27: 79-93.

- Tort, J.C., Balasch, S.M.** (2003). A Crossroads between Innate and Adaptive responses L.. Fish Immune System, *Inmunología*, Vol. 22 / Núm 3/ Julio-Septiembre: 277-286.
- Türe, M., Savaş, H.** (2010). Karadeniz Bölgesinde Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) *Lactococcosis* (*Lactococcus garvieae*). Yunus Araştırma Bülteni Yıl: 10 Sayı: 3 Eylül, Veteriner Hekim Balık Sağlığı Bölümü.
- Uçar, A. ve Atamanalp, M.** (2010). Kıyusal Kirlenmenin Balıklar Üzerine Etkileri. Türkiye Kıyı Sempozyumu, Trabzon, 489-469.
- Ünal, G.** (1995). Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)' nın Tütsülenmesi ve Bazı Kalite Kriterlerinin Tespiti Üzerine Bir Araştırma, E.Ü Fen Bil. Enst. Su Ürünleri Avlama ve İşleme Tek. Anabilim Dalı Doktora Tezi, İzmir 120.
- Vadstein, O.** (1997). The Use of Immunostimulation in Marine Larviculture: Possibilities and Challenges. *Aquaculture*, 155: 401-417.
- Vannuccini, S.** (2004). FAO, Overview of Fish Production, Utilization, Consumption and Trade. Based on 2002 Data.
- Vaseeharan, B., Thaya, R.** (2014). Medicinal plant derivatives as immünostimülans: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquaculture Int*, 22: 1079-1091.
- Vassalli, P.** (1992). The Pathophysiology of Tumor Necrosis Factors. *Annual Review of Immunology*, 10, 411–452.
- Vazzana, M., Parrinello, D., Cammarata, M.** (2003). Chemiluminescence Response of Glucan Stimulated Leukocytes Isolated from Different Tissues and Peritoneal Cavity of *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol*, 14: 423-434.
- Veerasamy, Ravichandran., Min, L.S., Mohanraj., Pauline, R., Sivadasan, S., Varghese, C., Rajak, H., Marimuthu, K.** (2014). Effect of Aqueous Extract of Polygonum Minus Leaf on the Immunity and Survival of African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Journal of Coastal Life Medicine*, 2 (3): 209-213.
- Verlhac, V., Gabaudan, J.** (1999). The Effect of Vitamin C on Fish Health. Vitamins, Roche, Centre for Research in Animal Nutrition. *Societe Chimique Roche*, BP 170, 68305 St. Louis, Cedex, France.
- Vigers, G.P.A., Anderson, L.J., Caffes, P., Brandhuber, B.J.** (1997). Crystal Structure of the Type-1 Interleukin-1 Receptor Complexed with Interleukin-1a. *Nature*, 386, 190–194.

- Vilcek, J., Sen, G.C.** (1996). Interferons and other cytokines. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven publishers;. p. 375-99.
- Wang, G., Liu, Y., Li, F., Gao, H., Lei Y., Liu X.** (2010). Immunostimulatory Activities of *Bacillus simplex* DR-834 to Carp (*Cyprinus carpio*). *Fish & Shellfish Immunology*, 29; 378-387.
- Watanuki, H., Ota, K., Tassakka, A.C.M.A.R., Kato, T., Sakai, M.** (2006). Immunostimulan Effects of Dietary *Spirulina platensis* on Carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 258, 157–163.
- Watanuki, H., Chakraborty, G., Korenaga, H., Kono, T., Shivappa, R.B., Sakai, M.** (2009). Immunostimulatory Effects of Natural Human Interferonalpha (huIFN-a) on Carps, *Cyprinus Carpio* L. *Vet Immunol Immunopathol*, 131: 273–7.
- Watts, M., Munday, B.L., Burke, C.M.** (2001). Immune Responses of Teleost Fish. *Australian Veterinary Journal*, 79: 570-574.
- Watzke, J., Schirmer, K., Scholz, S.** (2007). Bacterial Lipopolysaccharides Induce Genes Involved in the Innate Immune Response in Embryos of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol*, 23: 901–905.
- Wei, L., Sun, B., Chang, M.X., Liu, Y., Nie, P.** (2009). Effects of Cyanobacterial Toxin Microcystin-LR on the Transcription Levels of Immune-related Genes in Grass Carp *Ctenopharyngodon Idella*. *Environ Biol Fishes*, 85: 231–8.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., Taylor, J. W.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18 (1), 315-322.
- Woynarovich, A., Hoitsy, G., Moth-Poulsen, T.** (2011). Small-scale Rainbow Trout Farming, FAO, *Fisheries And Aquaculture Technical Paper*, 561.
- Wu, Z. F., Liu, G. L., Zhou, Z., Wang, G. X., Xia, L., Liu, J.L.** (2012). Induction of Immune-related Gene Expression in *Ctenopharyngodon idella* Kidney Cells by Secondary Metabolites from Immunostimulatory *Alcaligenes Faecalis* FY-3. *Scandinavian journal of immunology*, 76 (2), 131-140.
- Yano, T.** (1996). The Nonspecific Immune System: Humoral Defense. (G. Iwama and T. Nakanishi Eds.), *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*, London: *Academic Press*, 105-156 pp.

- Yazıcıoğlu, N.** (2015). Su Ürünleri Sektörüne Genel Bakış, Tüketici Davranışları ve Su Ürünlerinin Sağlık Açısından Faydaları. Gediz Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü İşletme Bölümü Yüksek Lisans Tezi. İzmir.
- Yılmaz E., Sayın C., Kıştın F., Emre N.** (2008). Türkiye’de Ağ Kafeste Alabalık Yetiştiriciliği, Karşılaşılan Sorunlar ve Çözüm Önerileri Süleyman Demirel Üniversitesi, *Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, Cilt: 4, Sayı: 1-2.
- Yonar, M.E., Silici, S.** (2010). Gökkuşuğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), (walbaum, 1792)’nın Bazı Kan Parametrelerine Propolisin Etkisinin Araştırılması. *New World Sciences Academy*, Fırat University.
- Yonar, M.E., Karahan M., Kan, N.İ., Yonar, S., Sağlam, N.** (2010). Kahramanmaraş Bölgesindeki Bazı Gökkuşuğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) İşletmelerinde Görülen *Acinetobacter* Sp. Enfeksiyonunun Araştırılması, *Journal of Fisheries Sciences*. 4 (4): 287-293.
- Yonar, M.E., Sakin, F., Sağlam, N.** (2011). Likopenin Pullu Sazan (*Cyprinus carpio* L., 1758)' da Bazı Hematolojik ve İmmünojenik Parametrelere Etkisi. *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 23 (2): 95-98.
- Yüzbaşıoğlu, A.** (2008). Dejenerasyon Sürecindeki Kas Dokusunda Housekeeping Genlerin Ekspresyon Düzeyinin İncelenmesi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Zhang, L., Demain, A.L.** (2005). Natural Products Drug Discovery and Therapeutic Medicine, Natural Products and Drug Discovery, (EDS). *Humana Press Inc*, 4-8 pp,
- Zeliko, J.T., Enane, N.A., Bowser, D. & Squibb, K.S.** (1990). Fish macrophage I: Development of a system for detecting immunomodulating effects of environmental pollutants. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, 11th Annual Meeting (Arlington, VA), p. 86.
- Zou, J., Grabowski, P.S., Cunningham, C. & Secombes, C.J.** (1998). Molecular Cloning of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Interleukin-1b Reveals no Evidence of an ICE Cut Site, *EMBL accession*, No: AJ223954.
- Zou, J., Cunningham, C., Secombes, C.J.** (1999). The Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Interleukin-1 Beta has a Different Organization to Mammals and Undergoes Incomplete Splicing, *Eur. J. Biochem*, 259, 901–908 pp.

- Zou, J., Wang, T., Hirono, I., Aoki, T., Inagawa, H., Honda, T., Soma, G-I, Ototake, M., Nakanishi, T., Ellis, AE., Secombes, CJ. & Wang, T.** (2002). Differential Expression of Two Tumor Necrosis Factor Genes in Rainbow Trout, (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental and Comparative Immunology*, Vol. 26, No. 2, 161-172 pp.
- Zou, J., Clark, M.S., Secombes, C.J.** (2003). Characterisation, Expression and Promoter Analysis of an Interleukin-10 Homologue in the Puffer Fish, Fugu Rubripes. *Immunogenetics*, 55: 325-335 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Betül Melike OĞAN
Doğum Tarihi ve Yeri : 02.01.1989 - Manisa
E-posta : melke.oan@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2013, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölüm
- **Yüksek lisans** : 2016, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Su Ürünleri Anabilim Dalı, Yetiştiricilik Programı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 06/2016-10/2016 ; Moleküler İmmünoloji, Universitätsklinikum Erlangen, Erlangen-Nürnberg Üniversitesi. (Erlangen, Almanya)
- 07/2012 ; Özel Sada Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü. (İzmir, Türkiye)
- 03/2011–04/2011 ; Şifa Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji ve Biyokimya Bölümü. (İzmir, Türkiye)
- 27 Haziran – 1 Temmuz 2016, Kayıt Bursu, “At the Intersection of DNA Replication and Genome Maintenance: 2016 From Mechanisms to Therapy” ICGEB tarafından düzenlenen, Trieste / İTALYA (450 Euro).
- 06 Haziran – 30 Eylül 2016, ERASMUS Eğitim Bursu (4 ay).
- 2015-2017, TÜBİTAK 1001 Proje Bursu.