

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA ORİGANUM
MİNUTİFLORUM O.SCHWARZ ET. P.H. DAVIS
BİTKİSİNİN ANTİOKSİDAN VE NONSPESİFİK İMMUN
SİSTEM ÜZERİNE ETKİLERİ**

ATAMAN BİLGE SARI

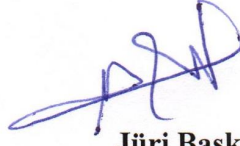
DANIŞMAN
PROF. DR. OYA ÜSTÜNER

VETERİNER FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİSİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2016

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü . Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalı, Farmakoloji ve Toksikoloji Programında Doktora öğrencisi Ataman Bilge SARI tarafından Prof. Dr. Oya ÜSTÜNER' in danışmanlığında hazırlanan “Gökkuşığı Alabalıklarında Origanum Minutiflorum O. SCHWARZ ET. P.H. Davis Bitkisinin Antioksidan ve Nonspesifik İmmun Sistem Üzerine Etkileri” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 28/07/2016 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

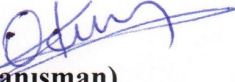


Jüri Başkanı

Prof. Dr. Murat YILDIRIM

İ.Ü. Veteriner Fakültesi

Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Abd.

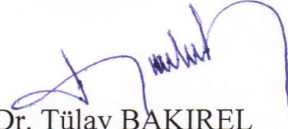


Jüri (Danışman)

Prof. Dr. Oya ÜSTÜNER

İ.Ü. Veteriner Fakültesi İ.

Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Abd



Jüri

Prof. Dr. Tülay BAKIREL

İ.Ü. Veteriner Fakültesi

Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Abd

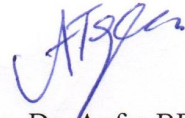


Jüri

Prof. Dr. Gülden Z. OMURTAG

İstanbul Medipol üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Toksikoloji Abd



Jüri

Yrd. Doç. Dr. Ayfer BECEREN

Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Toksikoloji Abd

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Ataman Bilge SARI

İTHAF

Değerli dostum Gönül ŞAHİN'e ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Oya ÜSTÜNER, Prof. Dr. Murat YILDIRIM, Prof. Dr Tülay BAKIREL, Dr. Fulya ÜSTÜN ALKAN, Dr. Ceren ANLAŞ, Cumali TÖLÜ, Yiğit GÜNEŞ, Kerem GÜZELAYDIN, Belkıs MUCA'ya ve eşim Eylül SARI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38930



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
BEYAN	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Origanum minutiflorum</i> Bitkisi Hakkında Bilgiler	3
2.1.1. <i>Origanum</i> Türlerinin Biyolojik ve Farmakolojik Etkileri	4
2.1.2. <i>Origanum minutiflorum</i> 'un Farmakolojik Etkileri	5
2.1.2.1. Antibakteriyel aktivite	5
2.1.2.2. Antifungal aktivite	6
2.1.2.3. Antioksidan Aktivite	6
2.1.2.4. Antiparaziter etki	7
2.2. Dünyada ve Türkiye’de Alabalık Yetiştiriciliğine Genel Bakış	7
2.2.1. Alabalık Yetiştiriciliğinde Karşılaşılan Problemler ve Çözümler	8
2.3. Alabalıklarda Bağışıklık Sistemi	10
2.3.1. Nonspesifik İmmun Sistemde Görev Alan Organ ve Dokular	11
2.3.2. Nonspesifik İmmun Sistemde Görev Alan Hücreler	13
2.3.3. Humoral Parametreler	14
2.3.4. İmmunostimülan Maddeler	16
2.3.4.1. İmmunostimülanların Etkinliğinin Değerlendirilmesi	18
2.3.4.2. Balıklarda Kullanılan İmmunostimülan Maddeler	19
2.4. Alabalıklarda Oksidatif Stres ve Etkileri	23
2.4.1. Oksidatif Stresin Balıklardaki Etkileri	25

2.4.2. Antioksidan Savunma Sistemleri	26
2.4.3. Antioksidanların Etki Mekanizmaları	28
2.4.4. Alabalıklar Yetiştiriciliğinde Kullanılan Antioksidan Maddeler	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Gereç	30
3.1.1. Kullanılan Aletler	30
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	31
3.1.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	32
3.1.3.1. Homojenizasyonda Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	32
3.1.3.2. Respiratory Burst Analizinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	32
3.1.3.3. Lizozim Aktivitesi Analizinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	32
3.1.3.4. Proteini Seviyesi Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	33
3.1.3.5. Malondialdehit Analizinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	33
3.1.3.6. Glutasyon S-Transferaz Analizindeki Çözeltilerin Hazırlanması	34
3.1.3.7. Katalaz Analizinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	34
3.2. Yöntem	35
3.3. Bitkilerin Toplanması	35
3.3.1. Bitkinin Toz Halinin Elde Edilmesi	36
3.4. Ekstraksiyon Yöntemleri	36
3.4.1. Hidrodistilasyon Yöntemi İle Uçucu Yağın Ekstraksiyonu	36
3.4.2. Bitkilerin Sıcak Su Maserasyonu ve Ekstraktın Liyofilize Edilmesi	36
3.5. Yemlerin Hazırlanması	37
3.6. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Akvaryumların Hazırlanması	38
3.6.1. Alabalıkların Temini	39
3.6.2. Örneklerin Alınması ve Homojenizasyonu	39
3.7. Nonspesifik İmmün Sistem İle İlgili Parametrelerin İncelenmesi	40
3.7.1. Respiratory Burst Aktivitesinin Tayini	40
3.7.2. Serum Lizozim Aktivitesinin Tayini	41
3.7.3. Fagositik Aktivitenin Tayini	42
3.7.4. Karaciğerde Toplam Protein Miktarının Tayini	42
3.8. Oksidatif Stres İle İlgili Parametrelerin İncelenmesi	43
3.8.1. Malondialdehit Düzeylerinin Tayini	43

3.8.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayini	44
3.8.3. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Tayini	45
3.8.4. Glutasyon S-Transferaz Aktivitesinin Tayini	46
3.8.5. Katalaz Aktivitesinin Tayini	47
3.9. Gelişim Performansının Tayini	48
3.9.1. Canlı Ağırlık Artışı Tayini	48
3.9.2. Yüzde Canlı Ağırlık Artışının Tayini	49
3.9.3. Spesifik Büyüme Oranının Tayini	49
3.9.4. Kondisyon faktörünün Tayini	49
3.10. İstatiksel Değerlendirme	49
4. BULGULAR	50
4.1. Ekstraksiyon Verimi	50
4.2. Balıkların Gelişim Performansı İle İlgili Bulgular	50
4.3. Nonspesifik İmmun Sistem İle İlgili Parametrelere Ait Bulgular	53
4.3.1. Respiratory Burst Aktivitesi	53
4.3.2. Serum Lizozim Aktivitesi	55
4.3.3. Fagositik Aktivite Düzeyleri	56
4.4. Oksidatif Stres ile İlgili Parametreler	58
4.4.1. Malondialdehit Miktarı	58
4.4.2. Süperoksit Dismutaz Enzimi Aktivitesi	59
4.4.3. Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi	61
4.4.4. Glutasyon S-Transferaz Enzim Aktivitesi	62
4.4.5. Katalaz Enzim Aktivitesi	64
4.5. Karaciğer Toplam Protein Miktarı	65
5. TARTIŞMA	66
5.1. SONUÇ	74
KAYNAKLAR	76
FORMLAR	103
ETİK KURUL KARARI	104
ÖZGEÇMİŞ	105

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Türkiye’de Yaygın Üretilen Balık Türleri	7
Tablo 2-2: Su Ürünlerinde Kullanılan İmmunostimülan maddeler.....	20
Tablo 2-3: Balıklardaki Antioksidan Maddeler.....	28
Tablo 3-1: Toplam Protein Tayini İçin Standartların Hazırlanması.....	33
Tablo 3-2: Alabalık Yavru Pelet Yemi İçeriği	38
Tablo 3-3: Alabalık Deney Grupları.....	38
Tablo 3-4: Lizozim Analizi ELISA Plaka Uygulaması.....	41
Tablo 3-5: Süperoksit Dismutaz Analizi ELISA Plaka Uygulaması.....	45
Tablo 4-1: Canlı Ağırlık Artış Miktarları	51
Tablo 4-2: Respiratory Burst Aktivitesi Düzeyleri	54
Tablo 4-3: Serum Lizozim Aktivitesi Düzeyleri	55
Tablo 4-4: Fagositik Aktivite Düzeyleri.....	57
Tablo 4-5: Karaciğer Malondialdehit Düzeyleri	58
Tablo 4-6: Karaciğer Süperoksit Dismutaz Enzimi Aktivitesi.....	60
Tablo 4-7: Karaciğer Glutasyon Peroksidaz Enzimi Aktivitesi.....	61
Tablo 4-8: Karaciğer Glutasyon S-Transferaz Enzimi Aktivitesi.....	63
Tablo 4-9: Karaciğer Katalaz Enzim Aktivitesi	64
Tablo 4-10: Karaciğer Toplam Protein Miktarı.....	65

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Yıllara Göre Gökkuşığı Alabalığı Üretim Miktarı.....	8
Şekil 2-2: Doğal Antioksidanların Sınıflandırılması.....	26
Şekil 3-1 Origanum Minutiflorum Herbaryum Örneği	35
Şekil 4-1: Deney Başlangıcı ve Deney Sonu Canlı Ağırlıkları	52
Şekil 4-2: Canlı Ağırlık Artışı (g).....	52
Şekil 4-3: Yüzde Canlı Ağırlık Artışı.....	52
Şekil 4-4: Spesifik Büyüme Oranı Yüzdesi (%/gün).....	52
Şekil 4-5: Kondisyon Faktörü	53
Şekil 4-6: Toplam Kan Respiratory Burst Aktivitesi Düzeyleri.....	54
Şekil 4-7: Serum Lizozim Aktivitesi Düzeyleri	56
Şekil 4-8: Fagositik Aktivite Düzeyleri.....	57
Şekil 4-9: Karaciğer Malondialdehit Düzeyleri.....	59
Şekil 4-10: Karaciğer Süperoksit Dismutaz Enzim Düzeyleri	60
Şekil 4-11: Karaciğer Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi	62
Şekil 4-12: Karaciğer Glutasyon S-Transferaz Enzim Aktivitesi.....	63
Şekil 4-13: Karaciğer Katalaz Enzim Aktivitesi	64
Şekil 4-14: Karaciğer Toplam Protein Miktarı.....	65

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ANOVA: Varyans analizi
CAA: Canlı ağırlık artışı
CAT: Katalaz
CDNB: 1-kloro-2,4-dinitrobenzen
CRP: C-reaktif protein
FCA: Freund'un tam adjuvantı
FDA: Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
GC: Gaz kromatografisi
GPx: Glutasyon peroksidaz
GR: Glutasyon redüktaz
GSH: İndirgenmiş glutasyon
GSSG: Okside glutasyon
GST: Glutasyon S-transferaz
HBSS: Hank Balanced tuzlu su çözeltisi
IFA: Freund'un tam olmayan adjuvantı
Ig: İmmunoglobulin
IgM: İmmunoglobulin M
IL: İnterlöykinler
LC: Likit kromatografisi
LPS: Lipopolisakkarit
MDA: Malondialdehit
MDP: Muramil Dipeptitleri
MHC: Temel doku-uygunluğu bileşeni
MS: Kütle Spektrometresi
NADP: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
OUY: Origanum bitkisi uçucu yağı
PBS: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
RNS: Reaktif azot türleri
ROT: Reaktif oksijen türleri
RSS: Reaktif kükürt türleri
SOD: Superoksit dismutaz
TBA: Tiyobarbitürik asit

TBARS: Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler testi

TCA: Trikloroasetik asit

TEP: 1,3,3-tetraetoksipropan

Tukey HSD: Tukey "Honestly Significant Difference" analizi

XO : Ksantin Oksidaz

YCAA: Yüzde Canlı Ağırlık Artışı



ÖZET

SARI, A.B. (2016). Gökkuşığı alabalıklarında *Origanum minutiflorum* O.Schwarz et. P.H. Davis bitkisinin antioksidan ve nonspesifik immün sistem üzerine etkileri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Farmakoloji ve Toksikolojisi ABD Doktora Tezi. İstanbul.

Anahtar Kelimeler: Gökkuşığı alabalığı, Nonspesifik immün sistem, Antioksidan, *Origanum minutiflorum*.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38930

Çalışmamızda ülkemize endemik olan *Origanum minutiflorum* O.Schwarz et. P.H. Davis bitkisinin gökkuşığı alabalıklarında nonspesifik immün sisteme yönelik etkileri ve *in vivo* antioksidan etkinliği incelendi. Bitkinin toz hali, liyofilize tozu ve uçucu yağlarını farklı konsantrasyonlarda içeren yemler gökkuşığı alabalıklarına sekiz hafta boyunca verildi. Deney sonunda nonspesifik immün sisteme yönelik etkilerin değerlendirilmesi amacıyla respiratory burst aktivitesi, lizozim aktivitesi, fagositik aktivite incelendi ve canlı ağırlık artışı takip edildi. Antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla karaciğer örneklerinde malondialdehit düzeyleri, süperoksit dismutaz, glutatyon-peroksidaz, glutatyon S-transferaz, katalaz enzim aktiviteleri incelendi ayrıca canlı ağırlık artışı ve kondisyon faktörü belirlendi. Nonspesifik immün sisteme ait parametrelerden respiratory burst, lizozim ve fagositik aktivitede en yüksek etkinlik 1000 mg/kg/yem konsantrasyonunda uçucu yağların ilave edildiği yemlerle beslenen alabalıklarda gözlenirken, 500 ve 1000 mg/kg yem konsantrasyonlarında liyofilize ekstrakt içeren yemlerle beslenen gruplarda değişken düzeylerde respiratory burst aktivitesi ve fagositik aktivite artışı tespit edildi. Canlı ağırlığına etkide artış görülmesine rağmen deney gruplarında istatistiksel bir önemlilik belirlenmedi. Antioksidan aktivite ile ilgili parametrelerde 1000 mg/kg/yem liyofilize ekstrakt ve 250, 500 ve 1000 mg/kg/yem uçucu yağ içeren yemlerle beslenen gruplarda dozdan bağımsız karaciğer malondialdehit seviyesinde önemli düzeyde düşüş gözlenirken; süperoksit dismutaz aktivitesinde artış 1000 mg/kg/yem uçucu yağ ve liyofilize ekstrakt grubunda, glutatyon peroksidaz artışı uçucu yağ ve liyofilize ekstratları gruplarının tamamında, katalaz aktivitesindeki artış ise 1000 mg/kg/yem uçucu yağ grubunda gözlemlendi.

Çalışmamızın sonucunda elde edilen verilere dayanarak endemik bir bitki türü olan *Origanum minutiflorum*'un özellikle uçucu yağlarının ve liyofilize ekstraktların doza bağlı değişken derecede gökkuşığı alabalıklarında nonspesifik immün sisteme yönelik ve antioksidan etkinlik açısından önemli düzeyde olumlu etkisi olduğu belirlenmiştir.

ABSTRACT

SARI, A.B. (2016). Antioxidant and Immunostimulant Effects of *Origanum minutiflorum* O.Schwarz Et. P.H. Davis on Rainbow Trout, Istanbul University, Institute Of Health Science, Department of Pharmacology and Toxicology. Doctorate Thesis, İstanbul. 2016.

Key Words: Rainbow Trout, Nonspecific immun system, Antioxidant, *Origanum minutiflorum*.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 38930

The effects of *Origanum minutiflorum* O.Schwarz et P.H. Davis on non-specific immune system and in-vivo antioxidant defence are investigated in rainbow trout with our study. Rainbow trout experiment groups are fed with feed containing plant powder form, lyophilized powder and essential oils obtained from plant at different concentrations for a period of eight weeks. In order to evaluate the effects on nonspecific immune system, lysozyme activity, respiratory burst activity, phagocytic activity were analysed and body weight were monitored in the end of the feeding period. For the determination of in-vivo antioxidant capacity, malondialdehyde levels, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, catalase enzyme activities were examined from the liver samples. Non-specific immune system parameters like respiratory burst, lysozyme and phagocytic activity were found highest in the experiment groups fed with 1000 mg / kg essential oil containing feeds. In the group fed with feed containing 500 and 1000 mg / kg lyophilized extract, respiratory burst activity and phagocytic activity were increased significantly. Through antioxidant activity related parameters, the malondialdehyde levels were decreased significantly in the experiments groups fed with 1000 mg / kg feed lyophilized extract and 250, 500 and 1000 mg / kg feed essential oils. The superoxide dismutase activity in the liver were increased in 1000 mg / kg feed essential oil and 1000 mg / kg feed lyophilized extract group; glutathione peroxidase were increased in all essential oils and lyophilized extract groups; the catalase activity were increased 1000 mg / kg essential oil group.

Based on the data which are obtained from our study we can conclude that *Origanum minutiflorum* which is an endemic plant for our country could be used in feeds for the rainbow trout considering the plants extracts and especially essential oil of the plant have positive effects on non-specific immun system and antioxidant defenses of the rainbow trout.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Balık hastalıklarının tedavisinde dezenfektanlar, ilaçlar ve antibiyotik gibi maddeler uzun yıllardan beri etkin olarak kullanılmaktadır. Bu maddelerin kullanımının gıdalarda kalıntı sorunları ve antibiyotiklere karşı mikroorganizmalarda direnç gelişimi ve kullanılan ilaçların etkinliğinin azalması gibi potansiyel riskleri bulunmaktadır. İlaç kalıntısı, direnç, etkinlik azalması gibi dezavantajların varlığı ve yeni mevzuatlara uyum sağlanabilmesi amacıyla alternatif doğal kaynak arayışları bitki ve bitki ekstraktları üzerinde yoğunlaşmıştır (Gabor ve ark. 2012; Siwicki ve ark. 1994).

Bitkisel katkılar, gıda katkı maddelerinin yeni bir sınıfı olmakla beraber kullanımları ve etki mekanizmaları ile ilgili mevcut bilgiler oldukça yetersizdir. Bitkisel katkılar bitkilerin yumru, kök, yaprak veya meyvelerinin doğrudan veya ekstrakte edilerek liyofilize toz halinde veya uçucu yağ olarak yemlere katılmakta ve genel olarak antimikrobiyal, antioksidan ve immunstimülan etkinlikler göstermektedir. Bitkilerin farmakolojik etkileri ve fizyolojik parametreler üzerindeki olumlu etkileri doza bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir; yüksek veya düşük dozlar etkisiz olabileceği gibi fizyolojik parametrelere olumsuz etkileri de bulanabilir. Bu nedenle türe özgü dozların belirlenmesi klinik öneme sahip olmaktadır (Karaskova ve ark. 2015).

Origanum minutiflorum (O. Schwarz et Davis), ülkemizde endemik olarak yetişen ve ihraç edilen bir bitki türüdür. Ülkemizde yaygın kullanım alanı bulunmamaktadır. *Origanum* türleri, Avrupa ülkelerinde yem katkı maddesi olarak hayvan beslenmesinde performansı artırmak ve hastalıklardan korumak amacıyla kullanılmaktadır (Beghelli ve ark. 2012; Walter ve Bilkei 2004; Zhang ve ark. 2009).

Origanum minutiflorum'un yüksek antioksidan etkinliğe sahip olduğu *in vitro* çalışmalarda bildirilmesine rağmen, yapılan literatür taraması sonucunda hayvan türlerinde *in vivo* olarak antioksidan etkinliği ve nonspesifik immun sisteme yönelik etkisi ile ilgili verilere ulaşılamamıştır (Baddal 2010). Çeşitli kaynaklarda *Origanum* türlerinin immun sistem ile ilgili yararlılığına değinilmesi nedeniyle çalışmamızda *Origanum minutiflorum* bitkisinin gökkuşağı alabalıklarında nonspesifik immun sistem üzerine etkileri ve antioksidan etkisi *in vivo* olarak ilk kez balık türlerinde araştırılmıştır (Giannenas ve ark. 2012; Zheng ve ark. 2009).

Bu çalışmada, *Origanum minutiflorum* bitkisinin ve bitkiden elde edilen liyofilize ekstrakt ve uçucu yağın gökkuşığı alabalıklarında *in vivo* antioksidan kapasitesi ve nonspesifik immün sistemi uyarak hastalıklardan koruyucu etki oluşturma potansiyelini araştırmanın yanı sıra, uygulama formu ve etkin konsantrasyonun belirlenmesi amaçlanmaktadır. Gökkuşığı alabalıklarının hastalıklardan korunmasında *Origanum minutiflorum* bitkisinin olası yararlılığının değerlendirilmesi ve kullanım alanı kazanması hakkında yorum yapılması hedeflenmektedir. Bu yönde elde edilecek veriler, *Origanum minutiflorum*'un diğer hayvan türlerinde bağışıklığın desteklenmesi ve antioksidan etkinlik konusunda yapılan bilimsel çalışmalara kaynak oluşturma potansiyeline sahip olabilecektir. Aynı zamanda endüstriyel uygulanabilirlik açısından devamında yapılacak çalışmalar için esas oluşturma öngörülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Origanum minutiflorum* Bitkisi Hakkında Bilgiler

Origanum minutiflorum (O. Schwarz et Davis), *Lamiaceae* (Ballıbabagiller) familyasında bulunmakta olup ait olduğu origanum cinsinin (mercanköşk, merzengüş) bilinen 38 türü bulunmaktadır. Origanum cinsinin ülkemizde 22 türü ve toplam 32 taksonu yetişmektedir (Güner 2000). Yöresel olarak “Tota Kekik, Dağ Kekiği veya Çıngıllı Kekik” olarak adlandırılan *Origanum minutiflorum* türü sadece Isparta ilinin Sütçüler ve Kesme köyü çevresinde yetişen ve bölgeye endemik olan bir bitkidir (Baytop 1999). Bitki kayalık kireçli alanlarda ve yamaçlarda 1500-1800 m rakımda yetişmektedir ve temmuz-ağustos aylarında çiçeklidir (Davis 1965). *O. minutiflorum*’un ait olduğu *Origanum* cinsinin karvakrol ve timol taşıyan türleri, baharat olarak kullanılmakta olup kokusu itibarıyla halk arasında genel olarak kekik olarak tanınmaktadır. Türkiye, dünya genelindeki en büyük Origanum bitkisi ve yağlarının ihracatçısıdır (Başer 2008). Origanum’un Türkçe’deki karşılığı mercanköşk olmasına rağmen *Origanum*, *Thymus*, *Thymbra*, *Satureja*, *Lipia* ve *Coridotymus* cinsleri ülkemizde kokularının benzer olması nedeniyle kekik olarak isimlendirilmektedir (Krimmer ve ark. 1995).

Origanum türleri temel olarak gıda, baharat ve ilaç endüstrisinde kullanılmakta ve temel biyolojik etkinliğinden karvakrol ve timol bileşiklerinin sorumlu olduğu bildirilmektedir (Başer 2008). Origanum türlerinden elde edilen uçucu yağlar; temel bileşik olarak karvakrol, karvakrolun bir izomeri olan timol ve birçok farklı bileşik içermektedir. Origanum türleri arasında karvakrol içeriği en yüksek olan türün *Origanum minutiflorum* olduğu tespit edilmiştir (Başer 2008). Yapılan bir çalışmada *Origanum minutiflorum*’un uçucu yağında % 90 oranında karvakrol saptanmış, antimikrobiyal aktivitesi incelendiğinde bakteriyel gelişimi önemli ölçüde inhibe ettiği görülmüştür (Şarer ve ark. 1996). Çeşitli araştırmalarda karvakrolun; antimikrobiyal, antitümoral, antimutajenik, antigenotoksik, analjezik, antispazmodik, antiinflamatuvar, anjiojenik, antiparaziter, antiplatelet, asetilkolinesteraz inhibisyonu, insektisidal, antihepatotoksik özellikler ve hepatoprotektif aktivite gösterdiği belirtilmiştir (Başer 2008).

2.1.1. Origanum Türlerinin Biyolojik ve Farmakolojik Etkileri

Origanum türlerinden elde edilen ekstraktların ve uçucu yağların *in vitro* veya *in vivo* olarak; antibakteriyel (Aslım ve Yücel 2008; Dadaloğlu ve Evrendilek 2004; Öke ve Aslım 2010; Özcan ve Chalchat 2009), antiviral (Sökmen ve ark. 2004), antiparaziter (Ayvaz ve ark. 2009; Machado ve ark. 2010), antifungal (Daferera ve ark. 2000; Korukluoğlu ve ark. 2009; Sökmen ve ark. 2004), antiinflamatuvar (Ocana-Fuentes ve ark. 2010), antitrombotik (Karkabounasli ve ark. 2006; Tognolini ve ark. 2006), antikarsinogenik, antiproliferatif (Assaf ve ark. 1987; Kanazawa ve ark. 1995; Škerget ve ark. 2005), asetilkolinesteraz inhibitör (Loizzo ve ark. 2009; Orhan ve ark. 2008), antidiyabetik (Koukoulitsa ve ark. 2006; Lemhadri ve ark. 2004) hepatoprotektif, hipolipidemik (Canbek ve ark. 2008; Lemhadri ve ark. 2004) etkinlik gösterdiği bildirilmiştir.

Farklı hayvan türlerinde ve balıklarda *Origanum* türlerinin bağışıklık, büyüme oranı ve antioksidan kapasiteleri üzerine etkileri incelenmiştir. Zhang ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan deneysel bir çalışmada, *Origanum heracleoticum* bitkisinden elde edilen, içerisinde karvakrol ve timol bileşenleri bulunduran Orego-Stim® isimli ticari ürünün, kanal yayın balığında (*Ictalurus punctatus*) büyüme performansı ve antioksidan etkileri araştırılmıştır. Balıklar 8 hafta süren besleme süresi sonrası, *Aeromonas hydrophila* ile deneysel olarak enfekte edilmiş ve mortalite düzeyleri saptanmıştır. Lizozim aktivitesi ve antioksidan aktivitenin ölçütü olan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz aktivitesi incelenmiştir. Çalışmada *Origanum* bitkisinden izole edilen karvakrol ve timol bileşenleri ile beslenen deney gruplarında belirgin bir büyüme artışı meydana geldiği, *A. hydrophila*'ya bağlı mortalitenin azaldığı, kaslarda protein birikiminin artırarak anabolik etki yaptığı ve patojenlere karşı dayanıklılığın arttığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda *Origanum* bitkisinin diğer hayvan türlerinde benzer şekilde bağışıklığı desteklediği görülmektedir. *Origanum* içeren yem katkı maddesi (Oregpig, Pecs, Macaristan) ile beslenen büyüme hızı düşük domuz yavrularında gelişimi artırdığı ve nonspesifik immunostimulan etki gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada hiçbir uygulama yapılmayan kontrol grubunda mortalite oranı % 33 olarak gözlenirken, *Origanum* içeren yemlerle beslenen grupta mortalite oranının % 4'e düştüğü bildirilmiştir (Walter ve Bilkei 2004).

Beghelli ve ark. tarafından yapılan araştırmada tavşan yemlerine *Origanum vulgare* L. ve *Rosmarinus officinalis* L. bitkileri bireysel ve kombinasyon şeklinde ilave edilmiştir. Araştırmanın sonunda, Origanum ilave edilen yemler ile beslenen tavşanlarda kazanılmış immun yanıt üzerinde pozitif etkiler görüldüğü bildirilmiştir (Beghelli ve ark. 2012).

Etçi tavuklarda gerçekleştirilen bir araştırmada, gıda takviyesi olarak enzim (Yemzim B, Orba Biyokimya, İstanbul) ve 250 mg/kg/yem ve 500 mg/kg/yem konsantrasyonlarında Origanum uçucu yağları bireysel veya kombinasyon olarak uygulanarak; performans, sindirim enzimleri, besin sindirilebilirliğı, lipid metabolizması ve immun yanıt üzerine olası etkileri araştırılmış; enzim ve uçucu yağların yem içerisinde verilmesinin performans, besin sindirilebilirliğı, enzim aktivitesi ve bazı immun sistem parametreleri üzerinde olumlu etkisi olabileceğı sonucuna varılmıştır (Basmacıoğlu ve ark. 2010).

Origanum türlerinin antioksidan aktivitesi ile ilişkili yapılan birçok araştırma bitkinin yüksek fenolik içeriklere sahip olması nedeniyle uçucu yağlar, metanol ve su ekstraktları üzerine yoğunlaşmaktadır (Başer ve ark. 2003; Charai ve ark. 1999; Heo ve ark. 2002; Lin ve ark. 2003; Marcincak ve ark. 2008; Muchuweti ve ark. 2007; Özkan ve ark. 2010; Pizzale ve ark. 2002; Raudonis ve ark. 2008; Saraç ve ark. 2007; Sari ve ark. 2006; şkerget ve ark. 2005; Sökmen ve ark. 2004; Yoshino ve ark. 2006; Zheng ve Wang 2001).

Sıçanlarda 1,2 dimetilhidrazin ile oluşturulan kolon kanseri modelinde *O. vulgare* su ekstraktının antioksidan özelliğı ve lipid peroksidasyon üzerine etkileri araştırılmış, *Origanum* ekstraktının oksidatif stresi azalttığı ve dimetilhidrazin uygulanan hayvanlara kıyasla süperoksit dismutaz, katalaz, indirgenmiş glutatyon, glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon S-transferaz aktivitesinin normal düzeylere ulaştığı, antioksidan, antikanser özellik gösterdiği bildirilmiştir (Srihari ve ark. 2008).

2.1.2. *Origanum minutiflorum* 'un Farmakolojik Etkileri

2.1.2.1. Antibakteriyel aktivite

O. minutiflorum 'dan elde edilen uçucu yağların antibakteriyel aktiviteye sahip olduğı ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus faecalis* ATCC 19433,

Bacillus subtilis ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, siprofloksasin dirençli bazı *Campylobacter* türlerine ve *Shigella sonnei* (RSKK 878) suşlarına karşı *in vitro* antibakteriyel etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Aslım ve Yücel 2008; Dadalıoğlu ve Evrendilek 2004; Ocana-Fuentes ve ark. 2010; Öke ve Aslım 2010; Özcan ve Chalchat 2009).

2.1.2.2. Antifungal aktivite

O. minutiflorum'un antifungal etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada uçucu yağın ve metanolik ekstraktların *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Fusarium proliferatum*'a ve *Candida* türlerine karşı antifungal etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Aşkun ve ark. 2008).

2.1.2.3. Antioksidan Aktivite

O. minutiflorum'a ait sulu ekstraktların polar fenolik bileşiklerin konsantrasyonuna bağlı olarak antioksidan etkinlik gösterdiği bildirilmiş ve radikal süpürücü etkileri ile antioksidan etkiden başlıca karvakrol, timol ve rosmarinik asit gibi bileşenlerin sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (Başer ve ark. 2003).

Birçok *in vitro* çalışmada *Origanum minutiflorum*'dan elde edilen farklı ekstraktların antioksidan etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Baddal 2010; Öke ve Aslım 2010). *Origanum minutiflorum* bitkisinden aseton, metanol, diklorometan, kloroform ile elde edilen ekstraktların ve uçucu yağların antioksidan özellikleri araştırılmış ve *in vitro* antioksidan aktivite gösterdikleri ortaya konulmuştur (Baddal 2010). Bir diğer çalışmada *Origanum minutiflorum*'un su, etanol, metanol, aseton, etil asetat ve n-hekzan ile ekstraksiyonu yapıldığında en yüksek ekstraksiyon veriminin su (% 27,4), etanol(% 20,7) ve metanol (% 20,3) ile elde edildiği bildirilmiştir. Antioksidan aktivitenin *in vitro* bir göstergesi olan DPPH radikal süpürücü etki ve demir şelasyon özelliğinin su ekstraktında en yüksek düzeyde olduğu saptanmış ve sonuç olarak su ile ekstraksiyonun antioksidan maddelerin eldesinde uygun bir yöntem olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Öke ve Aslım 2010).

2.1.2.4. Antiparaziter etki

Origanum minutiflorum 'un uçucu yağlarının *Culex pipens* türündeki sivrisinek larvalarına ve *Rhipicephalus turanicus* 'a karşı antiparaziter etkinlik gösterdiği bildirilmiş ve antiparaziter etkiden karvakrol maddesinin sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (Ayvaz ve ark. 2009; Çetin ve ark. 2009).

2.2. Dünyada ve Türkiye’de Alabalık Yetiştiriciliğine Genel Bakış

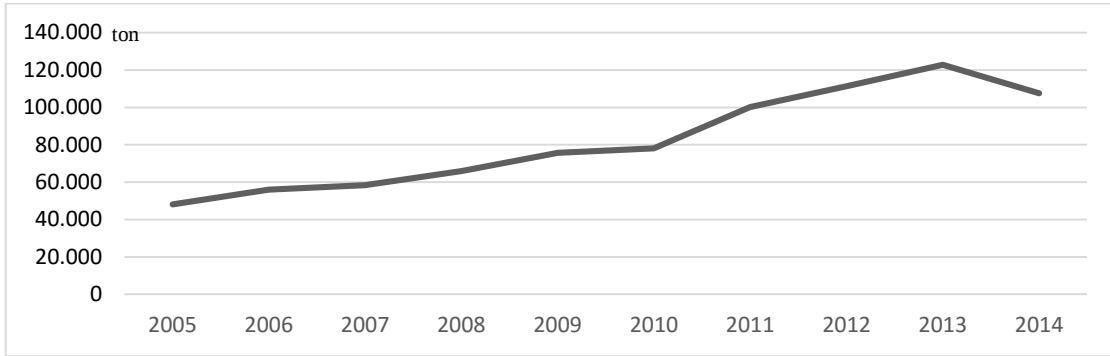
Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), taksonomik olarak *Chondrostei* sınıfı, *Salmoniformes* takımı ve *Onchorhyncus* cinsinde yer almaktadır. Gökkuşağı alabalığı, Asya ve Kuzey Amerika kökenli bir türdür. Üretimi kolay olduğundan, farklı sıcaklıklara ve ortam şartlarında dirençli olması ve hızlı büyüme özelliği nedeniyle iç sularda yetiştiriciliğe oldukça uygun olduğu gözlenmektedir (Zeng 2011).

İstatistik Kurumu verilerine göre, ülkemizde son 15 yıldan beri iç su ve deniz olmak üzere en yüksek miktarda yetiştiriciliği yapılan balık türü alabalıktır (Tablo 2-1: Türkiye’de Yaygın Üretilen Balık Türleri) (Anonim 2015b). Ülkemizde gökkuşağı alabalığı yetiştiriciliği 1970’li yıllarda başlamış ve 1990’lı yılların sonunda entegre üretim tesislerinin kurulması ile hız kazanmıştır. İç su ve denizlerde yetiştiriciliğin toplam miktarı 2010 yılında 167.141 tondan 2014 yılında üretim 235.133 tona yükselmiştir (Tablo 2-1) (Anonim 2015b). Alabalık yetiştiriciliğinde son yıllarda istikrarlı bir büyüme görülmesine rağmen büyümede görülen dalgalanmaların (Şekil 2-1) esas olarak hastalıklarla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Ergönül 2012).

Tablo 2-1: Türkiye’de Yaygın Üretilen Balık Türleri

Balık türü	Toplam	İç Su			Deniz		
		Alabalık Gökkuşağı	Alabalık Salmo sp.	Aynalı sazan	Alabalık Gökkuşağı	Çipura	Levrek
2005	118 277,0	48 033,0	-	571,0	1 249,0	27 634,0	37 290,0
-	-	-	-	-	-	-	-
2010	167 141,0	78 165,0	-	403,0	7 079,0	28 157,0	50 796,0
2011	188 790,0	100 239,0	-	207,0	7 697,0	32 187,0	47 013,0
2012	212 410,0	111 335,0	-	222,0	3 234,0	30 743,0	65 512,0
2013	233 393,9	122 873,3	-	145,5	5 186,2	35 701,1	67 912,5
2014	235 133,0	107 533,0	450	157,0	4 812,0	41 873,0	74 653,0

Kaynak: Anonim (2015a)



Kaynak: Anonim (2015a)

Şekil 2-1: Yıllara Göre Gökkuşığı Alabalığı Üretim Miktarı

2.2.1. Alabalık Yetiştiriciliğinde Karşılaşılan Problemler ve Çözümler

Deniz ve iç sulardaki balıkçılığın azalması ve denizlerin kısıtlı bir kaynak olması nedeniyle, kültür yetiştiriciliğinin sürdürülebilirliğinin ve istikrarlı büyümesinin sağlanması önem kazanmaktadır (Nakagawa ve ark. 2007). Deli dana hastalığı (sığır spongiform ensefalopatisi), şap ve avian influenza gibi hastalıkların birçok ülkede risk oluşturması nedeniyle özellikle Avrupa Birliği ve Amerika Birleşik Devletleri'nde balık tüketiminin arttığı bildirilmiştir. Balık yetiştiriciliğinde artan üretimle beraber yetiştirme havuzlarındaki yoğunluğun artması, alabalıkların çok yakın temasta bulunmaları, suların çabuk kirlenmesi ve bu nedenle su kalitesinin optimal değerlerin dışına çıkması başta bakteriyel hastalıklar olmak üzere birçok hastalığın gelişmesine yatkınlık oluşturmaktadır. Karşılaşılan hastalıklar ürün kalitesinin düşmesine, maliyetlerin artmasına veya toplu balık ölümlerine ve gelişimin yavaşlamasına neden olmaktadır (Björklund ve Bylund 1990).

Balığın fizyolojik durumu; yetiştirme koşulları, su kalitesi, balığın beslenme durumu ve ortamdaki patojenler ile doğrudan bağlantılıdır. Belirtilen faktörlerden bir ve birkaç tanesinde meydana gelen bozulma balığı strese sokarak, bağışıklık sistemi bozulması ile enfeksiyonlara karşı duyarlılığın artmasına neden olur (Magnadottir 2010; Plumb ve Hanson 2011). Metreküp başına balık sayısının yüksek olması, ani sıcaklık değişimleri, oksijen seviyesinin yetersiz olması, suda istenmeyen maddelerin varlığı, elle müdahale, toplama, nakil gibi uygulamalar ve çevresel koşulların uygun olmaması balıklarda akut ve kronik strese sebebiyet vermektedir (Björklund ve Bylund 1990; Scholz 1999). Stres durumunda salgılanan kateşolaminler ve kandaki kortizol sentezinin

artışı hayvanda immun sistemi baskılayıp osmoregülasyonun bozulması nedeniyle dış ortamla sıvı alışverişi bozulmasına ve alabalığın içinde bulunduğu tatlı suyu absorbe etmesine neden olur. Absorbe edilen suyun atılımı için ek enerji harcanması gerekmektedir ancak kandaki kateşolamin artışına bağlı balıktaki enerji rezervleri tükenmesi nedeniyle fırsatçı patojenler hastalıklara veya doğrudan apatojenik akut ölümlere neden olur (McCormick 2011; Reid ve ark. 1998).

Balık hastalıkları etkene bağlı olarak bakteriyel, viral veya paraziter olarak sınıflandırılmaktadır. Hastalık ortaya çıktığında etmenin tesis içi veya tesisler arası taşınma ile hızlıca yayılması söz konusu olduğundan dolayı yüksek ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Balıklarda ekonomik kayba neden olan hastalıklardan bakteriyel kaynaklı olanlar sıklıkla görülmektedir. Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), Avrupa Birliği ve Türkiye’de balık yetiştiriciliğinde kullanılan sınırlı sayıda ruhsatlı antibakteriyel ilaç bulunmaktadır (Baydan ve ark. 2012). Türkiye’de balıklarda kullanıma ruhsatlı, florfenikol, sülfadiazin+trimetoprim, oksitetrasiklin, amoksisilin, oksolonik asit, enrofloksasin içeren toplam 35 adet ruhsatlı veteriner tıbbi ürün bulunmaktadır. Balık hastalıklarının tedavisinde kullanımı kabul edilen kemoterapötik ilaçların sayısının az olması tedavi seçeneklerini sınırlandırmakta ve mevcut ilaçların yoğun kullanımına sebep olmaktadır. Benzer ilaçların yoğun kullanımı ile bağışıklık sisteminin baskılanması, büyümenin yavaşlaması, nefrotoksisite, dirençli bakteri gelişimi ve ilaç kalıntısı gibi sorunlara yol açabilmektedir (Ross ve ark. 2008). Bu durum balık yetiştiriciliği ve toplum sağlığı açısından potansiyel bir sorun olarak görülmektedir (Alderman ve Hastings 1998; Horsberg 2003). Ortaya çıkan hastalıkların tedavisinin zor olması nedeniyle profilaktik uygulamalar önem kazanmaktadır (Le Breton 2009). Hastalıkların tedavisinde karşılaşılan zorluklardan dolayı uygun bakım koşullarının sağlanması, aşı veya immunostimülanlar ile bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi gibi profilaktik yöntemler balık sağlığının korunmasında önem kazanmıştır (Le Breton 2009).

Balıklarda bakteriyel ve viral hastalıklardan korunmada aşılama sıklıkla uygulanan profilaktik bir yöntemdir. Vibriosis, enterik kızıl ağız hastalığı (ERD), furunkuloz ve pankreatik nekroz gibi bazı hastalıklara karşı etkili aşılar geliştirilmiştir. Aşılanmanın balık hastalıklarının kontrolünde en etkin yöntem olarak kabul edilmesine rağmen *Renibacterium salmoninarum* gibi hücre içi patojenlere karşı aşının etkisiz

olmasından dolayı balık hastalıklarının sadece aşılar ile kontrol altında tutulması oldukça güçtür (Kum ve Sekkin 2011).

İmmunostimülan maddelerin kullanımının balıkların hastalığa karşı direncini artırmakta etkili bir araç olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Sentetik kimyasallar, bakteriyel maddeler, polisakkaritler, hayvan veya bitki ekstraktları gibi immunostimülan maddeler enfeksiyöz hastalıklara karşı spesifik immun yanıtın yanında nonspesifik immun savunma mekanizmalarını da artırarak işlev görmektedirler. Nonspesifik immun yanıtın artırılmasının avantajı etkene seçici olmaması nedeniyle tüm patojenlere karşı etki oluşturmaktadır.

Spesifik immun yanıtta balıkların immun sisteminde görevli melanmakrofajik merkezlerinde bulunan B-hücreler patojene ait spesifik antijen ile aktive olduktan sonra proliferasyon olarak uzun süreli hafıza hücrelerine ve plazma hücrelerine farklılaşarak spesifik antikor sekresyonu gerçekleştirirler. Non-spesifik immun sistemin humoral ve selüler yapıların, antijene veya immunostimülanlara bağlı olarak artış gösterse de bu etki immunstimülasyon etkinin ortadan kalkmasıyla sonlanır ve benzer bir patojenle ikinci bir maruziyet nonspesifik immun sistem yanıtında bir artışa neden olmaz. Bu nedenle nonspesifik immun sisteme bağlı olarak gelişen savunma, aşılama ve spesifik immun yanıtı göre daha kısa süreli olmaktadır (Kum ve Sekkin 2011; Subasinghe 2009).

2.3. Alabalıklarda Bağışıklık Sistemi

Balıklarda bağışıklık sistemi, enfeksiyonun meydana gelmesini engelleyen veya enfeksiyona karşı vücudun cevap vermesini sağlayan nonspesifik bağışıklık ve spesifik bağışıklık sistemi olarak iki kategoride incelenmektedir. Nonspesifik bağışıklık sistemi balıklarda temel savunma mekanizması görevi üstlenmektedir (Anderson ve Jeney 1992). Nonspesifik immun sistemin aktivasyonunun yabancı organizmanın (antijen, bakteri, virüs vb) tanınmasına gerek olmaması, kısa sürede yanıt oluşturmaları ve spesifik immun yanıtı göre su sıcaklığından bağımsız çalışması gibi avantajları bulunmaktadır (Ellis 2001). Birçok iç ve dış faktör nonspesifik immun yanıtı etkilemektedir. Balıkların yaşadıkları ortamdaki sıcaklık, pH, tuzluluk, oksijen düzeyindeki değişimler, metreküp başına balık sayısının fazla olması gibi aşırı stoklama sorunu ve balıkların doğrudan elle müdahalesinin söz konusu olduğu durumla doğrudan bağışıklık sistemini etkileyerek baskılayıcı etkiler oluşturmaktadır. Uygulanan immunostimülanlar, fagositik aktivite,

respiratory burst, lizozomal aktivite gibi immun parametrelerde artışa neden olmaktadır, balıklarda hastalığa karşı dayanıklılığı artırmaktadır (Magnadottir 2010; Montero ve ark. 1999; Yıldız ve Pulatsü 1999).

Balıkların savunma sistemi ile memelilerin savunma sistemleri arasında bir takım benzerlik ve farklar bulunmaktadır. Alabalıkların da bulunduğu teleost (gerçek kemikli balıklar) balıkların hücresel savunma sistemlerinde, makrofajlar, nötrofiller, natural killer hücreler gibi fagositik hücreler ve T ile B lenfositler görev alır (Iwama ve Nakanishi 1996; Ribas Cabezas ve ark. 2006; Tort ve ark. 2003). Teleost balıklar ayrıca komplement, lizozim, natural hemolizin, transferrin ve C-reaktif protein (CRP) gibi çeşitli humoral savunma sistemlerine sahiptir. Memelilerden farklı olarak kemik iliği ve lenf nodüllerinin balıklarda bulunmamasına rağmen timus, dalak ve ön böbrek memelilerdeki lenfoid organ görevini üstlenir (Press ve ark. 1996).

2.3.1. Nonspesifik İmmun Sistemde Görev Alan Organ ve Dokular

Nonspesifik immun sisteminde görev alan yapılar; fiziksel bariyerler, hücresel ve humoral bileşenler olarak ayrılmaktadır (Fearon 1997).

Deri ve Mukozal Bariyerler

Balıkların deri ve mukozası, yabancı maddelere ve patojenlere karşı doğal fiziksel bir engel görevi görmektedir. Mukoza; glukoprotein (lektin) ve polisakkaritlerden meydana gelir. Polisakkaritler; epidermisten, solungaçlardan ve bağırsak mukozasındaki goblet hücreleri tarafından salgılanır (Svendsen ve ark. 1999). Mukoza; solungaçları, deriyi veya bağırsak içerisini sararak balık patojenlerinin bu bölgelerde kolonileşmesini önler. Ayrıca içerdiği lektin, pentraksin, lizozim, komplement proteinler, antibakteriyel peptitler ve IgM gibi immun parametreler ile enfeksiyonlara karşı kimyasal olarak koruyucu görev de gördüğü bildirilmektedir (Alexander ve Ingram 1992; F Aranishi ve Nakane 1997).

Timus

Yetişkin balıklarda memelilere oranla timus daha küçük boyuttadır. Balıkların timusu, primer olarak retiküler endotel hücre ağı içerisinde oluşan lenfoblastlardan meydana gelir (Rombout ve ark. 2005; Turner 1994). T-lenfositlerin gelişimi de timus dokusunda gerçekleşmektedir. Erişkin T-hücreleri timustan serbest bırakılarak

immunolojik diğer organ ve dokulara dağılır. T-lenfositler yabancı antijenik peptitleri, diğer antijenik yapıları ve temel doku-uygunluğu bileşeni (MHC) isimli hücre yüzey moleküllerini tanır ve programlı hücre ölümü ile ölümlerine neden olur (Kindt ve ark. 2007; Rombout ve ark. 2005).

Böbrekler

Böbrek, kan hücrelerinin oluşumunda ve bağışıklık sisteminde görev alan önemli bir organdır. Balıklarda anterior (ön, baş) ve posterior (gövde) olmak üzere iki bölümden oluşur. Böbrek, antijen sunumunda görevli olan fagositik hücreler ile kaplı sinüzoidlerin oluşturduğu bir retiküloendotelyal sisteme sahiptir. İçerisinde plazma hücrelerinin, lenfositlerin, makrofajların bulunduğu melanomakrofaj merkezleri antijen tuzaklama ve immun yanıtlarda görev alır. Balıklarda, memelilerden farklı olarak, kan hücrelerinin farklılaşması kemik iliği yerine böbreklerde gerçekleşir. Gelişimin erken dönemlerinde kan hücrelerinin ve erken immun yanıtların oluşturulmasında görev alır. Anterior böbreğin primer B-lenfositlerden oluştuğu ve B-hücrelerinin burada geliştiği kabul edilmektedir (Agius ve Roberts 2003).

Dalak

Dalak; balıklarda antijenlerin işlenmesi, antikor üretimi ve antijen hafızası süreçlerinde immun sistemde görev yapan bir organdır. Dalak, bazı balık türlerinde tek yapı halinde, bazı türlerde ise iki veya daha fazla parçacığa ayrılmış şekilde bulunmaktadır (Ferguson 1976). Dalakta bulunan melanomakrofaj merkezlerin temel görevi eritrositlerin parçalanmasını gerçekleştirmektir. Dalak, kemikli balıklarda daha gelişmiş yapıda olup içerisinde kırmızı pulpa, beyaz pulpa, melanomakrofaj merkezler ve elipsoidler yer almaktadır. Elipsoidler; eritrosit, fagositik hücreler ve diğer maddeleri yakalama özelliği gösterir ve makrofajların yardımıyla dalak lenfositleri antijene karşı aktif hale geçerek nonspesifik immun yanıtta katkıda bulunmaktadır (Hadidi ve ark. 2008, Ferguson 1976).

Bağırsaklar

Balıklarda lenf yumruları bulunmamaktadır. Balıklarda memelilerdeki lenfatik sisteme denk gelen; böbrek, dalak ve bağırsaktaki lenfatik dokular antijen sunumu ve işlenmesinde görev almaktadır (JH Rombout ve ark. 2011). Bağırsaklarda bulunan lenfatik doku, lenfoid hücreler ve foliküllerden oluşmaktadır (J Rombout ve ark. 1989).

Ayrıca bağırsak epitelinde bağışıklıkta önemli rolü olan immunoglobulin Ig⁺ ve Ig⁻ hücreleri bulunur.

2.3.2. Nonspesifik İmmun Sistemde Görev Alan Hücreler

Balıkların nonspesifik hücresel savunma sisteminde görev alan hücreler arasında granülositler (nötrofiller), monositler, makrofajlar ve spesifik olmayan sitotoksik hücreler anahtar rol oynar (Frøystad ve ark. 1998; Neumann ve ark. 2001; C Secombes ve Fletcher 1992). Balık fagositleri (makrofajlar ve nötrofiller) patojenlerin yüzeyine reseptör ekleyerek nonspesifik bağışıklığı aktive ederler. Bu reseptörler patojen tanıyan reseptörler olarak tanımlanır ve balıklarda yer alan patojenlere ait karbonhidrat, nükleik asit, peptidoglikanlar ve lipoproteinler gibi patojen ilişkili moleküler kalıpları tanıyarak patojenlerin varlıklarını belirler ve nonspesifik bağışıklığı aktive eder (Boltaña ve ark. 2011).

Monositler ve Doku Makrofajları

Monositler veya doku makrofajları balıklarda patojenlerin tanınması, fagozitozu ve yok edilmesinde görev alır. Monositler ve makrofajlar, aynı zamanda sitokinlerin üretiminde ve yangıda görev alan önemli hücrelerdir (Shoemaker ve ark. 1997). Ayrıca makrofajlar, nonspesifik immün ve spesifik immün yanıtları başlatan antijen sunumu işleminde görevlidir (Forlenza ve ark. 2011).

Nötrofiller

Nötrofiller (granulositler), balıklarda yangının başlangıcında (ilk 12-24 saat), fagositozda ve immün sistem hücrelerinin enfekte bölgede toplanması için sitokinlerin üretiminde görev alan primer hücrelerdir (Turner 1994). Nötrofillerin aldıkları görevler balık türüne göre değişkenlik göstermektedir. Kanal yayınbalığında nötrofillerin, hücre içi mekanizmalardan ziyade hücre dışı mekanizmalarla bakterileri fagositte ettiği bildirilmiştir (Ellis 1980). Nötrofil ve monositler gibi hücrelerin gerçekleştirdiği fagositoz işlemi; virüs, bakteri, mantar ve parazitler gibi patojenlere karşı gelişen nonspesifik immün yanıtın bir parçasıdır. Nötrofiller gibi fagositik hücreler, kemotaksi ile yangının olduğu bölgeye geldikten sonra mikroorganizmalara nonspesifik hücre yüzey reseptörlerini tanıyarak saldırır. Nötrofilin membranı enfeksiyöz ajan ile aktive olmamış ise nötrofiller, psöydopodları ile mikroorganizmayı sararak fagositte eder.

Fagosit edilen mikroorganizma oksijene bağı (respiratory burst) veya oksijene bağı olmayan mekanizmalar ile öldürölür (Siwicky ve ark. 1998).

Nonspesifik Sitotoksik Hücreler

Balıklarda yer alan nonspesifik sitotoksik hücrelerin görevleri; memelilerdeki doğal öldürücü hücreler ile benzerlik göstermektedir. Nonspesifik sitotoksik hücreler, bağışıklık sisteminde görev alarak tümör hücreleri, virüs ile enfekte hücreler veya protozon parazitler gibi çok çeşit hücreleri öldürmektedir (Evans ve Jaso-Friedmann 1992). Nonspesifik sitotoksik hücreler, hedefledikleri hücrelerin reseptörlerine bağlanarak veya sinyal mekanizmaları ile hedef hücrenin lize olması için gerekli işlemleri başlatmakta görevlidir (Evans ve Gratzek 1989).

2.3.3. Humoral Parametreler

Balıkların serum, mukus ve yumurtalarındaki patojenlere karşı mücadele eden birçok nonspesifik humoral molekül bulunmaktadır (Magnadottir 2006). Humoral parametreler; büyüme inhibitörleri, çeşitli litik enzimler ve komplement yolak bileşenleri, aglütininler ve presipitinler (opsonin, primer lektin), doğal antikorlar, sitokinler, kemokinler ve antibakteriyel peptitler içermektedir (Magnadottir 2006).

Lizozim

Lizozim, bakteri hücre duvarında bulunan N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozamin arasındaki 1-4- β bağlantılarını parçalayarak antibakteriyel etkinlik gösteren bir enzimdir. Lektinlere benzer olarak lizozim, fagositoz için bir opsonin görevi görür ve komplement sistemi aktive eder. Lizozim, ayrıca hedef hücrenin opsonizasyonunda ve yangıda görev alan hücrelerin aktivasyonunda önemli bir faktördür (Lee 2015; Grinde 1989; Jollès ve Jollès 1984). Asıl etkisi, gram pozitif bakterilere karşı olmasına rağmen gram negatif bakteriler de lizozim tarafından lize edilebilmektedir. Birçok balık türünde mukus, lenfoid doku, plazma ve diğer sıvılarda bulunur (Grinde 1989; Yousif ve ark. 1994)

Komplement Sistem

Komplement sistem patojenlerin lize edilmesi, mikroorganizmaların ve immun komplekslerin opsonizasyonunda ve yangının kontrolünde görev alan ve serumda bulunan bir grup molekül olarak tanımlanır. Komplement üretiminden karaciğer

sorumludur ve balıklarda komplement klasik yolla (spesifik immunoglobulin veya IgM), alternatif yolla (bakteriyel hücre duvar bileşenleri, viral yapılar, parazitlerin yüzey molekülleri) ve lektin yolağı (mannoz bağlayan lektinin mikroorganizma yüzey molekülleri ile etkileşmesi) gibi mekanizmalar ile aktive olur (Boshra ve ark. 2006). Tüm yollar balıkta mevcut olmasına rağmen bileşenleri ve etkileri henüz tam tanımlanmamıştır (Sakai 1992). Komplement sistemin en önemli bileşenleri C1r, C2, C3, C4 ve C5-C9 olarak tanımlanmış ve etkileri gösterilmiştir (Boshra ve ark. 2006).

Transferrin

Balıkların serumunda bulunan transferrin, demir transportunda görev alan demir taşıyıcı bir glikoproteindir. Transferrin bakteride bulunan demir ile şelasyon yaparak bir büyüme inhibitörü olarak rol oynar (Langston ve ark. 1998).

Proteaz İnhibitörleri

Balıklarda α -2-makroglobulin gibi proteaz inhibitörü enzimler proteolitik enzimleri nötralize ederek, bakteriyel patojenlere karşı nonspesifik immün yanıtın gelişmesinde önemli bir rol oynar (F. Aranishi 1999; Lee 2015). Proteaz inhibitörlerinin temel görevi vücut sıvılarındaki homeostasisi sağlamaktır ve ayrıca patojenlere karşı savunmada proteolitik enzimlerin serbestlenmesinde de görev yapar (Ellis 1987; Zuo ve Woo 1997).

Kitinazın bakteriyel ve fungal patojenlere karşı savunmada bir rol oynadığı düşünülmektedir ancak mevcut etkinin daha detaylı çalışmalarla kanıtlanması gerekmektedir (Lindsay ve Gooday 1985; Manson ve ark. 1992).

Lektinler

Lektinler, bakteri, virüs ve parazitlerin yüzeyinde bulunan şekerlere nonspesifik bir şekilde bağlanarak presipitasyon ve aglutinasyon reaksiyonları meydana getiren glikoproteinlerdir. Bazı lektinler hücre tanınması ve bağlanmasında görev alarak fagositoz için opsonin gibi davranırlar ve ayrıca komplement sistemin aktivasyonunda görev alırlar. Balıklarda bilinen lektinler arasında C-tipi lektinler, mannoz bağlayan lektin, pentraksinler (C-reaktif protein ve serum amiloid proteini) ve fikolin bulunmaktadır (Sharon ve Lis 1993). Mukozal veya serum agglütininleri ve presipitinleri, C-tipi lektinler ve pentraksinler gibi lektinlerdir. C-tipi lektinler mannoz, N-asetil

glukozamin veya fruktoz gibi farklı karbonhidratlara Ca^{+} iyonlarının varlığında spesifik olarak bağlanma gösterir. Karbonhidrat bağlayıcı proteinler ile karbonhidratların etkileşimi opsonizasyona, fagositozise ve komplement sistemin aktivasyonuna sebebiyet verir (Lindsay ve Gooday 1985).

Pentraksinler, omurgasız ve omurgalıların vücut sıvılarında bulunan lektinlerdir ve akut faz yanıtında görev alır (Bayne ve Gerwick 2001). Pentraksinler, spesifik olmayan bağışıklıkta komplement yollarının aktivasyonunda, apoptotik hücrelerin tanınması ve temizlenmesinde görev üstlenmektedir (Nauta ve ark. 2003).

Sinyal Molekülleri

Nekrozis faktörleri, interlöykinler (IL), interferonlar ve kemokinler gibi balıklarda bulunan birçok farklı sitokin nonspesifik ve spesifik immun yanıtların düzenlenmesinde görev alırlar (Goetz ve ark. 2004; Robertsen 2006)

Doğal antikorlar (immunoglobülinler) edinsel bağışıklığın birer parametreleri olmalarına rağmen spesifik olmayan bağışıklıkta görev alırlar (Sinyakov ve ark. 2002).

2.3.4. İmmunostimülan Maddeler

Konakçının patojenlere karşı oluşturduğu nonspesifik veya spesifik immun yanıtı güçlendiren her türlü işlem, etki, kimyasallar ve ilaçlar immunostimülan olarak tanımlanmaktadır (DP Anderson 1992; Bricknell ve Dalmo 2005).

Su ürünleri ve balık yetiştiriciliği için hastalıkları kontrol etmek amacıyla kullanılan antibiyotik, kimyasal gibi ilaçlara bir alternatif olarak immunostimülanların kullanımı değer kazanan bir konudur. İmmunostimülan maddeler enjeksiyon, banyo veya oral yolla uygulandıklarında nonspesifik immun yanıtı artıran maddelerdir (Jeney ve Anderson 1993; Sakai 1999). Bilinen en yaygın immunostimülan maddeler glukanolardır (Engstad 1993) ancak sentetik bileşikler, polisakkaritler, vitaminler hayvansal ve bitkisel ekstraktların da immun yanıtı artırarak hastalıklara karşı direnci geliştirdiği bildirilmiştir (GJ Anderson ve ark. 1992; Jeney ve Anderson 1992; Raa 2000).

Tatlı su ve tuzlu su balıklarında ve diğer su canlılarında bitkisel immunostimülanlar oral yolla ve enjektabl olarak uygulandıklarında bakteriyel, viral ve parazitik hastalıklara karşı nonspesifik ve spesifik immun yanıtı artırdığı görülmüştür. Su ürünleri yetiştiriciliğinde gelişim artırıcı olarak antimikrobiyal, antiparaziter veya besin

desteği gibi amaçlarla kullanılan birçok bitki bulunmaktadır. Bitkisel katkılar, doğal kaynaklı olması, balık ve insan sağlığına ve çevreye belirgin bir tehlike oluşturmaması gibi avantajlara sahiptir (Gabor ve ark. 2012).

Tıbbi bitkiler, nonspesifik immun yanıt bileşenlerini aktive ederek etkinlik göstermektedir. Farklı balık türlerinde, bitkilerin kendisi veya ekstraktlarının yem veya intraperitoneal enjeksiyon uygulamalarının lizozim, komplement, antiproteaz, miyeloperoksidaz, fagositozis, respiratory burst aktivitesi, nitrik oksit, fenoloksidaz gibi birçok nonspesifik immun sistem parametrelerine ek olarak bakteriyel hastalıklara karşı kazanılmış immun yanıtta da (antikor titresi, bakterisidal aktivite, hemaglutunasyon) artışa neden olduğu gözlenmiştir. Bitkiler nonspesifik immun sistem yanıtını doğrudan mekanizmalar ile artırabilir ve hücre içi genlerin aktivasyonuna sebebiyet vererek antimikrobiyal moleküllerin üretiminde artışa neden olabilir (Bricknell ve Dalmo 2005; Galina ve ark. 2009).

Diğer immunostimlanlarda olduğu gibi bitkilerin de etkinliği doza ve tre bağlı olarak değişkenlik gösterir. Aynı bitkilerden elde edilen ekstraktların içeriği bitkinin toplanma zamanına ve ekstraksiyon yöntemine bağlı olarak farklılık gösterdiğinden dolayı etkinlik ve kalitenin standardizasyonu bitkisel ilaçların üretiminin ve kullanımın en büyük dezavantajdır. İmmunostimülan maddelerin normal koşullarda immun yanıtı güçlendirmesi beklenmesine karşın aşırı dozda veya uzun süreli kullanımı down regülasyon sonucu direnç oluşturarak etkilerini azaltabilir (Galina ve ark. 2009; Ramasamy Harikrishnan ve ark. 2010; Liu ve ark. 2011).

İmmunostimlanlar oral, enjektabl ve immersiyon şeklinde kullanılabilir. Ancak immersiyon veya enjeksiyon yöntemleri hayvanlarda stres faktörü oluşturduğundan dolayı ve 15 gramdan küçük balıklara uygulanamaması nedeniyle pratik değildir (R. A. Dalmo 2002). Yem içerisinde oral uygulama ekstansif yetiştiriciliğe ekonomik olarak uygun bir yöntemdir, stres oluşturmaz ve balıkların büyüklüğüne bağlı değildir. Bitkilerin ve bitkisel ekstraktların büyük bir kısmı oral olarak verilmekte olup yem içerisinde oral kullanımı en güvenli yol olarak kabul edilmektedir (Galindo-Villegas ve Hosokawa 2004).

Spesifik antikor üretiminin başlamasından önce ve yavru balıkların (fingerling) yeme geçiş sürecinde hastalıklara karşı direncin artırılmasında immunostimülan

kullanımının faydalı olabileceği bildirilmiştir (Raa 1996). İmmunolojik olarak erişkin balıklarda yem içerisinde immunostimülan kullanımı, bakteriyel ve viral hastalıklara karşı korumayı artırdığından dolayı birçok çalışmada yararlı bir yöntem olarak görülmektedir (Bricknell ve Dalmo 2005). Ancak bazı bitkisel bileşikler immun sistemi stimüle edeceği gibi immun sistem üzerinde inhibisyona da sebebiyet verebilir. Bu nedenle balık tür çeşitliliğinin fazla olması ve türler arası farklılıkların varlığından dolayı bitkisel immunostimülanların immun sistem üzerindeki etkinliğinin farklı olabileceği bildirilmiştir (Bricknell ve Dalmo 2005; Yin ve ark. 2006).

İmmunostimülan maddelerin balıklarda elleçleme, taşıma gibi stres yaratan olaylardan ve gerçekleşebilecek mevsimsel enfeksiyonlardan önce kullanılmasıyla; sağlık üzerinde oluşan olumsuz etkiler azaltılabilmektedir. Ancak balıklarda nonspesifik immun sistemin gelişmesi için belirli bir süre gerektiğinden immunostimülan uygulama zamanı uygun olarak ayarlanmalıdır (DP Anderson 1992). Balıkların taşınması ciddi stres etkisi oluşturmakta, balıkta mevcut olan bir patojenin hastalık oluşturma nedeniyle yüksek mortalitelere sebep olmaktadır. Kullanılan immunostimülanın etki süreleri göz önüne alınarak potansiyel patojen maruziyetine veya stres oluşumuna yakın kullanılmalıdır. (DP Anderson 1992). Nonspesifik immun sistemin bir hafıza bileşeni olmadığından dolayı, etkisi süresi kısadır (Gannam ve Schrock 1999).

2.3.4.1. İmmunostimülanların Etkinliğinin Değerlendirilmesi

İmmunostimülanların etkinliklerinin değerlendirmesinde temel olarak *in vivo* ve *in vitro* yöntemler kullanılmaktadır. *In vivo* yöntemler arasında deneysel enfeksiyona karşı hayatta kalma süresi, viral enfeksiyonlara karşı direnç, büyümenin belirlenmesi yer alırken, *in vitro* yöntemler arasında respiratory burst aktivitesi, fagositozis, antikor üretim düzeyleri, serbest radikal üretimi, lizozim aktivitesi, komplement aktivite, makrofaj aktivite faktörü, nitroblue tetrazolyum reaksiyon, sitokin ve nitrik oksit üretimi gibi inceleme yöntemleri bulunmakta olup olup respiratory burst aktivitesi, fagositik aktivite ve lizozomal aktivitenin belirlenmesi en sıklıkla kullanılan yöntemler olarak sıralanmaktadır (Kum ve Sekkin 2011).

Fagositoz sırasında fagositer hücrelerin aktive olması ile oksijen metabolizmasında yüksek düzeyde artış meydana gelmektedir. Oksijen tüketiminde meydana gelen bu artış durumu respiratory burst olarak isimlendirilir. Respiratory burst

ile artan oksijen metabolizması sırasında reaksiyon ara ürünleri olarak süperoksit radikalleri, hidrojen peroksitin, singlet oksijen ve hidroksil gibi reaktif oksijen türleri (ROT) açığa çıkar. Fagosit edilen bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkinliğin temelini oluşturan süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksitin aynı zamanda antioksidan kapasitenin düşük olduğu durumlarda sağlıklı hücreler üzerinde de oksidatif stres meydana getirdiği bilinmektedir (Hoar ve ark. 1997; Anderson 1994; Secombes 1996).

Fagositler, yabancı kimyasal maddeler ile stimüle edildiğinde respiratory burst aktivitesinde 10 kata varan bir artış görülmektedir. Meydana gelen en yüksek respiratory burst seviyesinin tespiti, balıklardaki nonspesifik immun sistemin önemli bir indikatörü olarak kullanılmaktadır (Miyazaki 1998). Zimosan veya forbol miristat asetat, fagositer hücreleri uyardığından dolayı respiratory burst seviyesini artırmakta ve respiratory burst aktivitesinin tespit edildiği analiz yöntemlerinde kimyasal madde olarak kullanılmaktadır (Lieberman ve ark. 1996; Nagelkerke ve ark. 1990. Gökkuşluğu alabalığına ait anterior böbrek hücrelerindeki fagositler, dinlenme durumundaki oksijen tüketimi 1,3 nmol O₂/dak/10⁷ hücre olarak tespit edilmişken, zimosan gibi bir stimulan ile uyarıldığında oksijen tüketiminin 10 katına çıktığı bildirilmiştir. Respiratory burst sırasında açığa çıkan protonlar ile luminol maddesi kimyasal ışıma (kemiluminesans) meydana getirir. Bu nedenle luminol maddesi, kemiluminesansın luminometre ile saptanmasında kimyasal bir prob olarak kullanılmaktadır. (Gyllenhammer 1987; Vilim and Wilhelm 1989).

2.3.4.2. Balıklarda Kullanılan İmmunostimulan Maddeler

İmmunostimulan bileşikler etki şekillerinden bağımsız olarak altı temel gruba sınıflandırılabilir (Maqsood ve ark. 2011).

1)Sentetik kimyasallar: Levamizol, FK-565 ve muramil dipeptit.

2)Mikroorganizma kaynaklı maddeler: β -glukanlar, peptidoglikan, lipopolisakkarit (LPS), bakterin, Freudun tam adjuvantı ve EF203.

3)Nutrisyonel faktörler: C ve E vitamini.

4)Bitkisel ve hayvansal ekstraktlar: Polisakkaritler, kitosan, kitin, lentinans, oligosakkaritler, Hayvansal bileşenler: EF-203 (Tavuk yumurtası), Ete (*Ecteinascidia tubinata* ekstraktı).

5)Hormonlar: Laktoferrin, büyüme hormonu, troid hormonu ve prolaktin

6)Diğer sitokinler: IL-2, TNF-a, TGF- B (Pérez ve ark. 2014)

Balıklarda gerçekleştirilen çalışmalarda yukarıda yer alan maddelerin yem içine eklenmesiyle büyüme oranında artış, paraziter, bakteriyel, viral ve fungal enfeksiyonlara karşı direnç artışı gözlenmiş ve buna ek olarak fagositik aktivite, doğal antikorların ve antimikrobiyal bileşiklerin üretimi, komplement sistemin aktivasyonu ve serum bakterisidal aktivite artışı gibi nonspesifik bağışıklık parametrelerinde artış meydana geldiği gösterilmiştir (Lim ve Webster 2001).

Balıklarda immun yanıtı güçlendirmek ve yanıt süresini uzatmak için kullanılan kimyasal maddeler ve ticari ürünler Tablo 2-2’de verilmiştir.

Tablo 2-2: Su Ürünlerinde Kullanılan İmmunostimülan maddeler

Ticari İsim	İçerik	Firma
Ergamisol®	Levamisol	Sigma-Aldrich
İmmustim®	β -1,3/1,6 gluklan, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	İmmuDyne Inc.
İmmutol®	β -1,3/1,6 gluklan, <i>S cerevisiae</i>	Biotec Pharmacon
MacroGard®	β -1,3/1,6 gluklan, <i>S cerevisiae</i>	Tatio Co Ltd.
EcoActiva®	β -1,3/1,6 gluklan, <i>S cerevisiae</i>	Carlton UniteD Breweries Ltd.
PenStim®	β -1,3/1,6 gluklan, <i>S cerevisiae</i>	International Aquaculture Biotechnologies Ltd.
EcLPS®	<i>Escherichia coli lipopolisakkariti</i>	Sigma-Aldrich
Vitamin C	Askorbik asit	Sigma-Aldrich
AquaVac®Ergosan™	<i>Laminaria digitate</i> , <i>Ascophyllum nodosum</i> , Alg temelli yem katkısı	MERCK Animal Health
Rovim® stay-®35	L-askorbil-2-monofosfat	DSM Corporate Ltd.
İmmuplus (aquaimmu)	Karma bitkili kompozisyon	Indian Herbs Supply Research CL
Lactoferrina	<i>Leche vacuna</i>	DMV international
AquaGen™	DNA RNA nükleotitleri	Novartis-AG Ltd.

Kaynak: Pérez (2014)

Levamisol

Levamisol, antihelmentik ve immunostimülan etkilerinden dolayı hayvanlarda sıklıkla kullanılan bir imidatiyazol türevi bir maddedir. Bileşiğin doğrudan bakteri, virüs ve mantar üzerine etkisi olmamasına rağmen lenfositleri ve makrofajları stimüle ettiği bilinmektedir (Munday ve Zilberg 2003; Renoux 1980). Balıklarda komplement aktivite, lizozim aktivitesi, antikor oluşumu, fagositosis ve lökositlerin nonspesifik sitotoksitesini stimüle ettiği belirlenmiş, *in vitro* ve *in vivo* uygulamaların *Aeromonas*

hydrophila (Kajita ve ark. 1990; Maqsood ve ark. 2009) gibi patojenlere karşı hayatta kalma ve büyüme oranını artırdığı görülmüştür (Sakai 1999). Farklı çalışmalarda yüksek dozlarının immun yanıtı baskılayıcı etkisi olduğu ve doz belirleme ile ilgili çalışmalara gereksinim duyulduğu bildirilmektedir (Maqsood ve ark. 2011).

β-glukanlar

Glukanlar, su ürünlerinde kullanılan popüler immunostimülanlar arasında yer almaktadır. Maya, mantar, alglerin hücre duvarlarından elde edilir. En çok kullanılan türü 2-4 mikron çapında bir mikropartikül olan β-1,3 glukandır (Guselle ve ark. 2007).

β -glukanlar hayvanlarda antijenik özellik göstermez. Balık türlerinde güçlü bir immunostimülan kullanımı yaygın olarak kabul edilmekte (Şahan ve Duman 2010); parenteral ve oral yolla uygulandıklarında entansif yetiştirme koşullarında stres ve enfeksiyonlara karşı direnci artırdığı ve hayatta kalma oranında artış meydana getirdiği bildirilmiştir (Dimitroglou ve ark. 2009).

Lipopolisakkaritler

Gram negatif bakterilerde suşa veya patojeniteye bağlı olmaksızın bulunan lipopolisakkaritler (LPS) memelilerdeki immun yanıtı artıran en güçlü modulatorlerden bir tanesidir. Lipopolisakkarit (LPS) preparatları *Salmonella typhimurium* veya *Escherichia coli* gibi gram negatif bakterilerden ekstrakte edilen O-antijenler ve endotoksinler içermektedir (DP Anderson 1992; CJ Secombes 1994). LPS'nin *in vivo* ve *in vitro* immunostimülan etki gösterdiği birçok balık türünde tespit edilmiştir (Congleton ve Wagner 1991; Macarthur ve ark. 1984; Savan ve Sakai 2006). LPS ile banyo uygulaması yapılan Hippoglossus larvalarında *Aeromonas salmonicida*'ya karşı maruziyette hayatta kalma oranının arttığı bildirilmiştir (R Dalmo ve ark. 1998). Lökosit sayılarında, hayatta kalma oranında, nötrofillerin, monositlerin yüzdelerinde ve antikor titrelerinde artış görülmüştür (Sevaraj ve ark. 2004). LPS'ler atlantik somon ve alabalığında lektin gibi akut faz proteinlerinin oluşumunu tetikleyebilir. LPS'lerin alternatif komplement yolları aktive edebildiği bildirilmiştir. LPS aşısı, adjuvant veya immunostimülan olarak oral, intraperitoneal veya banyo immersiyan olarak kullanılmaktadır (Roy A Dalmo ve ark. 2000; Sobhana ve ark. 2002).

C Vitamini

C vitamini eksikliğinin balıklarda immun sistemin hücre sel yapılarında meydana gelen reaksiyonları olumsuz yönde etkilediği gözlenmiştir (Ai ve ark. 2006). Vitamin C yetersizliğinde *Vibrio* spp., *Aeromonas* spp. ve diğer patojenlerin oluşturduğu bakteriyel hastalıklara duyarlılığının arttığı ve hayatta kalma oranının düşmesine neden olduğu bildirilmiştir (Pérez ve ark. 2014). Dabrowski ve ark. (2004) C vitamininin stres durumunda balıkların strese karşı yanıtında pozitif etkisi olduğunu bildirmiştir.

Freund's Complete Adjuvant (FCA) ve Freund's Incomplete Adjuvant (IFA)

Freund's Complete Adjuvant (FCA) bakteri duvarlarının mineral yağlar içerisinde hazırlanan bir preparattır (Moritoma ve ark. 1992). FCA enjeksiyonu sonrasında gökkuşadı alabalıklarında *V. anguillarum* deneysel enfeksiyonuna karşı direnç artışının yanısıra, respiratory burst ve fagositik aktivitede kontrol grubuna kıyasla artış görüldüğu bildirilmiştir (Kajita ve ark. 1992).

Freund's Incomplete Adjuvantı (IFA), FCA'nın *Mycobacterium* bileşeni bulunmayan fizyolojik tuzlu su içerisindeki halidir (DP Anderson ve ark. 1992). IFA'nın eklendiği furunkulozis (*A. Salmonicida*) aşısının enjekte edildiği kahverengi alabalıklarda meydana gelen antikor titrelerinde kontrol grubuna kıyasla 160 katlık bir artış meydana geldiği bildirilmiştir (Krantz ve ark. 1963). İmmun yanıt üzerindeki olumlu etkilerine rağmen enjeksiyon yerlerinde yaralar oluşturması nedeniyle FCA ve IFA'nın ticari kullanımı azdır (Anderson 1996).

Muramil Dipeptitleri (MDP)

Muramil Dipeptitler, mycobacterium kökenli biyolojik olarak aktif peptidoglikan türevleridir (DP Anderson 1992; CJ Secombes 1994). Enjeksiyondan 1-2 gün sonra respiratory burst aktivitesi ve fagositik aktiviteyi artırdığı bildirilmiştir (Kodama ve ark. 1993).

Hormonlar

Laktoferrin, anjiotensin II ve tiroit hormonlarının immunmodulator ve immunostimülan potansiyeli incelenmiştir (Lim ve Webster 2001; Sahoo 2007). Temel olarak inek sütünden ekstrakte edilen laktoferrin maddesinin tilapia ve kanal yayın

balığında lizozim aktivitesi ve fagositik aktivitede artışa sebep olduğu gözlenmiştir (Harris ve Bird 2000).

Bitki ekstraktları

Bitki ekstraktlarının içerisinde bulunan alkaloidler, flavonoidler, pigmentler, fenoller, terpenoitler, steroidler ve uçucu yağların balıklarda stres önleyici, gelişim artırıcı, iştah artırıcı, tonik, immunostimülan ve antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmektedir (Galindo-Villegas ve Hosokawa 2004; Sivaram ve ark. 2004).

Balık türlerinde immunostimülan olarak kullanılan bitkiler arasında *Ocimum* spp. (Alishahi ve ark. 2010), *Aloe vera*, *Zingiber officinale* ve *Cytrus* spp. (Harris ve Bird, 2000) sayılabilir. Yukarıda yer alan bitkilerin nötrofil, makrofaj ve lenfositlerin sayısını ve fagosit aktivite, lizozomal aktivite ve serum bakterisidal aktivite gibi parametreleri artırdığı çalışmalarda gözlenmiştir (Galindo-Villegas ve Hosokawa 2004; Harris ve Bird 2000; Jayathirtha ve Mishra 2004; Ranjbar ve ark. 2010).

Tilapya türü balıklarda *Allium sativum* bitkisinin (sarımsak) 0,5 g/kg yem konsantrasyonunun büyüme ve immun sistem üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada lökosit sayısı, respiratory burst, fagositik aktivite ve lizozim aktivitesini artırarak immunostimülan özellik gösterdiği bildirilmiştir (Gabor ve ark. 2012). Gökkuşığı alabalıkları yemlerine zencefil (*Zingiber officinale*) ilave edilmesinin *Aeromonas hydrophilia* ile deneysel enfeksiyonda hayatta kalma oranını artırdığı bildirilmiştir. Gökkuşığı alabalığı yemlerine % 2 sarımsak, % 1 zencefil % 1 origanum ve % 0,5 ekinezya eklendiği çalışmada immunostimülan etkinlik değerlendirilmiş; deney grubunun ağırlık kazancı, spesifik büyüme oranı, lizozomal aktivite ve toplam lökosit sayısının yanısıra deneysel enfeksiyon sonrasında hayatta kalma oranının kontrol grubuna göre arttığı gözlemlenmiştir (Aly ve ark. 2008). Zheng ve arkadaşları (2009) tarafından kanal yayın balığında origanum uçucu yağlarının büyüme, antioksidan etki ve *Aeromonas hydrophila*'ya karşı direnç incelenmiş; kilo artışı ve yem dönüştürme miktarında kontrol grubuna kıyasla artış gözlenmiştir.

2.4. Alabalıklarda Oksidatif Stres ve Etkileri

Oksidatif stres, ilk kez Sies (1991) tarafından “oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin reaktif oksijen türleri lehine bozulması ve potansiyel hasara yol

açması” olarak tanımlanmıştır. Oksijen, aerobik organizmalarda yaşamsal öneme sahip birçok metabolik proste temel molekül olarak kullanılır. Balıklarda yaşam süresince hücre mitokondri ve endoplazmik retikulum membranlarında gerçekleşen oksijen metabolizması sırasında süperoksit radikaller ve hidrojen peroksit yan ürün olarak açığa çıkar (Hidalgo ve ark. 2002). Oksijen metabolizması sonucunda oluşan, farklı moleküller ile kimyasal reaksiyonlara girebilen ve kararsız elektronu bulunan kısa ömürlü atom, molekül ve iyonlar serbest radikaller ya da reaktif oksijen partikülleri olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller; oksijen, azot ve kükürt olarak üç farklı elementten türeyerek reaktif oksijen türleri (ROT), reaktif azot türleri (RNS) ve reaktif kükürt türlerini (RSS) oluştururlar (Lu ve ark. 2010).

Reaktif oksijen türlerinin süperoksit anyon ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoksi radikalleri ($HO_2^{\cdot}$), hidroksi radikalleri ($HO^{\cdot}$ ($OH^{\cdot}$)), nitrik oksit (NO) ve hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen (O_2), hipoklorik asit (HOCl) ve peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$) gibi türleri bulunmaktadır. RNS türleri ise O_2 'nin NO ile reaksiyona girerek $ONOO^{\cdot}$ oluşumuyla meydana gelir. RSS ise ROT'ların tiyol grupları ile reaksiyonundan oluşabilmektedir (Lu ve ark. 2010).

1-Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$)

Oksijenin yer aldığı birçok tepkimede veya oto-oksidasyon reaksiyonlarında oluşan, bir elektronu indirgenmiş durumdaki serbest bir reaktiftir (Siess 1991).

2-Perhidroksil radikali ($HO_2^{\cdot}$)

$O_2^{\cdot-}$ 'nin proton almış halidir ve yağda çözünürlüğü süperoksit anyonundan daha yüksektir (Siess 1991).

3-Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Süperoksit anyonu veya perhidroksil radikalinden dismutasyon ile veya doğrudan O_2 'den oluşması iki elektronu indirgenmiş bir reaktiftir (Siess 1991).

Antioksidan savunma mekanizmaları, reaktif oksijen türlerini detoksifiye ederek dokulara zarar vermesini önler. Reaktif oksijen türleri yüksek miktarlarda açığa çıktığında antioksidan savunma sistemlerinin aşırı yüklenmesi, antioksidan enzimlerin aktivitesinin yetersiz kalarak oksidatif stres oluşumuna yol açmaktadır. Oluşan oksidatif stres ve açığa çıkan serbest radikaller; lipitler, proteinler, DNA ve diğer önemli moleküller üzerinde hasara neden olabilir. Oksidatif stres hücresel düzeyde moleküler ve

membran yapılarındaki lipitlerde değişimlere yol açarak hücre ve doku hasarı oluşturabilirler (Reznick ve ark. 1998). Bu değişim sonucunda oluşan lipit peroksidasyon ile açığa çıkan malondialdehit bileşiği gibi son ürünlerin seviyelerinin ölçümü ve DNA hasarının ölçülmesi oluşan oksidatif stresin bir belirleyici olarak kullanılmaktadır (Barry Halliwell ve Chirico 1993).

2.4.1. Oksidatif Stresin Balıklardaki Etkileri

Kimyasal bileşikler genel olarak ikiden fazla elementin kimyasal bağlar ile birbirilerine bağlandıkları yapılardan oluşur. Elektronların bağlı halde bulunduğu kararlı bileşiklerde eğer bir elektron bağı kopar ise molekül daha kararsız ve daha reaktif hale gelir. Bir veya birden fazla bağı olmayan elektron içeren bileşik veya elementler serbest radikaller olarak isimlendirilir (Bendich ve ark. 2012).

Hücrelerde serbest radikaller yaşam süresince üretim halindedir. Birçok hastalığın patogenezinin sorumlu olan ve ortaklanmamış bir elektron içeren serbest radikaller dokularda fonksiyonların aksamasına ve durmasına neden olurlar (Keembiyehetty ve Gatlin 1995; Martinez-Alvarez ve ark. 2005). Serbest radikaller, membranda bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımına (lipit peroksidasyonu) neden olup, karbonhidrat ve nükleik asitleri okside ederek oksidatif strese yol açarlar (Ishihara ve ark. 2002). Bu durum özellikle balıkların dokularında doymamış yağ asitlerinin yüksek bulunması nedeniyle oksidatif hasara sebep olduğundan dolayı hayvan sağlığını etkilemekte ve balık etinin kimyasal kompozisyonu, kalitesi ve lezzetinde sorunlara yol açmaktadır (Sargent ve ark. 2002; Senso ve ark. 2007).

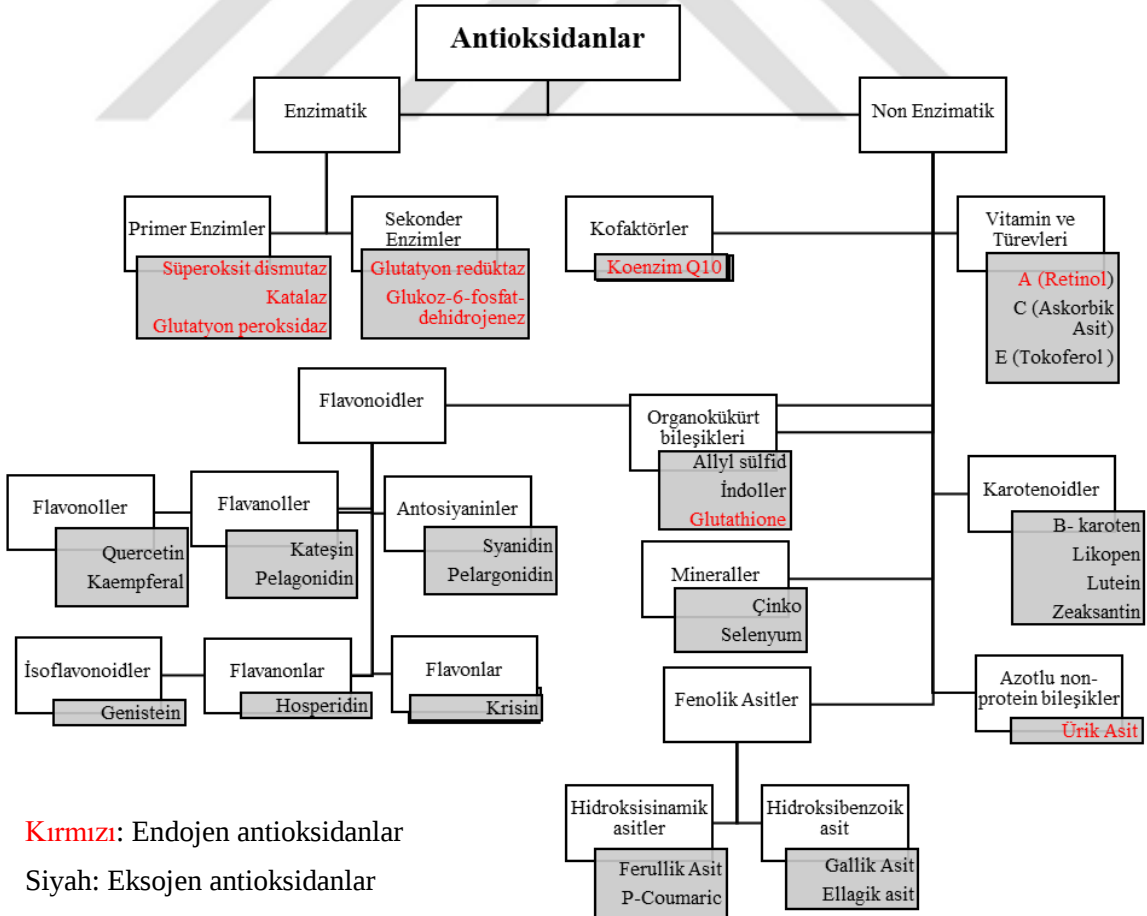
Oksidatif stres balıklarda lipit peroksidasyona sebep olmaktadır. Lipid peroksidasyonu, kasın membran fosfolipidlerinin çoklu doymamış yağ asitlerinde başlar ve enzimatik-nonenzimatik olarak gerçekleşir (Ackman 1980). Non-enzimatik mekanizmalar arasında otooksidasyon (serbest radikal mekanizması) ve fotojenik oksidasyon (singlet oksijen aracılığı) yer almakta, enzimatik mekanizmalarda ise lipooksijenaz ve siklooksijenaz bulunmaktadır (Erickson 2002; Mead 1976).

Gıda amaçlı üretilen alabalıklarda kanser, sinirsel dejenerasyon gibi rahatsızlıklar oksidatif strese bağlı olarak uzun sürede gerçekleşmesi nedeniyle daha az öneme sahip olmasına karşın lipid peroksidasyon balık kaslarının doymamış yağ asitleri yönünden zengin olması nedeniyle balığın saklanması sırasında kalite düşüşünün en önemli nedeni

olarak görülmektedir (Erickson 2002; Kristinsson ve ark. 2014). Balıklar sağlık açısından faydalı bulunan doymamış omega-3 yağ asitlerini ve diğer aktif prooksidan bileşiklerini yüksek oranda içerir (Hultin 1994). Prooksidan bileşiklerin ve doymamış yağ asitlerin yüksek olması nedeniyle hızlı gelişen lipid peroksidasyon alabalıklarının yetiştirilmesi veya etin işlenmesi, pişirilmesi veya buzdolabında saklanması sırasında genel besin içeriğini bozduğundan dolayı koku, renk ve tat üzerinde olumsuz etkilere neden olur (Bateman ve ark. 1953; Grayson ve ark. 1987; Pearson ve ark. 1983; Wanasundara ve Shahidi 1994).

2.4.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

Antioksidanlar, hedef molekülün oksidatif hasardan korunması, hasarın geciktirilmesi veya önlenmesi için kullanılan maddeler olarak tanımlanmaktadır. Balık dokularında oksidatif reaksiyonları sonlandırmada lipidler dışındaki görevli maddeler antioksidan maddeler olarak isimlendirilmektedir (Bragadottir 2001). Balıklarda bulunan enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar Şekil 2-2’de yer almaktadır.



Kırmızı: Endojen antioksidanlar

Siyah: Eksojen antioksidanlar

Kaynak: Carocho ve Ferreira (2013)

Şekil 2-2: Doğal Antioksidanların Sınıflandırılması

Biyolojik sistemlerde oksidasyonun başlangıcı doğal antioksidanların varlığı ile baskılanmaktadır. Yağda çözünür antioksidanlar, yağ asidi yapılı serbest bir radikale okside olmamış yağ asitlerini bir hidrojen atomuna göre daha kolay verirler. Suda çözünür antioksidanlar, su ve lipid fazlar arasında etkileşim kurarak yağda çözünür antioksidanı indirgeyebilirler ve antioksidatif reaksiyonlara katılımına devam ettirebilirler (Buettner ve Jurkiewicz 1996).

Bir antioksidanın, diğer bir antioksidanı veya bir lipitten türeyen radikali indirgeme yeteneği redüksiyon potansiyeli olarak tanımlanır. Balık kaslarında, post mortem olarak antioksidanları indirgenmiş halde tutma kapasitesi indirgeyici bileşiklerin zamanla kaybına bağlı azalır ve lipidik serbest radikalleri indirgeme yeteneği kaybolduğundan dolayı lipidler okside olurlar (Buettner ve Jurkiewicz 1996).

Organizmada yer alan önemli antioksidan enzimler arasında glutatyon sistemleri, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) yer almaktadır. İndirgenmiş glutatyon (GSH), doğrudan reaktif oksijen türlerini süpürerek oksidatif strese korunmada aktif rol oynayan doğal bir antioksidandır. GSH hücre içinde sentezlenir ve selenyuma bağlı glutatyon peroksidaz (Se-GPX) enziminin katalizlediği tepkime ile glutatyon disulfide oksitlenir. Glutatyon peroksidaz kaynakları lipid peroksidasyonda üretilen organik peroksitleri detoksifiye edebilir; ancak Se-GPX sadece H_2O_2 'i detoksifiye eder. (Meister ve Anderson 1983).

Nonenzimatik antioksidanlar diyetle doğrudan bulunan veya vücuttaki gerekli konsantrasyonları sağlamak için diyetle eklenen mikronutrientlerdir. Bunun bir örneği Vitamin E ve karotenoidlerdir veya dolaylı olarak süperoksit dismutaz sentezi için gereken bakır veya çinko; glutatyon peroksidaz sentezi için gerekli olan selenyum örnek verilebilir. Mikronutrientler yönünden uzun süreli yetersiz beslenme canlıdaki antioksidan mekanizmaların gelişmemesine neden olmaktadır (Hidalgo ve ark. 2002).

Glutatyon redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) GSH'ın GSSG'de rejenarasyonu için gereklidir ve hücre içi GSH redoks durumunun devam ettirilmesinde görev almaktadır. Antioksidan SOD $O_2^{\cdot-}$ 'nin H_2O_2 'ye dismutasyonunu katalizler ve oluşan H_2O_2 suya dönüştürülür ve oksijen, katalaz veya GPx aktivitesi ile detoksifiye edilir (Bragadóttir 2001).

Balıklarda bulunan antioksidan sistemler reaktif oksijen türlerini ortadan kaldıran enzimler (süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidazlar) ve düşük molekül ağırlığına sahip suda çözünür olan serbest radikal süpürücüleri olarak ikiye ayrılır. Antioksidanlar serbest radikalleri indirgeyerek kendileri okside olur ve sonrasında indirgeyici sistemler ile aktif hallerine geri dönüşürler (Bragadóttir 2001).

Tablo 2-3: Balıklardaki Antioksidan Maddeler

Lipofilik antioksidanlar	Hidrofilik Antioksidantlar
Fenolik bileşikler	Fenol bileşikler
α -tokoferol	Glutasyon
Karetonoidler	Askorbat (Vitamin C)
Antioksidan enzimler	Peptit, Poliamin
Süperoksit dismutaz	Serbest amino asitler (histidin)
Glutasyon peroksidaz	
Glutasyon S-transferaz	
Q-10	

Kaynak: (Kristinsson ve ark. 2014)

2.4.3. Antioksidanların Etki Mekanizmaları

Oksidasyon prosesinin farklı aşamalarına etkiyen antioksidanların etki mekanizmaları aşağıdaki şekilde sınıflandırılmaktadır (Symons ve Gutteridge 1998):

- Oksijeni ortadan kaldırma veya yerel O_2 konsantrasyonlarını düşürme
- Katalitik metal iyonlarını ortadan kaldırma
- Reaktif oksijen türlerini (O_2^- ve H_2O_2) ortadan kaldırma
- Başlangıç radikallerin ($\cdot OH$, $LO\cdot$ ve $LOO\cdot$) süpürülmesi
- Başlangıç sekansı zincirinin kırılması
- Singlet oksijeni süpürülmesi

2.4.4. Alabalıklar Yetiştiriciliğinde Kullanılan Antioksidan Maddeler

Oksijenin metabolizmasına bağlı olarak reaktif oksijen türleri gibi sitotoksik yan ürünlerin oluşumu antioksidan koruyucu sistemle ile dengelenemediği takdirde canlıda

oksidatif strese sebep olmaktadır. Oksidatif stres, hücresel hasar vererek birçok hastalığın sebebi ve ilerlemesinde bir etken olarak görülmektedir. Kültür balıklarında antioksidan savunma sistemleri su kirliliği ve ortam şartlarının olumsuzluğu nedeniyle yetersiz kalabilmektedir. Modern su ürünleri yetiştiriciliğinde balık yemlerine koruyucu amaçla lipit peroksitlerin ortadan kaldırılması amacıyla sentetik antioksidan maddeler kullanılmaktadır (Mohebbi 2012). Ancak hayvan beslemede yem içerisine doğal antioksidanların katılması yanında sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Bazı sentetik antioksidanların mutajenik ve karsinojenik potansiyelinden dolayı yemlerde kullanımı yasaklanmıştır. Doğal olması nedeniyle bitkisel ekstraktların veya yağların doğal antioksidan olarak kullanımına yönelik çalışmalara son yıllarda ağırlık verilmektedir (Erkan 2013).

Balıklarda hastalık, stok yoğunluğu, mevsimsel değişimler, kirlilik, gürültü, suyun sıcaklığı ve oksijen miktarı gibi çevresel şartların oluşturduğu stresin engellenmesi için yemlere antioksidan vitaminlerin ve farklı antioksidan maddelerin eklenmesinin sağlık üzerine olumlu etkisi ortaya konmuştur (Keleştemur 2011).

Oksidatif stres ile mücadelede sentetik antioksidanlara eşit veya onlardan daha yüksek aktiviteye sahip olan biberiye, adaçayı, kekik, sarımsak, zeytin yaprağı, çay ve üzüm çekirdeği gibi bitkilerin ekstraktları veya yağları (bileşimlerindeki fenolik bileşiklerden dolayı) doğal antioksidan olarak kullanılmaktadır (Erkan 2013).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Origanum minutiflorum (O. Schwarz et Davis) bitkisi Isparta ili, Sütçüler ve Kesme ilçesi çevresinden, (37.433683/31.115605 ve 37.433751/31.117901) toplandıktan ve kurutulduktan sonra bitkinin toprak üstü kısımlarından (yaprak ve çiçek) hidrodistilasyon ile uçucu yağları (UY), sıcak su maserasyon yöntemi ile su maseratı elde edildi. Sıcak su maseratının liyofilize edilmesi ile toz haline getirilen ekstrakt (LE) ve uçucu yağlar (UY) ticari yemlere 250 mg/kg/yem, 500 mg/kg/yem ve 1000 mg/kg/yem konsantrasyonlarında karıştırıldı. Bitkinin yaprak ve çiçeklerinin öğütülmüş toz hali (BT) ise yem ile % 0,5, % 1 ve % 2 oranından karıştırılarak pelet haline getirildi. Oluşturulan deney grupları (UY250, UY500, UY1000; LE 250, LE 500, LE1000; BT 0,5, BT1, BT2) hazırlanan yemlerle 8 hafta süresince beslendi (Tablo 3-3). Deney sonunda, balıklar sedatize edildikten sonra kan almayı takiben ötenazi işlemleri gerçekleştirildi. Balıklar karaciğer numuneleri alınarak -80 °C’de antioksidan analizler gerçekleştirilene kadar saklandı. Alınan kan örneklerinden nonspesifik immün sistem üzerindeki etkilerin değerlendirilmesi amacıyla respiratory burst aktivitesi (Nikoskelainen ve ark. 2006, Rigos ve ark. 2010), lizozomal aktivite (Ellis 1990), fagositik aktivite (İspir ve Yonar 2007) belirlendi. Karaciğer örneklerinden hazırlanan homojenatlardan antioksidan aktivitenin değerlendirmesi amacıyla malondialdehit (Zhu ve ark. 2012), süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz (Habig ve ark. 1974), katalaz aktivitesi (Cuellar-Cruz ve ark. 2009) değerleri tespit edildi.

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Aletler

-20 °C Derin dondurucu	Siemens
Enjektör	Set inject, 2 ml, 5 ml
-86 °C Derin Dondurucu	Thermo
Azot Evaporatörü	Ar Mühendislik, AVP B24
Beyaz tabanlı ELISA plakası	NUNC kat: 236105
Buzdolabı	Arçelik
Cam Balon	2L
Clevenger Distilasyon Cihazı	İldam Cam NS 45140
Elektronik Değirmen	Retsch ZM-200
ELISA mikroplyet okuyucu	Molecular Devices Filter Max F5
ELISA plakası	LP Italiana SPA
Ependorf	ISOLAB

Falkon tüp
 Filtre Kağıdı
 Glutasyon peroksidaz aktivitesinin tayini kiti
 Hotplate ısıtıcı
 Lam – Lamel
 Liyofilizatör
 Mikroskop
 Mikser
 Otomatik mikro pipetler
 Pelet makinesi
 pH metre
 Santrifüj
 Spektrofotometre küveti
 Spektrofotometre
 Superoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini Kiti
 Ultra hassas terazi
 Ultra-turrax
 Vorteks

ISOLAB
 Whatman No:1 grade
 Cayman; Kat: 703102
 Arçelik
 Isolab
 Christ Alpha 2-4 LD Freeze Dryer
 Olympus cover-015
 Waring Blendor
 Thermo Scientific
 İkea İdealisk Patates Ezici
 Orion SA720
 Nüve NF800R
 Agilent 6610000800 10 mm
 Agilent, Cary60 UV-Vis
 Biovision Kat: K335-100
 Libror AEL-40 SM
 İKA 30266
 Select Bio Products

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1,3,3-tetraetoksipropan (TEP)
 1-klor-2,4-Dinitrobenzen (CDNB)
 Benzokain
 Biüret rejanı
 Borik asit
 Dipotasyum fosfat (K_2HPO_4)
 ELISA plakası
 Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA)
 Folin rejanı
 Hank Balanced Tuzlu Su Çözeltisi
 Heparin
 Hidrojen peroksit
 Jelatin
 Katalaz
 Luminol
 Micrococcus lysodekticus
 Non-Opsonize zimosan
 Penisilin/streptomisin (10000 iu/ml)
 Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)
 Potasyum hidroksit (KOH)
 Sığır Albumin standardı
 Sodyum dihidrojen fosfat ($NaH_2PO_4 + 1$ hidrat)
 Sodyum hidrojen fosfat ($Na_2HPO_4 + 2$ hidrat)
 Sodyum Hidroksit (NaOH)
 Sodyum Klorür (NaCl)
 Sodyum Sülfat
 Tavuk yumurtası beyazı lizozim standardı

Sigma 108383
 Sigma 138630
 Sigma E1501
 Sigma B3934
 Merck 165
 Merck Kat. 4871
 LP Italiana SPA
 Sigma ED2SS
 Sigma 47742
 Thermo 14170070
 Nevparin Flakon IV
 Sigma Aldrich 18312
 Merck 1040780500
 Sigma Aldrich, kat. 60634
 Sigma 10018882971
 Sigma M3770-5G
 Sigma Z4250
 Sigma 69-57-8
 Merck Kat. 1048731000
 Merck 5032
 Qualikems A071107
 Sigma S9638
 Sigma 7558-79-4
 Himedia RM1183
 Sigma S7653
 Merck 6645
 Sigma 34046

Tiyobarbitürik asit (TBA)
 Trikloroasetik asit (TCA)
 Triton X-100

Sigma T5500
 Appli Chem A1431, 0250
 Sigma T8787

3.1.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.1.3.1. Homojenizasyonda Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

20 mM pH 7.4 Fosfat tampon çözeltisi: H_2PO_4 kaynağı için 0,02 M NaH_2PO_4 (2,7598 gr) 1 L distile su içerisinde çözüldü. HPO_4 kaynağı için de 1 L 0,02 M Na_2HPO_4 (3,55 gr) hazırlandı. Daha sonra bir beher içerisindeki NaH_2PO_4 çözeltisinin içerisine Na_2HPO_4 çözeltisinden eklenerek istenen pH olan 7,4 ulaşıldı.



Homojenizasyon tampon çözeltisi: 1 L fosfat tamponuna 1mM EDTA (372 mg MA: 372,24 g) ve % 0.1 Triton X-100 (1 ml) eklendi.

3.1.3.2. Respiratory Burst Analizinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Heparin-gHBSS: 200 ml ılık Hank Balanced Tuzlu Su Çözeltisine (HBSS) % 0,1 jelatin (200 mg), 2 ml penisilin/streptomisin (10000 iu/ml) ve 200 µl heparin (5000 ünite/ml) eklendi.

Kan numunesi: 2ml'lik ependorflar içerisine 10 µl heparin (5000 u/ml (50U)) ve 100µl kan, (500 ünite/1ml kan) eklendi.

1M Potasyum tuzu borat tamponu: 5,61 g potasyum hidroksit (KOH) (MA=56,11) ve 6,18 g borik asit (MA=61,83), 100 ml distile su içerisinde (pH 9,0) hazırlandı.

5 mM Luminol: 8,86 mg luminol (MA=177,2 g/mol=5 mM), 10 ml 1M K-tuzu borat tamponu içerisinde hazırlandı. Analizden en geç 12 saat önce taze olarak hazırlanarak analize kadar +4 C'de ve karanlıkta muhafaza edildi.

Non-Opsonize zimosan: 200 mg zimosan, 20 ml PBS içerisinde hazırlandı. Analize gerçekleştirilene kadar -20 C°'de saklandı.

3.1.3.3. Lizozim Aktivitesi Analizinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

A Tampon çözeltisi: Sodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4): 0,05 M; pH 6,2

Sodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4): 17,9 g ($12\text{H}_2\text{O}$) 1 L distile su içerisinde çözdürüldü ve pH 6,2 olarak HCl ile ayarlandı.

***Micrococcus lysodekticus* çözeltisi:** 0,6 mg/ml konsantrasyonu sağlamak amacıyla 50 ml tampon içerisinde 30 mg *M. lysodekticus* çözdürülerek taze olarak hazırlandı.

3.1.3.4. Proteini Seviyesi Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Protein standardı: Bovine Standart Albumin 100 mg/ml: 0,5 ml protein standardı 100 ml % 0.85 NaCl çözeltisi eklenerek hazırlandı. Hazırlanan çözeltiden 5 ml alındı ve seri dilüsyonlar Tablo 3-1’de gösterilen şekilde hazırlandı.

Tablo 3-1: Toplam Protein Tayini İçin Standartların Hazırlanması

Test Tüpü	Dilüe Protein Standardı (ml)	% 0,85 NaCl çözeltisi (ml)	Protein ($\mu\text{g/ml}$)
1	0	0,2	0
2	0,05	0,15	250
3	0,1	0,10	500
4	0,15	0,05	750
5	0,2	0	1000

3.1.3.5. Malondialdehit Analizinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Trikloroasetik asit (TCA): 0,3 M sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi içerisinde %15’lik trikloroasetik asit hazırlandı.

Tiyobarbitürik asit (TBA): 0,3 M sodyum hidroksit (NaOH) içerisinde % 0,67’lik tiyobarbitürik asit çözülerek hazırlandı.

1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP) standartları hazırlanması: 10 μl 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP) 10 ml absolut etanolde çözdürülerek ml % 0,1 stok çözelti hazırlandı.

0,3 M Sodyum hidroksit çözeltisi: 0,3 M sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi hazırlamak için 11,9991 g (39,997 g/mol) distile su içerisinde çözülerek 1 L’ye tamamlandı.

3.1.3.6. Glutasyon S-Transferaz Analizindeki Çözeltilerin Hazırlanması

1-kloro-2,4-dinitrobenzen (30mM CDNB): 100 ml % 95 etanol içerisinde 0,61 g CDNB çözülürölerek 30 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzen çözeltisi hazırlandı.

İndirgenmiş GSH (30mM): 100 ml distile su içerisinde 0,92 g indirgenmiş GSH çözülürölüdü.

Fosfat Tamponu (0.3M, pH 6,5): 100 ml fosfat tamponu hazırlamak amacıyla 5,23g K_2HPO_4 100ml distile su içerisinde çözülürölerek A çözeltisi, 4,08gm KH_2PO_4 100ml distile su içerisinde çözülürölerek B çözeltisi hazırlandı. A çözeltisinden 31,5 ml, B çözeltisinden 68,5 ml alınarak karıştırıldı.

3.1.3.7. Katalaz Analizinde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Katalaz standardı: 10 mg liyofilize toz şeklindeki katalaz standardı 1 ml soğuk fosfat tamponunda çözülüdü. 100 u/ml konsantrasyonunda bir çözelti elde etmek amacıyla kullanımdan hemen önce 5 μ l katalaz çözeltisi 995 μ l soğuk fosfat tamponu ile dilüe edildi.

50 mM Fosfat Tamponu:

Tampon I: Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4): KH_2PO_4 'den 1,7011 g alınarak bidistile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

Tampon II: Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4): K_2HPO_4 'den 4,3545 g alınarak bidistile su ile 500 ml'ye tamamlandı.

Tampon solusyonu: Tampon I'den 39,2 ml alındıktan sonra, Tampon II kullanılarak 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltinin pH'sı 1 M potasyum hidroksit KOH kullanılarak 7.0'a getirildi.

30 mM Hidrojen Peroksit H_2O_2 (100 ml): 0,34 ml % 30'luk H_2O_2 hazırlandıktan sonra tampon çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlanarak çözelti analizden önce taze olarak hazırlandı.

3.2. Yöntem

3.3. Bitkilerin Toplanması

Origanum minutiflorum (O. Schwarz et Davis) bitkisinin toprak üstü kısımları Isparta ili, Sütçüler ve Kesme ilçesi çevresinden, 37.433683 / 31.115605 ve 37.433751 / 31.117901 koordinatlarından kök üstünden kesilerek 30 Ağustos ve 1 Eylül 2013 tarihlerinde toplandı. Baydar (2005) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada uçucu yağlardaki en yüksek karvakrol içeriğinin çiçeklenme sonunda (Eylül ayı başlangıcı) olduğu bildirildiğinden dolayı bitkinin toplanma tarihleri 30 Ağustos – 1 Eylül olarak tercih edildi.

Toplanan bitkilerin botanik tanımlaması Süleyman Demirel Üniversitesi, Gül Herbaryumu'nda *Origanum minutiflorum* (O. Schwarz et Davis) olarak gerçekleştirildi ve bitki örneği herbaryuma 94.28.16.04.01 numara ile kaydedildi (Şekil 2.1).

Toplanan bitkilerden toprak ve yabancı maddeler uzaklaştırıldıktan sonra bitkiler, ışıksız almayan havadar bir alanda kurutma kağıtlarına serilerek kurutuldu. Kuruyan yaprak ve çiçek gibi toprak üstü kısımlar öğütülerek ekstraksiyona hazır hale getirildi. Öğütülen bitki, ekstraksiyon işlemlerine kadar hava almayan kaplarda oda sıcaklığında saklandı.



Şekil 3-1 *Origanum Minutiflorum* Herbaryum Örneği

3.3.1. Bitkinin Toz Halinin Elde Edilmesi

Kurutulan bitkinin yaprak ve çiçek kısımları yüksek devirli mikserde parçalandıktan sonra elektronik değirmen ile çok ince toz haline getirildi. Elde edilen toz yemlere karıştırılana kadar ışık ve hava almayan kaplarda +4 °C’de saklandı.

3.4. Ekstraksiyon Yöntemleri

3.4.1. Hidrodistilasyon Yöntemi İle Uçucu Yağın Ekstraksiyonu

Uçucu yağların ekstraksiyonu için uygun bir yöntem olarak kabul edilen hidrodistilasyon Avrupa Farmakopesi 5.0'a uygun olarak gerçekleştirildi. Bu amaçla 1 litre distile su içerisinde 100 gram bitki, alt ısıtıcı ve Clevenger aparatı kullanılarak 3 saat boyunca distile edildi. Kaynayan su içerisindeki bitki örneklerinin içerisindeki uçucu maddeler buharla beraber Clevenger'in cam borusundan yükseldikten sonra Clevenger'den geçen su ile soğutuldu. Yoğunlaşan uçucu yağ ve su karışımı beherde toplandıktan sonra suyun üstünde kalan uçucu yağ fazı otomatik mikropipet ile ayrıldı. Yağ içerisinde kalan su santrifüj edilip, anhidroz sodyum sülfattan geçirilerek tamamen uzaklaştırıldıktan sonra volumetrik olarak miktar tayini gerçekleştirildi. Bir kg bitkinin ekstraksiyonu için bu işlem 10 kez tekrarlandı. Yemlere karıştırılacak uçucu yağlar ışık ve hava almayan amber renkli shot şişelere konularak, havanın meydana getireceği oksidasyonu önlemek amacıyla azot gazı ilavesiyle kapatıldı. Shot şişeler +4 °C’de en fazla bir ay olmak üzere yem hazırlanana kadar saklandı (Şarer ve ark. 1996).

3.4.2. Bitkilerin Sıcak Su Maserasyonu ve Ekstraktın Liyofilize Edilmesi

Yapılan bir araştırmada *Origanum vulgare*’ye ait sıcak su, soğuk su, ve etanol maserasyonu ile elde edilen ekstraktlar içerisinde en yüksek *in vitro* antioksidan aktivitenin sıcak su ile maserasyon yöntemi ile sağlandığı bildirilmiş ve bu doğrultuda çalışmamızda da sıcak su ile maserasyon yöntemi tercih edilmiştir. Teixeira ve ark'ın (2013) kullandıkları yöntem uygun olarak bitki örneklerinin maserasyonunu gerçekleştirmek amacıyla 50 gram bitki, 1 litre 100 °C su içerisinde 3 saat sürekli karıştırılarak ekstrakte edildi. Elde edilen ekstraktlar, Whatman (no:1) ile vakum altında filtrelendikten sonra çözünmeyen kısımları santrifüjde uzaklaştırıldı. Bir kg bitkiden ekstraksiyon işlemi toplam 20 kez tekrarlandı.

Elde edilen ekstraktların sıvı kısmı evaporatörde vakum altında uçurulmadan doğrudan dondurulup küçük parçalara ayrıldıktan sonra liyofilizatörde -60 °C'de 48 saatte toz haline getirildi. Ekstraksiyon verimi hesaplanarak liyofilize haldeki toz ve ekstraktlar kullanılabilecek kadar cam flakonlarda -20 °C'de saklandı (Teixeira ve ark. 2013).

3.5. Yemlerin Hazırlanması

Deney gruplarının beslenmesinde kullanılmak üzere toplam 10 ayrı yem grubu oluşturuldu. *Origanum minutiflorum* bitkisinden elde edilen uçucu yağlar (UY) 250 mg/kg/yem, 500 mg/kg/yem ve 1000 mg/kg/yem konsantrasyonlarında, sıcak su maseratının liyofilize toz hali (LE) 250 mg/kg/yem, 500 mg/kg/yem ve 1000 mg/kg/yem konsantrasyonlarında, bitkinin toprak üstü kısımlarının (yaprak ve çiçek) toz hali (BT) ise % 0.5, % 1 ve % 2 oranlarında ticari yemlere karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan yemlerle beslenen deney grupları için UY250, UY500, UY1000, LE250, LE500, LE1000 BT0,5, BT1, BT2 kısaltmaları kullanılacaktır.

Temel yem olarak kullanılan ticari yavru alabalık pelet yemi, yüksek devirli mikser kullanılarak toz haline getirildikten sonra sıcak su maseratının liyofilize ekstrakt tozu ve bitkinin toz hali yeme belirtilen konsantrasyonlarda plastik bir kutu içerisine homojen dağılım oluşturmak amacıyla seri dilüsyon gerçekleştirir gibi kademeli olarak eklenerek karıştırıldı. Elde edilen karışıma distile su (0,1 ml/g) ilave edildi ve yoğrularak hamur haline getirildikten sonra 3 mm çapında deliklere sahip bir ezici el makinasında geçirilerek pelet yem haline getirildi. Pelet yemler oda sıcaklığında (25 °C) 48 saat boyunca kurutulduktan sonra kullanılabilecek kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklandı.

Uçucu yağları içeren yemler ise uçucu yağların fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile emülsiyon oluşturulması ve toz halindeki yemlere karıştırılması ile hazırlandı (Navarrete ve ark., 2010). Uçucu yağ ve PBS emülsiyonu ile yemlerin kıvamlı bir hamur haline getirilmesinin ardından bir el makinesi yardımıyla yem hamuru ezilerek pelet yem haline getirildi. Hazırlanan yemler -20 °C'de saklandı (Navarrete ve ark. 2010).

Deney grupları 8 hafta boyunca, hazırlanan yemler ile günde bir kez, canlı ağırlıkların % 2 oranında beslendi.

Kontrol grubu için kullanılan yemler, diğer balık yemleri ile aynı işlemler kullanılarak ve içerisine *Origanum minutiflorum*'a ait bir içerik eklenmeden hazırlandı.

Yemin hazırlanmasında temel yem olarak Çamlı Yem Besicilik Sanayii ve Ticaret A.Ş.'den temin edilen Alabalık Yavru Yemi kullanıldı. Yem içeriği değerleri Tablo 3-2'da yer almaktadır.

Tablo 3-2: Alabalık Yavru Pelet Yemi İçeriği

Çamlı Alabalık Yavru Yemi	
Boyut	1 mm
Ham Protein (%)	54
Ham Yağ (%)	14
Ham Selüloz (%)	1,5
Kül (%)	11
Metabolik enerji (Kkal/kg)	3800

3.6. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Akvaryumların Hazırlanması

Liyofilize edilerek toz haline getirilen sıcak su maseratları 3 farklı konsantrasyonda (250, 500, 1000 mg/kg/yem) içeren yemler ile beslenen 3 uygulama grubu, uçucu yağları 3 farklı konsantrasyonda (250, 500, 1000 mg/kg/yem) içeren yemler ile beslenen 3 uygulama grubu, bitkinin yaprak ve çiçeklerinin öğütülmesi ile elde edilen tozun 3 farklı konsantrasyonda (5 g, 10 g, 20 g/kg yem) yemlere ilave edildiği 3 uygulama grubu ve bir kontrol grubu olmak üzere her bir grupta 15 gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) bulunan toplam 10 adet deney grubu oluşturuldu.

Tablo 3-3: Alabalık Deney Grupları

Deney Grupları	Kısaltma	Sayı
Kontrol	Kontrol	15 adet
250 mg uçucu yağ/ kg yem	UY250	15 adet
500 mg uçucu yağ/ kg yem	UY500	15 adet
1000 mg uçucu yağ/ kg yem	UY1000	15 adet
250mg liyofilize ekstrakt/ kg yem	LE250	15 adet
500 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem	LE500	15 adet
1000 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem	LE1000	15 adet
% 0,5 toz bitki/ kg yem	BT0,5	15 adet
% 1 toz bitki / kg yem	BT1	15 adet
% 2 toz bitki / kg yem	BT2	15 adet
Toplam		150 adet

3.6.1. Alabalıkların Temini

İstanbul Üniversitesi Sapanca İç Su Hizmetlerinden 150 adet 40-60 gram ağırlığında gökkuşağı alabalığı (*Onchoryncus mykiss*) temin edildi. Alabalıklar 350 litrelik uzun dikdörtgen yatay su deposu içerisinde oksijen desteğiyle İ.Ü. Veteriner Fakültesi, Veteriner Farmakoloji ve Toksikolojisi anabilim dalına getirildi. Anabilim dalımıza ait laboratuvarında bulunan önceden hazırlanmış 250 litrelik akvaryumlarda 15'er balık olacak şekilde ayrıldı. İki haftalık adaptasyon süresi boyunca ticari balık yetiştirme yemi ile ad libitum beslendi. Proje süresince 12 saat aydınlık/karanlık aydınlatma düzeni uygulandı, dinlendirilmiş yeraltı suyu haftada 3 kez değiştirilerek, sudaki nitrit, nitrat, çözünmüş klor ve toplam klor yönünden su kalitesi takip edildi. Oluşturulan deney grupları 8 hafta boyunca hazırlanan taze yemlerle beslendi. Deney süresince balıkların görünümü, yeme yanıtları, davranışları ve mortalite gözlendi.

Deney süresince yemleme işlemi günde bir kez olmak üzere canlı ağırlığının yaklaşık % 2'si olarak gerçekleştirildi. Yemleme işleminden otuz dakika sonra yemler ve atıklar sifonlama yöntemi ile toplandı. Tüm deney süresince akvaryum suları haftada üç kez taze kaynak yeraltı suyu ile değiştirildi. İki haftalık adaptasyon süresince ölen balık gözlenmedi. Alabalıkların tartımı iki haftada bir gerçekleştirildi. Deney süresi boyunca su sıcaklıklarının 9-10 °C, pH'ın ise 7,60-9,12 aralığında değişim gösterdiği takip edildi.

3.6.2. Örneklerin Alınması ve Homojenizasyonu

Balıklarda yedirme işleminin tamamlanmasından sonra kan ve doku numunelerinin alınması işlemi gerçekleştirildi. Deney gruplarındaki alabalıklar 25 mg/l benzokain içeren suda bekletilerek sedasyon gerçekleştirildi. Kan örnekleri kaudal venadan 5 ml'lik enjektörle balık başına 3-4 ml alındı. İşlemlerin yaratacağı olumsuz etkileri en aza indirmek amacıyla, sedasyon ve kan alım işlemleri her balık için ayrı gerçekleştirildi, toplu sedasyon uygulaması yapılmadı.

Alınan kan numuneleri serum eldesi için heparin içermeyen santrifüj tüplerine ve respiratory burst aktivitesi analizi için 100 µl kan heparin eklenmiş ependorflara aktarıldı. Respiratory burst aktivitesinin tayini için alınan örnekler oda sıcaklığında en fazla bir saat tutuldu. Heparin içermeyen santrifüj tüplerine alınan kan, pıhtılaşması için 4 °C'de 2 saat tutuldu ve 3000x g'de 10 dakika santrifüj edilerek serum kısmı ayrıldı. Serum numuneleri, analizler gerçekleştirilene kadar -80 °C'de saklandı.

Kan alımını takiben balıklar, ötenazi işlemi için benzokainli suda bekletildi ve ardından canlı ağırlık ve toplam boy ölçüm işlemleri gerçekleştirildi. Antioksidan enzim analizleri için karaciğerler diseksiyonla toplandı (Kokou ve ark. 2012). Alınan karaciğer dokuları malondialdehit içeriği, glutatyon peroksidaz, glutatyon transferaz ve katalaz aktivitesi analizleri gerçekleştirilene kadar -80 °C’de saklandı.

Her balıktan 2 g karaciğer örneği donma noktasına yakın 18 ml 20 mM fosfat tamponun pH 7,4, 1 mM etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) ve % 0,1 Triton X-100 içerisinde ultra torax ile buz içerisinde ısınmasını önleyerek homojenize edildi. Homojenatlar 2000 x hızında kirliliğin uzaklaştırılması amacıyla santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantlar enzim analizlerinde kullanıldı (Sargent ve ark. 2002; Zhu ve ark. 2012).

3.7. Nonspesifik İmmun Sistem İle İlgili Parametrelerin İncelenmesi

Nonspesifik immün sistem üzerindeki etkilerin değerlendirilmesi amacıyla respiratory burst aktivitesi (Nikoskelainen ve ark. 2005; Rigos ve ark. 2010), lizozomal aktivite (Ellis ve ark, 2012), fagositik aktivite (İspir ve Yonar, 2007) incelendi.

3.7.1. Respiratory Burst Aktivitesinin Tayini

Respiratory burst aktivitesi, Nikoskelainen ve ark. (2006) yöntemi ve Rigos ve ark. (2010) modifikasyonları esas alınarak doğrudan heparinli kan numunelerinden gerçekleştirildi.

Analiz prensibi fagositlerin hücre membranlarının zimosan ile uyarılması sonucu foton oluşumuna bağlı olarak luminol ile meydana gelen kemilüminesansın mikroyet okuyucu ile takip edilmesine dayanmaktadır (Rigos ve ark. 2010; Kokou ve ark. 2012).

Alabalıkların kaudal venasından kan örnekleri alındı ve 150 ünite heparin/ml kan (30 µl hep 5000/ünite/ml) konsantrasyonunda heparin içerecek şekilde tüplere konuldu. Oda sıcaklığında tutulan deney tüplerindeki kandan en fazla 3 saat içerisinde respiratory burst analizleri gerçekleştirildi. Alınan 5,2 µl kan'a 1000 µl gHPSS-heparin (1:200) ve 40 µl 5 mM luminol eklendi. ELISA plakasının her kuyucuğunda 1,37 µl kan ve hazırlanan çözeltinin mililitresinde 4,56 µl kan bulunması sağlandı.

Doksanaltı kuyucuklu beyaz tabanlı ELISA plakası kuyucuklarına (NUNC katalog no: 236105) luminol içeren kan numuneler her örnek için üç kuyucuğa eklendi ve plaka 10 dakika oda sıcaklığında kuyucuk tabanının arka planının sabitlenmesi için inkübe edildi. On dakika sonrasında kuyucuklara 20 µl opsonize olmayan zimosan ve 1 µg/ml forbol-12-miristat-13-asetat (PMA) eklenmesini takiben kemilüminesans emisyonu 120 dakika boyunca 5'er dakikalık aralıklarla ELISA mikrolept okuyucu ile takip edildi. Tespit edilen en yüksek kemilüminesans değerleri relatif lumen ünite (rlu) olarak ifade edildi (Nikoskelainen ve ark. 2006; Rigos ve ark. 2010; Kokou ve ark. 2012).

3.7.2. Serum Lizozim Aktivitesinin Tayini

Balıkta bulunan lizozimler gram pozitif bakterilerin yok edilmesinde görev almaktadır. Ellis (1990) yöntemine uygun olarak gerçekleştirilen serum lizozim aktivitesi tayini, serum örneklerine eklenen *Micrococcus lysodeikticus*'un lize olmasının absorbansta meydana getirdiği düşüşün spektrofotometrik yöntemle ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Lizozim substratı olarak 0,2 mg/ml liyofilize *M. lysodeikticus* 0,06 M sodyum fosfat tamponu (pH 6,2) içerisinde hazırlandı. Mikrolept kuyucukları içerisine 190 µl bakteriyel süspansiyon ve 10 µl plazma üç tekrarlı olarak eklendi ve mikrolept okuyucuda 30 saniye süreyle çalkalandıktan sonra 1. ve 5. dakikalarda 450 nm'de absorban ölçüldü. Her bir birim lizozim aktivitesi, bakterinin lize olması ile absorbansta dakikada meydana gelen lineer 0,001 azalma miktarı olarak tanımlanır. Serumdaki lizozim miktarı yumurta beyazı lizozimi ile elde edilen standart eğriden elde edildi (Ellis 1990).

Düz tabanlı 96 kuyucuklu ELISA plakasına kör tampon ve örnekler Tablo 3-4'de belirtildiği şekilde üç tekrarlı olarak eklendi. *M. lysodeikticus* eklenmesini takiben absorban 450 nm'de mikrolept okuyucu yardımıyla 30 saniye karıştırıldıktan sonra 1. ve 5. dakikalarda okundu.

Tablo 3-4: Lizozim Analizi ELISA Plaka Uygulaması

Kör Tampon:	150 µl tampon
Kör <i>M. lysodeikticus</i> :	150 µl <i>M. lysodeikticus</i>
Numune:	10 µl örnek + 10 µl tampon + 130 µl <i>M. luteus</i>

3.7.3. Fagositik Aktivitenin Tayini

Fagositik aktivite, kan alınma işlemini takiben İspir ve Yonar (2007) tarafından bildirilen yöntemle dayanarak belirlendi. İçerisinde 1×10^8 hücre/ml *Staphylococcus* sp., bulunan fosfat tampon çözeltisinin 0,1 ml mikroyet plaka kuyucuklarında 0,1 ml kan örneğine eklenerek karıştırıldıktan sonra 30 dakika inkübe edildi. İnkübe edilen süspansiyondan 0,05 ml ile lam üzerine froti hazırlandı. Lam kurutulduktan sonra % 95'lik etanol ile 5 dakika fiks edilerek % 7 giemsa ile boyandı. Toplam 100 adet fagositik hücre sayılarak fagositoz yapmış olan fagositler yüzde fagositik aktivite değeri olarak tespit edildi.

$$\% \text{ Fagositik aktivite} = \frac{\text{Fagositoz gerçekleştirmiş fagositlerin sayısı}}{\text{Toplam sayılan fagositler (100)}} \times 100$$

3.7.4. Karaciğerde Toplam Protein Miktarının Tayini

Glutasyon peroksidaz, glutasyon S-transferaz ve katalaz enzimlerinin spesifik aktivitelerinin hesaplanması amacıyla karaciğerde toplam protein miktarı Mikro Lowry (Lowry ve ark. 1951) yönteminin Onishi ve Barr Modifikasyonu (1978) ile spektrofotometrik olarak belirlendi. Deney gruplarında karaciğerde tespit edilen protein miktarı (mg/ml), antioksidan enzim aktivitesi (ünite/ml) bölünerek antioksidan enzimlerin spesifik aktivite değerleri tespit edildi.

$$\text{Antioksidan Enzimlerin Spesifik aktivitesi} = \frac{\text{Ünite/ml}}{\text{mg protein/ml}} = \text{ünite/mg protein}$$

Karaciğer numuneleri homojenatlardaki kirliliğin uzaklaştırılması amacıyla 2000 g'de santrifüj edildi. Süpernatant 0,2 ml deney tüplerine konulduktan sonra üzerine 2,2 ml Biüret reajanı eklenerek vorteks ile karıştırıldı. Süspansiyon 10 dakika inkübe edildikten sonra deney tüpüne 0,1 ml Folin ajanı eklendi. Deney tüpü vorteksle karışması sağlandıktan sonra 30 dakika inkübe edildi. Spektrofotometrede 600 nm'de absorbans değişimi takip edildi. Her bir uygulamada 20 örnek, üç tekrarlı olarak çalışıldı. Kör olarak % 0,85 sodyum klorür kullanıldı. Tüm okumalar en fazla 30 dakika içerisinde bitirildi. Standartlar ait dilüsyonlar ile standart eğri oluşturulduktan sonra absorbansa karşılık gelen mg protein miktarı hesaplandı ve dilüsyon faktörü ile çarpılarak karaciğerdeki protein miktarı hesaplandı.

3.8. Oksidatif Stres İle İlgili Parametrelerin İncelenmesi

O. minutiflorum bitkisinin toz halinin, uçucu yağlarının ve sıcak su maserasyonun liyofilize halinin alabalıklara yem içerisinde verilmesinin karaciğer doku örneklerinde oluşturduğu antioksidan aktivitenin değerlendirmesi amacıyla malondialdehit düzeyleri (Zhu ve ark. 2012), antioksidan enzimlerin üzerindeki etkinliğin değerlendirilmesi amacıyla ise süperoksit dismutaz, glutatyon-peroksidaz, glutatyon S-transferaz (Habig ve ark. 1974) ve katalaz aktivitesinin (Cuéllar-Cruz ve ark. 2009) belirlenmesine yönelik analizler gerçekleştirildi.

3.8.1. Malondialdehit Düzeylerinin Tayini

Hücre ve dokularda oksidatif stres sonucunda gerçekleşen lipit peroksidasyonun son ürünü olarak oluşan malondialdehit (MDA) bileşiği, DNA ile bağ oluşturarak mutajen ve karsinojen etki gösteren bir bileşiktir. Oksidatif stres belirleyicilerinin kısa ömürlü olması ve MDA'nın uzun süre bozulmadan kalması nedeniyle son ürün olarak MDA'nın tiyobarbitürik asit yardımıyla analizi lipit peroksidasyon düzeyini belirlemek amacıyla sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Marnett 1999). Bu amaçla malondialdehit düzeylerinin tayini karaciğer numunelerinden Zhu ve ark.'nın (2012) bildirdikleri yöntemle göre gerçekleştirildi. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler testi (TBARS) olarak da isimlendirilen analizin prensibi, eklenen tiyobarbitürik asit ile örnekteki malondialdehit bileşiğinin tepkimeye girerek oluşturdukları renk değişiminin spektrofotometrik olarak takip edilmesine dayanmaktadır.

Karaciğer numunelerinden hazırlanan 500 µl homojenat cam tüpler içerisine alındıktan sonra üzerine 400 µl % 15 trikloroasetik asit ve 800 µl tiyobarbitürik asit (0,3 M NaOH içerisinde % 0,67 TBA) eklendi ve vorteksle karıştırıldı. Hazırlanan karışım sıcak su banyosu içerisinde 95 °C sıcaklıkta 30 dakika ısıtıldıktan sonra 25 °C ye soğutuldu ve santrifüj işlemi (2000x g, 4 °C, 10 dakika) ile çöken protein kısmı uzaklaştırıldı. Elde edilen süpernatantların absorbansları spektrofotometre ile 532 nm'de okundu (Zhu ve ark. 2012).

Karaciğerlerdeki MDA konsantrasyonları, tiyobarbitürik asit-malondialdehit ile elde edilen standart eğriden ve aşağıdaki formülden yararlanarak µmol MDA/mg protein olarak hesaplandı. Sonuçların hesaplanmasında denklem (3-1) kullanıldı. Denklemden ($\epsilon = 1.56 \times 10^{-5} / \text{M} \times \text{cm}$) ekstinksiyon katsayısı olarak kullanıldı ve sonuçlar karaciğer

protein miktarına bölünerek $\mu\text{mol MDA/mg protein}$ olarak ifade edildi (Buege ve Aust 1978).

Karaciğer Malondialdehit Düzeylerinin Hesaplanması:

$$\frac{\text{Absorbans} \times 320,5 \times \text{dilüsyon faktörü}}{\text{Karaciğer protein miktarı (mg)}} = \mu\text{mol MDA/mg protein} \quad (3-1)$$

3.8.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayini

Toplam süperoksit dismutaz aktivitesinin ölçümü BioVision markalı “Superoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini Kiti” (Katalog no: K335-100) ile gerçekleştirildi.

Süperoksit dismutaz (SOD) önemli antioksidan enzimlerden bir tanesidir. Enzim, süperoksit anyonunun hidrojen peroksite ve oksijen molekülüne dönüşümünü katalize eder. SOD tayin kiti; süperoksit anyonu ile WST çalışma çözeltisi içerisindeki indirgeyici maddeleri ile formazan boyası oluşturmaktadır. Süperoksit anyonundaki redüksiyon ksantin oksidaz (XO) aktivitesi ile doğrusal olarak bağlantılıdır ve SOD ile inhibe olur. Sonuç olarak SOD aktivitesinin inhibisyonu kolorimetrik bir yöntem ile tayin edilir.

Homojenat $14000 \times g$ 'de 5 dakika boyunca 4°C 'de santrifüj edildikten sonra berrak süpernatant kısım enzim analizini gerçekleştirmek için ayrıldı. Süpernatanttaki sitozolik ve mitokondriyal toplam SOD aktivitesinin belirlenmesinde ticari kite ait prosedür kullanılarak denklem 3-2'ye göre hesaplandı.

Örnek çözeltiden $20 \mu\text{l}$ her örnek ve kör 2 kuyucuğuna konulduktan sonra her kör 1 ve kör 3 kuyucuğuna $20 \mu\text{l}$ H_2O eklendi. Her kuyucuğa $200 \mu\text{l}$ WST çalışma çözeltisi eklendi. Kör 2 ve kör 3 kuyucuklarına $20 \mu\text{l}$ dilüsyon tamponu eklendi. Her örnek ve kör 1 kuyucuğuna $20 \mu\text{l}$ enzim çalışma çözeltisi eklendi ve iyice karıştırıldı. Mikropleyt 37°C 'de 20 dakika boyunca inkübe edildikten sonra absorbans mikropleyt okuyucuda 450 nm 'de okundu. ELISA pleytin kuyucuklarına konulan çözelti miktarları Tablo 3-5'de belirtilmiştir.

Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Hesaplanması:

$$\text{SOD Aktivitesi (\% inhibisyon oranı)} = \frac{(A_{\text{kör 1}} - A_{\text{kör 3}}) - (A_{\text{örnek}} - A_{\text{kör 2}})}{(A_{\text{kör 1}} - A_{\text{kör 3}})} \quad (3 - 2)$$

Tablo 3-5: Süperoksit Dismutaz Analizi ELISA Plaka Uygulaması

	Örnek	Kör 1	Kör 2	Kör 3
Örnek çözelti	20 µl		20 µl	
Bidistile su		20 µl		20 µl
WST çalışma çözeltisi	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Enzim Çalışma Çözeltisi	20 µl	20 µl		
Dilüsyon Tamponu			20 µl	20 µl

3.8.3. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Tayini

Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesinin tayini, Cayman firmasının ürettiği kit (Katalog no: 703102) kullanılarak karaciğer örneklerinden gerçekleştirildi.

Glutasyon peroksidaz (GPx) hidrojen peroksitin ve diğer hidroperoksitlerin redüksiyonunu katalizler ve hücreleri oksidatif hasardan korur. Kullanılan ticari kit GPx aktivitesini glutasyon redüktaz (GR) ile reaksiyonu ile indirekt olarak ölçülmektedir. Hidroperoksitin GPx ile redüksiyonu ile okside glutasyon (GSSG) oluşmaktadır. Oluşan okside glutasyon (GSSG), GR ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP), ile indirgenmiş durumuna geri dönüştürülür.

NADPH'nin NADP⁺'ye oksidasyonu ile 340 nm'de absorbansta düşüş meydana getirmektedir. GPx aktivitesi reaksiyonda hızı sınırlandırıcı bir etken olduğunda 340 nm'deki absorban azalması örnekteki GPx aktivitesine doğrudan bağlıdır.

Santrifüj işlemi 10000x g'de 15 dakika gerçekleştirildikten sonra supernatantlardaki GPx aktivitesi tayini ticari kit yöntemine uygun olarak gerçekleştirildi ve sonuç olarak hazırlanan 96'lık ELISA plakası absorban değerleri 340 nm'de mikroyet okuyucu ile okundu.

Numunelerdeki GPx aktivitesi denklem 3-3 ve 3-4 kullanılarak hesaplandı. Yönteme göre tespit edilen 1. dakikadaki absorban değişimi kör kuyucuklarda elde edilen değerden çıkarıldı.

Glutasyon peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Hesaplanması:

$$\Delta A_{340}/dak. = \frac{A_{340}(\text{Bitiş}) - A_{340}(\text{Başlangıç})}{\text{Bitiş-Başlangıç Zamanı (dak)}} \quad (3-3)$$

$$\text{GPx aktivitesi (u/mg)} = \frac{\Delta A_{340}/dak}{0,00373 \text{ M}^{-1}} \times \frac{0,19 \text{ ml}}{0,02 \text{ ml}} \times d./p. = \text{nmol/dak/ml/mg} \quad (3-4)$$

d. : dilüsyon katsayısı

p. : Karaciğer protein miktarı (mg)

*NADPH için 340 nm'deki ekstinksiyon katsayısı 0,00622 / μM x cm olmasına rağmen kuyucuktaki çözeltinin 0,6 cm olmasında dolayı 0,00373 / μM kullanılmıştır.

3.8.4. Glutasyon S-Transferaz Aktivitesinin Tayini

Glutasyon S-transferaz aktivitesinin ölçümü 1-klor-2,4-dinitrobenzen substrat olarak kullanıldığında meydana gelen tiyoeter oluşumunu spektrofotometrik olarak takip edilmesine dayanan Habig ve ark.'nın (1974) bildirdikleri yöntemle göre gerçekleştirildi. İndirgenmiş GSH varlığında substrat olarak kullanılan 1-klor-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ile oluşan konjugatın meydana getirdiği absorbans artışı spektrofotometrik olarak takip edilerek glutasyon S-transferaz aktivitesi belirlenir.

Plastik spektrofotometre küvetleri içerisine, hazırlanan 2,5 ml 120 mM potasyum fosfat tamponu pH 6,5, 100 μl GSH ve 100 μl 1-klor-2,4-dinitrobenzen (CDNB) çözeltisi ilave edildikten sonra 50 μl örnek eklenerek reaksiyon başlatıldı. Absorbans 20°C'de 3 dakika hassas terazi ile süresince kayıt edildi ve Glutasyon redüktaz aktivitesi 9,6 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplandı. (Habig ve ark. 1974).

Kör olarak kullanmak amacıyla 2,8 ml fosfat tamponuna ve 100 μl 30 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzen eklendi. Örnek test tüplerine 2,7 ml fosfat tamponu ve 100 μl 30 mM CDNB eklendi.

Kör ve örnek deney tüpü 37 °C'de 5 dakika süresiyle inkübe edildi. Beş dakika sonrasında kör tüpünün spektrumu fosfat tamponuna karşı 5 dakika süreyle tarandı. Deney tüplerine 100 μl GSH ve 100 μl örnek eklendi ve spektrum taramaları 5 dakika boyunca gerçekleştirilerek 340 nm'deki meydana gelen absorbans farkı ölçüldü.

Glutasyon S-transferaz aktivitesinin değerlendirilmesinde bir birim aktivite, 1 μmol ürünün dakikada oluşumunu katalizleyen enzim miktarı olarak değerlendirilmektedir.

Absorbsiyon farkı (ΔA_{340}) kör ve örnekler için hesaplandıktan sonra glutasyon S-transferaz aktivitesi denklem 3-5 ve 3-6'ya göre GST aktivitesi (nmol/dak/ml) hesaplandı.

Glutasyon S-transferaz Aktivitesinin Hesaplanması:

$$GST \text{ nmol/dak/ml} = \frac{\Delta A_{340} \text{ örnek} - \Delta A_{340} \text{ kör}}{0.0096} \times \frac{\text{Toplam hacim}}{\text{Örnek hacmi}} \times \text{dilüsyon katsayısı} \quad (3-5)$$

CDNB için 340 nm'deki ekstinksiyon katsayısı: $0,0096 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Örneğin dilüsyon katsayısı: 10

$$GST \text{ enzim aktivitesi (U/karaciğer mg protein)} = \frac{\text{nmol/dak/ml}}{\text{karaciğer mg protein/ml}} \quad (3-6)$$

3.8.5. Katalaz Aktivitesinin Tayini

Karaciğer numunelerindeki katalaz enzim aktivitesini belirlemek amacıyla Aebi (1984)'nin yöntemini uyarlayan Cuellar-Cruz ve ark.'nın (2009) bildirdikleri yöntem kullanıldı.

Deneyin prensibi, hidrojen peroksitin dekompozisyonunun absorbansta meydana getirdiği azalma ile spektrofotometrik olarak takip edilmesi esasına dayanır (Aebi 1984). Her bir ünite katalaz dakikada $1,0 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ dekompozisyonu UV spektrofotometrede 240 nm'de takip edilir. Katalaz enziminin aktivitesi ile hidrojen peroksitin dekompozisyonu sonucunda 240 nm'de oluşan birim zamandaki absorbans düşüşü katalaz aktivitesinin bir ölçütüdür. Köre karşı 240 nm'de önce 0. sn, 30. sn ve 60. sn'de absorbans düşüşü ölçülerek elde edilen değerler deney gruplarında tespit edilen karaciğer protein seviyelerine bölünerek ünite/mg olarak hesaplandı.

Kuvartz spektrofotometre küvetleri içerisine 2 ml fosfat tamponu ve 1 ml 30 mM H_2O_2 kör eklenerek hazırlanan kör numunenin absorbans değerleri 240 nm'de okundu.

Karaciğer homojenatı santrifüj edilip kirlilik uzaklaştırıldıktan sonra örneklerin 1/50 oranında fosfat tamponu ile sulandırılması için 980 μl fosfat tamponuna 20 μl süpernatant eklenerek otomatik pipetle karıştırıldı.

Her örneğin katalaz enzim aktivitesinin tayini için spektrofotometre küvetlerine 1 ml dilüe örnek, 1 ml fosfat tamponu, 1 ml dilüe örnek eklenerek karıştırıldı. Reaksiyon 1 ml H₂O₂ eklenerek başlatıldı. Başlangıç absorbansı 0,550-0,520 arasında tespit edildi. Örnekler küvette karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede 2 dakika boyunca 30 saniye aralıklarla absorbans kinetik olarak beş nokta olarak 240 nm’de ölçümlendi.

Katalaz (CAT) Aktivitesinin Hesaplanması:

Elde edilen absorbans farkı kullanılarak saptanan katalaz aktivitesi değerleri denklem 3-6, 3-7’ye göre, ekstinksiyon katsayısı 0,043 mM⁻¹ kullanılarak hesaplandı (Cuéllar-Cruz ve ark. 2009). Her bir ünite CAT aktivitesi, dakikada parçalanmış µmol H₂O₂/mg protein olarak belirlendi.

$$\text{Aktivite (U/mg)} = \frac{\frac{\Delta A}{\text{dak}} \times V_t}{E_{240} \times d \times C_t \times 0,001} \quad (3-6)$$

$$\text{Aktivite (U/mg)} = \frac{\frac{\Delta A}{\text{dak}} \times 3000 \mu l}{0,04 \times 20 \mu l \times C_t} \quad (3-7)$$

ΔA/dak: A0-A60 başlangıç ve son absorbans farkı

Vt: Reaksiyon hacmi (1,01 ml)

E 240: OD 240 için molar ekstinksiyon katsayısı 0,043 mM⁻¹

d: Küvetin optik yol uzunluğu (1 cm)

Vs: Örnek hacmi (0,02 ml)

Ct: Örneğin protein konsantrasyonu

3.9. Gelişim Performansının Tayini

3.9.1. Canlı Ağırlık Artışı Tayini

Deney gruplarındaki alabalıklar, bireysel olarak deneyin başlangıcında ve sonunda su dolu bir kap içerisinde hassas terazi ile tartıldı. Deney sonu ve başlangıcındaki ağırlık farkının alabalık sayısına bölünmesiyle ortalama canlı ağırlık artışı hesaplandı.

$$CAA (g) = \text{Deney Sonu Grup Ortalama Ağırlık} - \text{Deney Başındaki Grup Ortalama Ağırlık} \quad (3-8)$$

3.9.2. Yüzde Canlı Ağırlık Artışının Tayini

Deney gruplarının deney sonu ve deney başlangıcı farkı, başlangıç ağırlıklarına bölünerek yüzde canlı ağırlık artışı 3-9'da belirtilen formül ile hesaplandı (Saether ve Jobling 1999).

$$\text{Yüzde Canlı Ağırlık Artışı (\%)} = \frac{\text{Son Ağırlık (g)} - \text{Başlangıç Ağırlığı}}{\text{Başlangıç Ağırlığı}} \times 100 \quad (3-9)$$

3.9.3. Spesifik Büyüme Oranının Tayini

Gökkuşığı alabalıklarında *Origanum minutiflorum* bitkisinin tozu, uçucu yağları ve sıcak su maseratın liyofilize halinin yem içerisinde verilmesinin günlük canlı ağırlık yüzdesi üzerinde etkinin değerlendirilmesi amacıyla spesifik büyüme oranı Company ve ark.'nın (1999) bildirdiği formüle (3-10) göre saptandı. Son ağırlık ortalamalarının doğal logaritma farkının deney gününe bölünmesiyle spesifik büyüme oranı hesaplandı.

$$SBO, (\%/gün) = \frac{\ln(\text{Son ağırlık ortalaması}) - \ln(\text{Başlangıç Ağırlık ortalaması})}{\text{Deneme gün sayısı}} \times 100 \quad (3-10)$$

3.9.4. Kondisyon faktörünün Tayini

Balığın beslenmesi ve sağlık durumun bir göstergesi olarak kondisyon faktörü Caballero ve ark.'nın (2002) bildirdikleri yöntemle göre 3-11'deki formül kullanılarak hesaplandı. Alabalıkların toplam boy ölçümleri, burun ucundan kuyruk yüzgecinin uzun lob ucu arasındaki mesafe dikkate alınarak, hazırlanan boy ölçüm tahtasında gerçekleştirildi.

$$\text{Kondisyon Faktörü (KF)} = [100 \times (\text{Canlı Ağırlığı (g)} \times (\text{Uzunluk (cm)})^{1/3})] \quad (3-11)$$

3.10. İstatiksel Değerlendirme

Farklı gruplardan elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey HSD ("Honestly Significant Difference") post-hoc testleri kullanıldı ve güven faktörü % 95 olarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Ekstraksiyon Verimi

Origanum minutiflorum liyofilize ekstrakt tozu ağırlığının toplam bitki ağırlığına kuru ağırlık bazında oranı yüzdelik birimle olarak ifade edilmiş olup yapılan tekrarlı işlemlerinin ortalaması alındığında sıcak su maserasyonunun liyofilize edilerek toz haline getirilerek elde edilen liyofilize ekstrakt verimi ortalaması $\% 11,50 \pm \% 0,26$ olarak saptanmıştır.

Hidrodistilasyon işlemi sonucunda elde edilen uçucu yağların su kısmı uzaklaştırıldıktan sonra ağırlığı, kullanılan toplam bitki ağırlığına bölünerek yüzde ekstraksiyon verimi olarak hesaplanmıştır. Uçucu yağ ekstraksiyon verimi ortalaması $\%2,4 \pm \% 0,9$ olarak tespit edilmiştir.

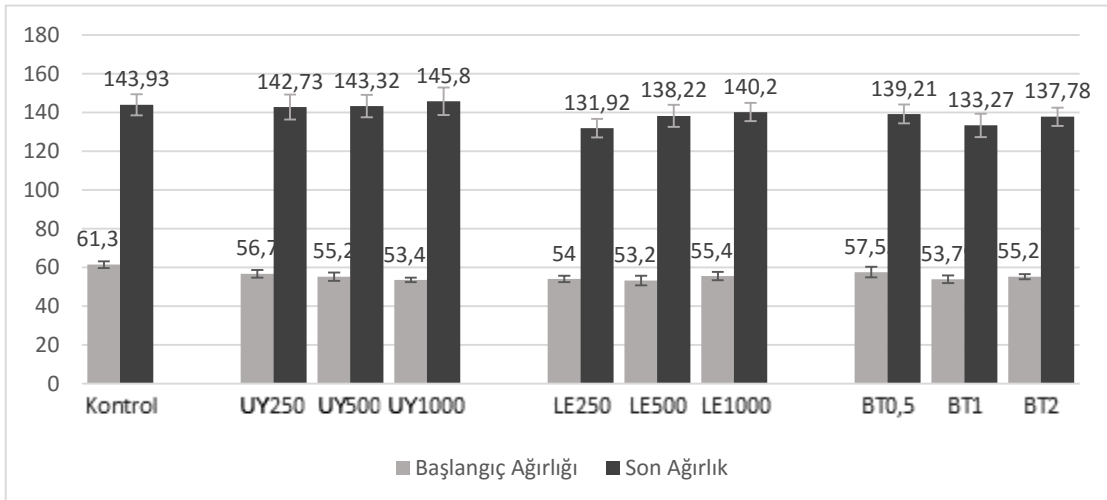
4.2. Balıkların Gelişim Performansı İle İlgili Bulgular

Origanum minutiflorum bitkisinin liyofilize ekstraktının ve uçucu yağlarının yem içerisinde verilmesinin gökkuşağı alabalıklarının gelişim performansı üzerine etkisi canlı ağırlık artış miktarı (g), canlı ağırlık artış yüzdesi, spesifik büyüme oranı, kondisyon faktörü belirlenerek değerlendirildi. Alabalıkların deney başlangıcı ağırlıkları ve 8 hafta süren deneyin sonundaki ağırlıkları Tablo 4-1 ve Şekil 4-1’de verilmektedir. Canlı ağırlık artışı değerlendirildiğinde başta uçucu yağlar ilave edilen yemlerle beslenen deney grupları olmak üzere tüm deney gruplarında canlı ağırlık artışı gözlemlendi ancak bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı. Yüzde canlı ağırlık artışı ile ilgili bulgular

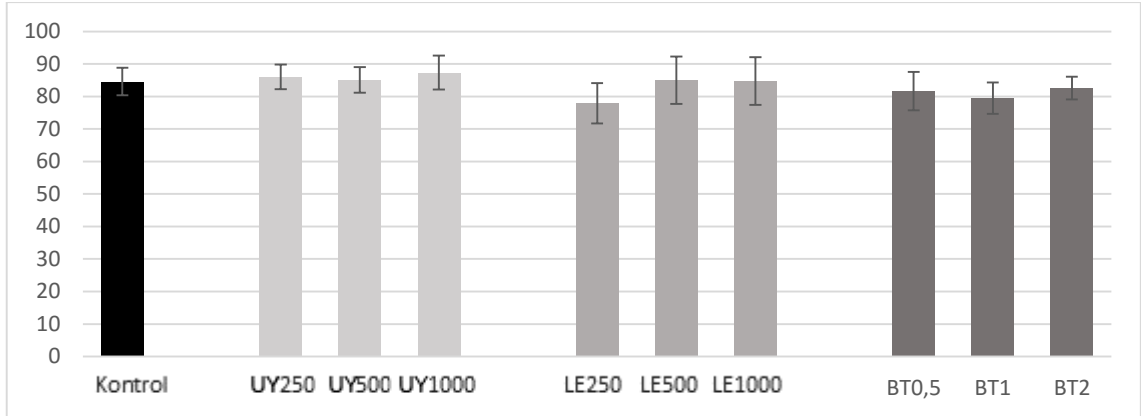
Tablo 4-1Şekil 4-3’de sunulmuştur. Deney sonu yüzde canlı ağırlık verileri kontrol (%135) ile kıyaslandığında UY250 (%152), UY500 (%160) ve UY1000 (%173) gruplarında, LE250 (%144), LE500 (%160) ve LE1000 (%153) grubunda, BT0,5 (%142), BT1 (%148) BT2 (%149) artış gözlenmiştir. Spesifik büyüme oranı ile ilgili bulgular Şekil 4-4’de, kondisyon faktörü ile ilgili bulgular Şekil 4-5’de verilmektedir. Spesifik büyüme oranı değerlerinin deney gruplarında $\%1,58-1,7$ arasında değişkenlik gösterdiği ve kondisyon faktörü değerlerinin ise $0,86-1,05$ yer aldığı tespit edilmiş ancak kontrole kıyasla veya gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Tablo 4-1: Canlı Ağırlık Artış Miktarları

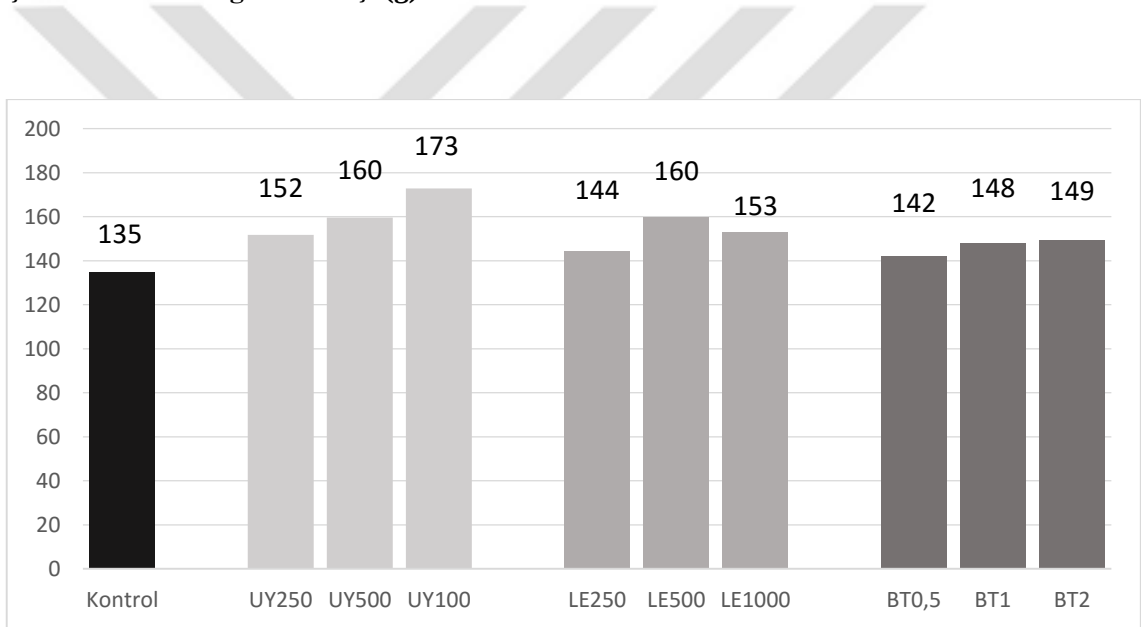
Deney grupları	Deney Başındaki Ortalama Balık Ağırlığı (g)	Standart Hata N=15	Deney Sonu Ortalama Balık ağırlığı (g)	Standart Hata N=15	Canlı Ağırlık Artışı (CAA) (g)	Standart Hata
Kontrol	61,37	1,715	143,93	5,53	84,63	4,25
250 mg uçucu yağ/ kg yem (UY250)	56,7	1,98	142,73	6,46	86,03	3,78
500 mg uçucu yağ/ kg yem (UY500)	55,2	2,11	143,32	5,81	90,12	3,92
1000 mg uçucu yağ/ kg yem (UY1000)	53,45	1,14	145,8	7,11	92,35	5,22
250mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE250)	54	1,62	131,92	4,81	77,92	6,2
500 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE500)	53,22	2,52	138,22	5,67	85,00	7,3
1000 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE1000)	55,45	2,14	140,2	4,69	84,75	7,3
% 0,5 toz bitki/ kg yem (BT0,5)	57,55	2,71	139,21	4,89	81,66	5,9
% 1 toz bitki / kg yem (BT1)	53,79	1,98	133,27	6,1	79,48	4,8
% 2 toz bitki / kg yem (BT2)	55,23	1,33	137,78	4,72	82,55	3,5



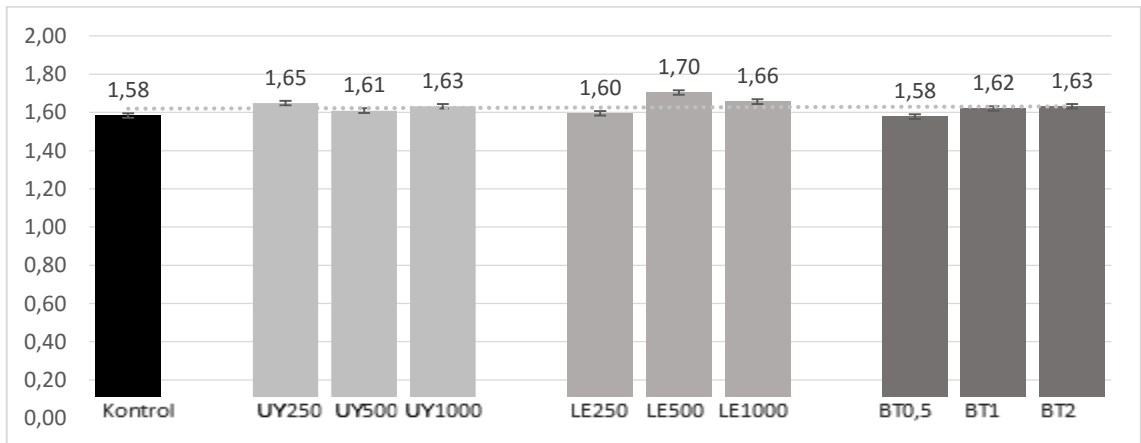
Şekil 4-1: Deney Başlangıcı ve Deney Sonu Canlı Ağırlıkları



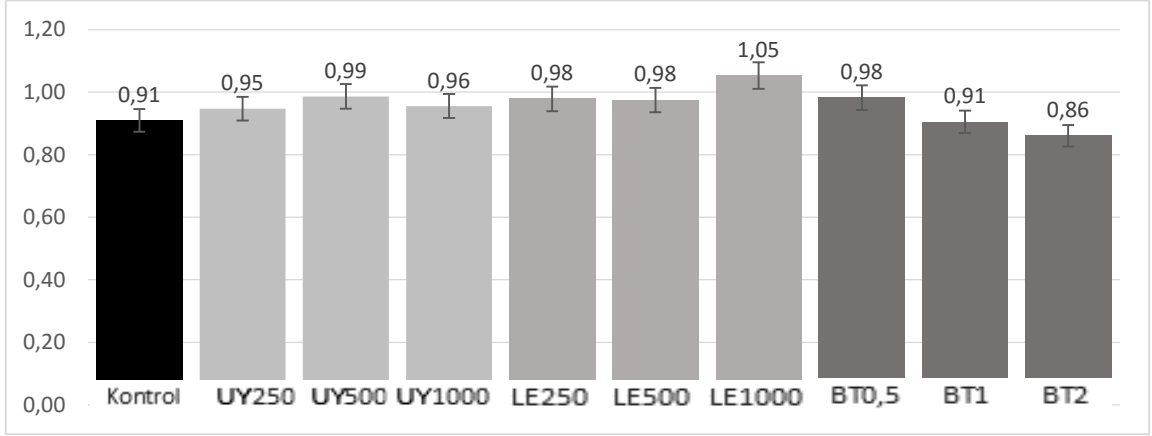
Şekil 4-2: Canlı Ağırlık Artışı (g)



Şekil 4-3: Yüzde Canlı Ağırlık Artışı



Şekil 4-4: Spesifik Büyüme Oranı Yüzdesi (%/gün)



Şekil 4-5: Kondisyon Faktörü

4.3. Nonspesifik İmmün Sistem İle İlgili Parametrelere Ait Bulgular

4.3.1. Respiratory Burst Aktivitesi

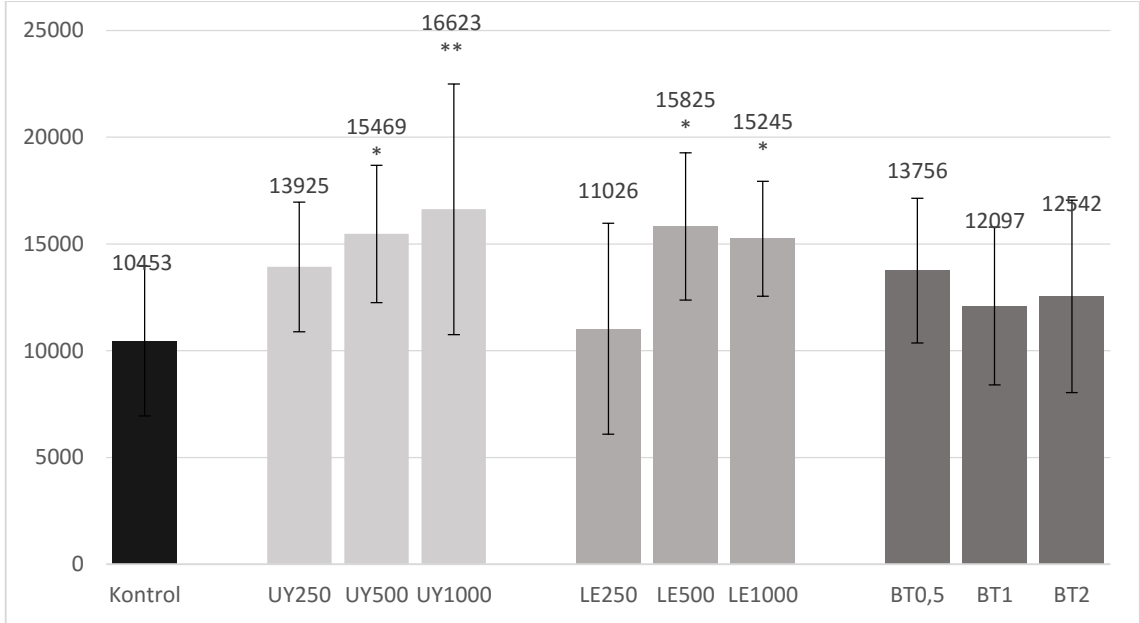
Respiratory burst aktivitesi düzeylerinin değerlendirilmesinde kanda bulunan fagositer hücrelerin luminol ile uyarılması ile açığa çıkan maksimum kemilüminesans miktarı ile ilgili sonuçlar ve istatistiksel bilgiler relatif kemilüminesans ünitesi birimi olarak Tablo 4-2’de ve Şekil 4-6’de verilmektedir.

Fagositler tarafından en yüksek respiratory burst aktivitesi kontrole kıyasla ($10453 \text{ RLU} \pm 3511$) UY1000 grubunda tespit edildi ($16623 \pm 5875 \text{ RLU}$) ve farkın yüksek istatistiksel anlamlılık taşıdığı belirlendi ($p < 0,01$). UY500, LE500 ve LE1000 grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ($p < 0,05$). UY250, LE250 ve bitkinin tozu ilave edilen yemler ile beslenen grupta respiratory burst aktivitesinin arttığı ancak artışların istatistiksel olarak anlamlılık taşımadığı saptandı.

Tablo 4-2: Respiratory Burst Aktivitesi Düzeyleri

Deney grubu	Respirator burst aktivitesi Relatif Luminisens ünitesi Ortalamları (RLU)	± Standart Sapma	P değeri
Kontrol	10453	3511	
250 mg uçucu yağ/ kg yem (UY250)	13925	3038	0,3269
500 mg uçucu yağ/ kg yem (UY500)	15469	3212	0,0223*
1000 mg uçucu yağ/ kg yem (UY1000)	16623	5875	0,0013**
250mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE250)	11026	4942	1,0000
500 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE500)	15825	3448	0,0110*
1000 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE1000)	15245	2691	0,0359*
% 0,5 toz bitki/ kg yem (BT0,5)	13756	3391	0,3992
% 1 toz bitki / kg yem (BT1)	12097	3695	0,9794
% 2 toz bitki / kg yem (BT2)	12542	4505	0,9085

*: p<0,05 **: p<0,01 Güven faktörü % 95 One way ANOVA- Tukey HSD Post-Hoc n=15



Şekil 4-6: Toplam Kan Respiratory Burst Aktivitesi Düzeyleri

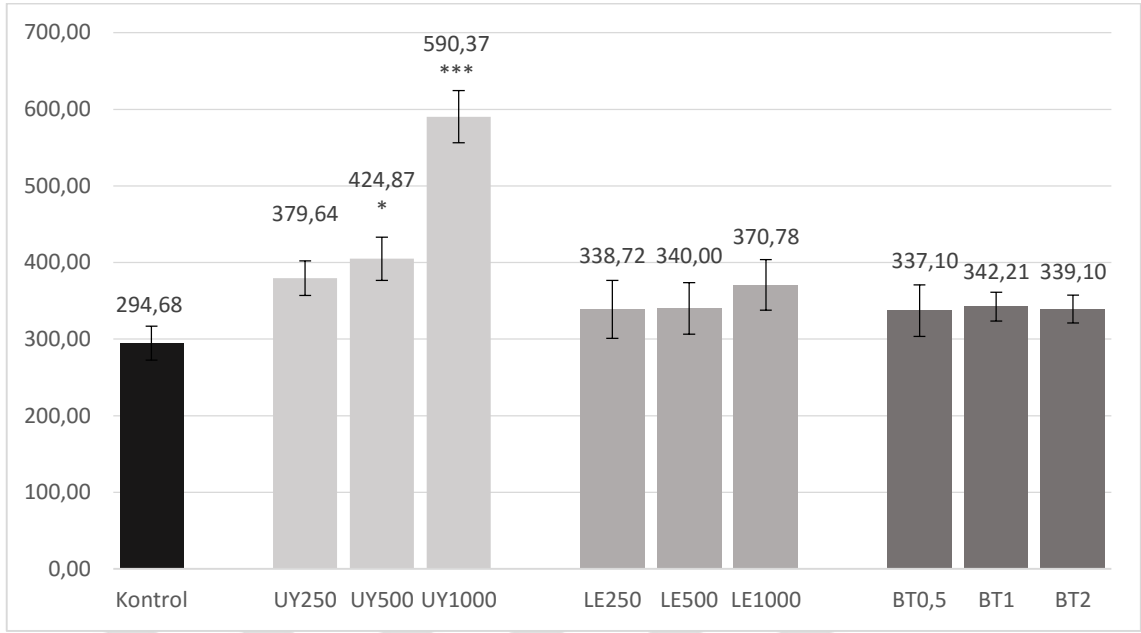
4.3.2. Serum Lizozim Aktivitesi

Serum örneklerine eklenen *M. lysodeikticus* konsantrasyonunun, lizozomal aktiviteye bağlı olarak düşüşü spektrofotometrik yöntemle takip edilerek elde edilen serum lizozomal aktivite değerleri ve istatistiksel bilgiler Tablo 4-3 ve Şekil 4-7’de verilmektedir. Gerçekleştirilen analizler sonucunda, deney grupları arasında en yüksek serum lizozomal aktivitesi UY1000 grubunda ($590,37 \pm 34,21$) ve UY500 grubunda ($424,81 \pm 19,21$) tespit edildi ve kontrole ($294,68 \pm 21,87$) kıyasla lizozim aktivitesindeki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Liyofilize ekstrakt ve bitki içeren yemlerle beslenen deney gruplarındaki serum lizozim aktivitesinde genel bir artış görülmesine rağmen kontrol grubuna kıyasla farklılık istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı.

Tablo 4-3: Serum Lizozim Aktivitesi Düzeyleri

Deney grubu	Serum Lizozim Aktivitesi Ortalamaları (ünite)	Standart Hata	P değeri
Kontrol	294,68	21,87	
250 mg uçucu yağ/ kg yem (UY250)	379,64	22,60	0,5143
500 mg uçucu yağ/ kg yem (UY500)	424,81	19,21	0,0449 *
1000 mg uçucu yağ/ kg yem (UY1000)	590,37	34,21	0,0000 ***
250mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE250)	338,72	37,80	0,9839
500 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE500)	340,00	33,52	0,9805
1000 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE1000)	370,78	33,18	0,6676
% 0,5 toz bitki/ kg yem (BT0,5)	337,10	33,72	0,9876
% 1 toz bitki / kg yem (BT1)	342,21	18,78	0,9732
% 2 toz bitki / kg yem (BT2)	339,10	18,22	0,9830

*: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$ Güven faktörü % 95 One way ANOVA- Tukey HSD Post-Hoc $n=15$



Şekil 4-7: Serum Lizozim Aktivitesi Düzeyleri

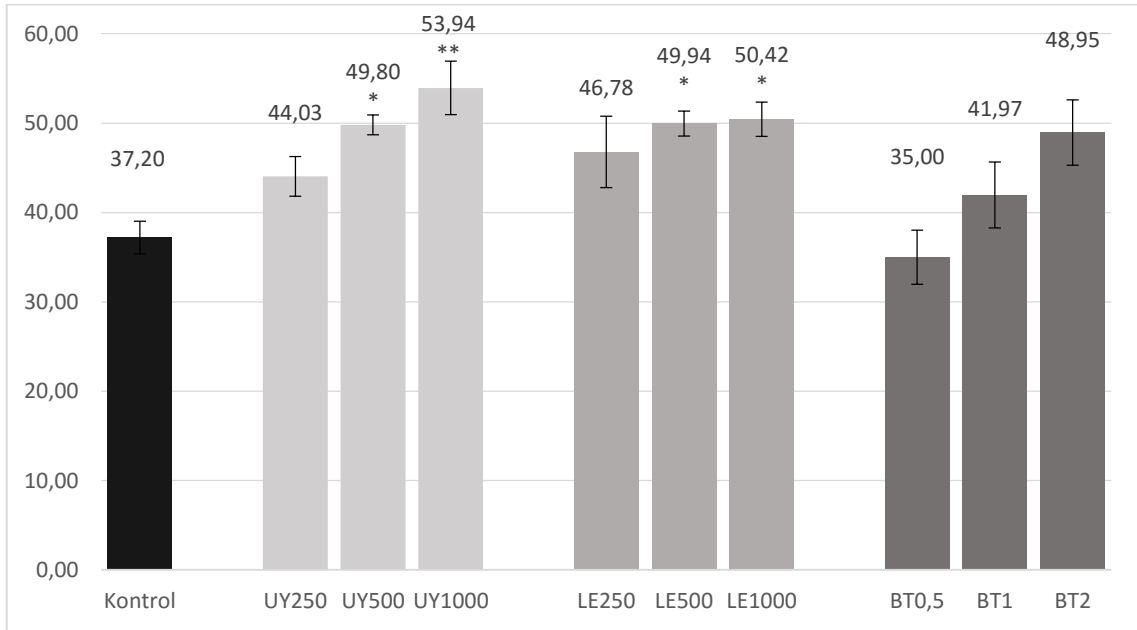
4.3.3. Fagositik Aktivite Düzeyleri

Kan örneklerine eklenen *Staphylococcus* sp. etkeninin fagositozunu gerçekleştiren fagositlerin sayılan tüm fagositik hücrelere oranı belirlenerek fagositik aktivite yüzdesi olarak ifade edildi. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-4 ve Şekil 4-8’de verilmektedir. Deney grupları içerisinde en yüksek fagositik aktivite yüzdesi kontrole ($37,20 \pm 1,84$) kıyasla UY1000 grubunda tespit edildi ($53,94 \pm 2,99$) ve farkın istatistiksel olarak yüksek düzeyde olduğu görüldü ($p < 0,01$). Deney grupları arasında istatistiksel olarak önemli diğer artışlar UY500 grubunda ($49,80 \pm 1,14$), LE1000 grubunda ($50,42 \pm 1,92$); LE500 grubunda ($49,94 \pm 1,39$) saptandı fark kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Fagositik aktivite yüzdesinde BT0,5 hariç tüm gruplarda sayısal bir artış görüldü ancak fark kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Tablo 4-4: Fagositik Aktivite Düzeyleri

Fagositik Aktivite	Fagositik aktivite Ortalamaları (%)	Standart Hata	P değeri
Kontrol	37,20	1,84	
250 mg uçucu yağ/ kg yem (UY250)	44,03	2,21	0,7642
500 mg uçucu yağ/ kg yem (UY500)	49,80	1,14	0,0479*
1000 mg uçucu yağ/ kg yem (UY1000)	53,94	2,99	0,0013**
250mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE250)	46,78	3,98	0,3019
500 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE500)	49,94	1,39	0,0432*
1000 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE1000)	50,42	1,92	0,0300*
% 0,5 toz bitki/ kg yem (BT0,5)	35,00	3,02	0,999
% 1 toz bitki / kg yem (BT1)	41,97	3,69	0,9676
% 2 toz bitki / kg yem (BT2)	48,95	3,66	0,0869

*: p<0,05 **: p<0,01 Güven faktörü % 95 One way ANOVA- Tukey HSD Post-Hoc n=15



Şekil 4-8: Fagositik Aktivite Düzeyleri

4.4. Oksidatif Stres ile İlgili Parametreler

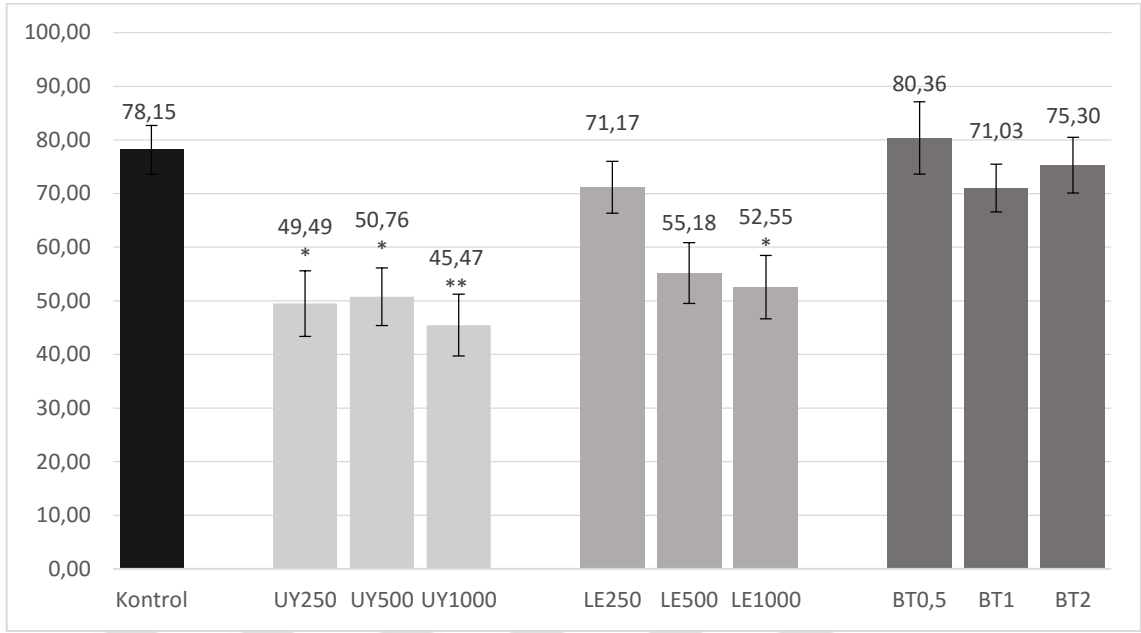
4.4.1. Malondialdehit Miktarı

Malondialdehit (MDA) bileşikleri spektrofotometrik yöntemle saptanarak, elde edilen sonuçlar MDA bileşiklerinin karaciğer protein miktarına oranı ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein) Tablo 4-5 ve Şekil 4-9'da verilmektedir. Oksidatif strese bağlı olarak hücre ve dokularda meydana gelen lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA bileşiği miktarındaki düşüş tüm uçucu yağ gruplarında görülmüş olup, en yüksek düşüş UY1000 grubunda meydana gelmiştir ($45,47 \mu\text{mol}/\text{mg} \pm 5,78$). UY1000 grubu malondialdehit seviyesinin düşüşü kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0,01$). MDA miktarının UY500 grubunda, $50,76 \mu\text{mol}/\text{mg} \pm 5,36$, UY250 grubunda $49,49 \mu\text{mol}/\text{mg} \pm 6,12$ olduğu tespit edilmiş ve bu değişikliğin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Yem içerisinde liyofilize ekstrakt verilen deney gruplarının karaciğer MDA seviyelerinde genel bir azalma gözlenmiş olup kontrol grubu ile kıyaslandığında fark LE1000 grubunda ($52,55 \mu\text{mol}/\text{mg} \pm 5,91$) istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$)

Tablo 4-5: Karaciğer Malondialdehit Düzeyleri

Deney grupları	MDA Miktarı Ortalamaları ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	Standart Hata	P değeri
Kontrol	78,15	4,53	
250 mg uçucu yağ/ kg yem (UY250)	49,49	6,12	0,0116*
500 mg uçucu yağ/ kg yem (UY500)	50,76	5,36	0,0198*
1000 mg uçucu yağ/ kg yem (UY1000)	45,47	5,78	0,0018**
250mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE250)	71,17	4,85	0,9963
500 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE500)	55,18	5,67	0,1007
1000 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE1000)	52,55	5,91	0,0399*
% 0,5 toz bitki/ kg yem (BT0,5)	80,36	6,73	1,0000
% 1 toz bitki / kg yem (BT1)	71,03	4,42	0,9957
% 2 toz bitki / kg yem (BT2)	75,30	5,19	1,0000

*: $p<0,05$ **: $p<0,01$ Güven faktörü % 95 One way ANOVA- Tukey HSD Post-Hoc $n=15$



Şekil 4-9: Karaciğer Malondialdehit Düzeyleri

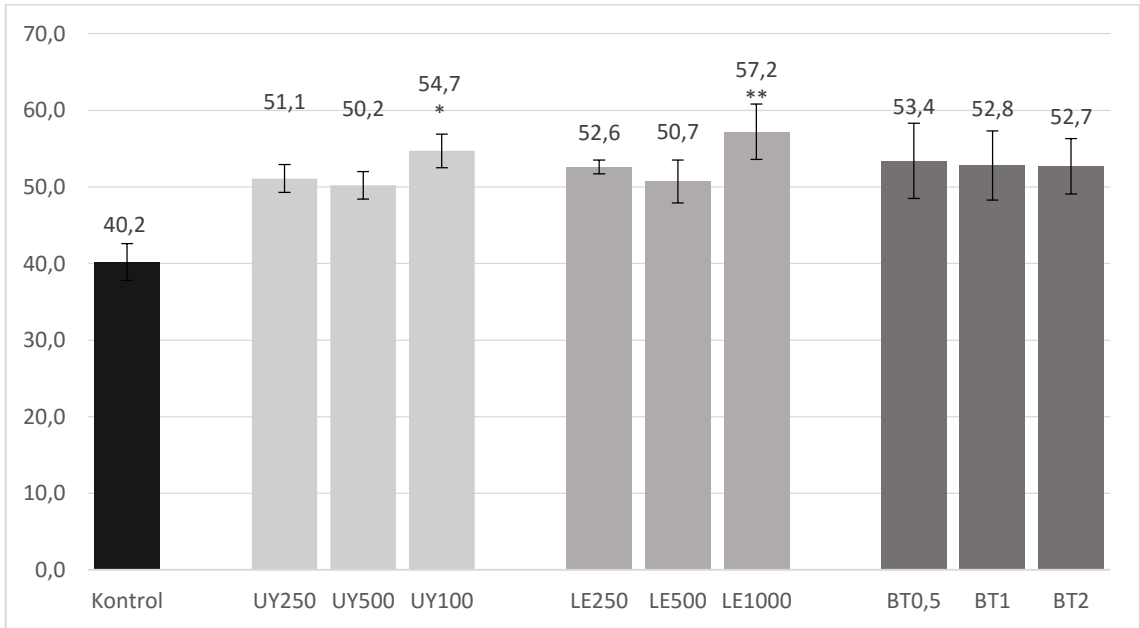
4.4.2. Süperoksit Dismutaz Enzimi Aktivitesi

Deney gruplarının karaciğer ekstraktlarından ticari kit kullanılarak ölçülen süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi spektrofotometrik olarak tespit edilmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 4-6 ve Şekil 4-10'da sunulmuştur. Tüm deney gruplarının karaciğer ekstraktlarında SOD enzim kapasitesinin artışının göstergesi olan SOD inhibisyon değeri en yüksek LE1000 ($57,2 \pm 3,6$) ve UY1000 grubunda ($54,7 \pm 2,2$) olduğu tespit edilmiş ve kontrole kıyasla farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Diğer deney gruplarında SOD inhibisyon değeri yüksek olmasına karşın meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 4-6: Karaciğer Süperoksit Dismutaz Enzimi Aktivitesi

Deney grupları	SOD inhibisyon Ortalamaları (% inhibisyon)	Standart Hata	P değeri
Kontrol	40,2	2,4	
250 mg uçucu yağ/ kg yem (UY250)	51,1	1,8	0,2865
500 mg uçucu yağ/ kg yem (UY500)	50,2	1,8	0,4095
1000 mg uçucu yağ/ kg yem (UY1000)	54,7	2,2	0,0387*
250mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE250)	52,6	0,9	0,1381
500 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE500)	50,7	2,8	0,3384
1000 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE1000)	57,2	3,6	0,0061**
% 0,5 toz bitki/ kg yem (BT0,5)	53,4	4,9	0,0879
% 1 toz bitki / kg yem (BT1)	52,8	4,5	0,1239
% 2 toz bitki / kg yem (BT2)	52,7	3,6	0,1308

*: p<0,05 **:p<0,01 Güven faktörü % 95 One way ANOVA- Tukey HSD Post-Hoc n=15



Şekil 4-10: Karaciğer Süperoksit Dismutaz Enzim Düzeyleri

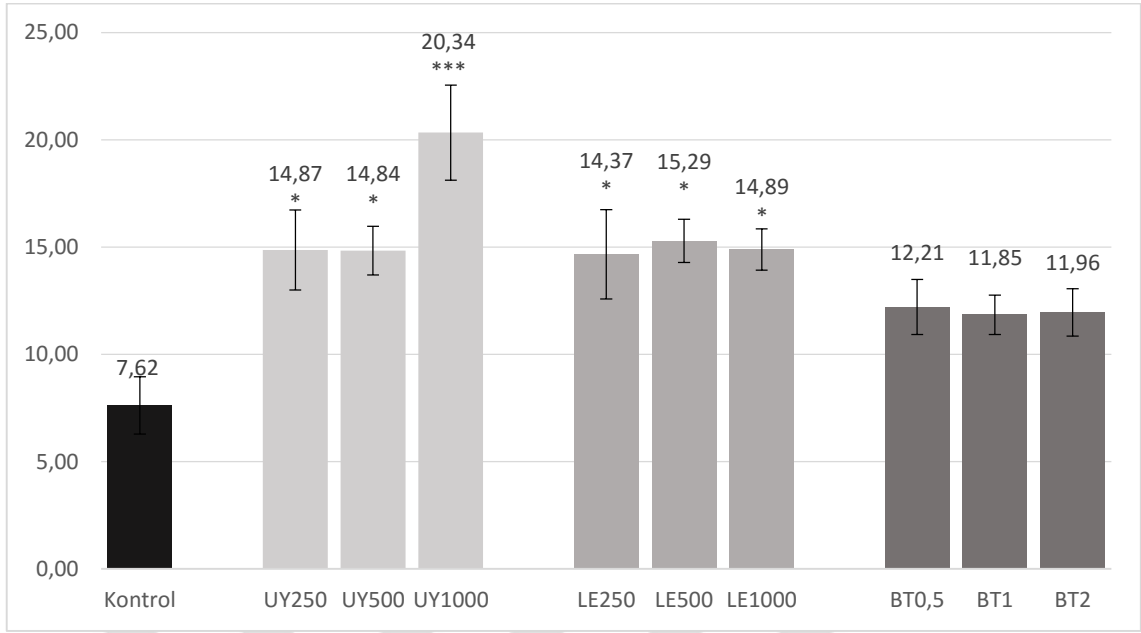
4.4.3. Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesi

Glutasyon peroksidaz enzimi (GPx), katalaz enzimi ile beraber hidrojen peroksiti parçalayarak hücreleri oksidatif stresten korumada görev almaktadır. Deney gruplarının karaciğer homojenatlarında, glutasyon peroksidaz enzimi aktivitesi ticari kit ile spektrofotometrik yöntemle dayanarak saptanmıştır. GPx aktivite düzeyleri deney gruplarının karaciğerlerinde tespit edilen protein miktarına bölünerek U/mg protein olarak Tablo 4-7 ve Şekil 4-11’de sunulmuştur. UY250 grubunda (14,87 U/mg protein $\pm$ 1,86) ve UY500 grubunda (14,84 U/mg protein $\pm$ 1,13) glutasyon peroksidaz aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlenmiştir ($p < 0,05$). UY1000 grubunun glutasyon peroksidaz aktivitesi 20,34 U/mg protein $\pm$ 2,22 olarak deney gruplarının içinde en yüksek değere sahip olduğu ve kontrole kıyasla farkın anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). LE250 grubunda enzim aktivitesi 14,37 U/mg protein $\pm$ 2,08, LE500 grubunda enzim aktivitesi 15,29 U/mg protein $\pm$ 1,01, LE1000 grubunda ise 14,89 U/mg protein $\pm$ 0,96 olarak tespit edilmiş ve farkın istatistiksel olarak anlamlılık taşıdığı görülmüştür ($p < 0,05$).

Tablo 4-7: Karaciğer Glutasyon Peroksidaz Enzimi Aktivitesi

Karaciğer Glutasyon Peroksidaz Düzeyleri	GPx Aktivitesi Ortalamaları (U/mg protein)	Standart Hata	P değeri
Kontrol	7,62	1,34	
250 mg uçucu yağ/ kg yem (UY250)	14,87	1,86	0,0212*
500 mg uçucu yağ/ kg yem (UY500)	14,84	1,13	0,0222*
1000 mg uçucu yağ/ kg yem (UY1000)	20,34	2,22	0,0000***
250mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE250)	14,37	2,08	0,04400*
500 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE500)	15,29	1,01	0,0110*
1000 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE1000)	14,89	0,96	0,0206*
% 0,5 toz bitki/ kg yem (BT0,5)	12,21	1,28	0,4507
% 1 toz bitki / kg yem (BT1)	11,85	0,92	0,5708
% 2 toz bitki / kg yem (BT2)	11,96	1,11	0,5337

*: $p < 0,05$ **: $p < 0,01$ ***: $p < 0,001$ Güven faktörü % 95 One way ANOVA- Tukey HSD Post-Hoc $n=15$



Şekil 4-11: Karaciğer Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi

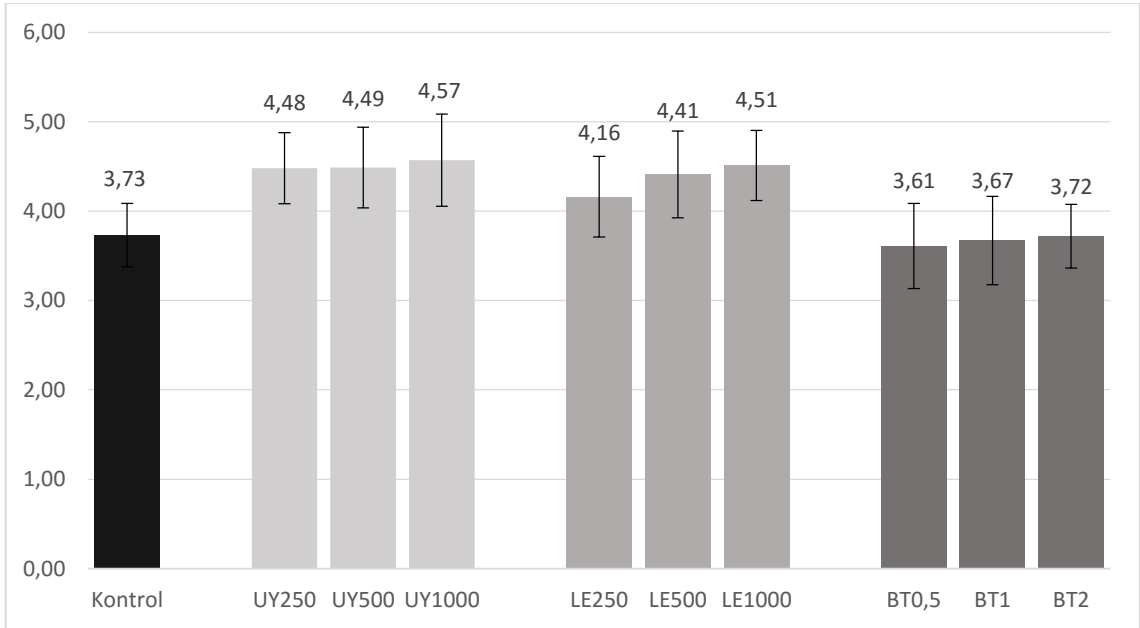
4.4.4. Glutatyon S-Transferaz Enzim Aktivitesi

Deney gruplarının karaciğer ekstraktlarında bulunan Glutatyon S-transferaz (GST) enziminin, 100 µl 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ile konjugat oluşturmalarının spektrofotometrik olarak tespit edilmesine dayanan yöntem sonucunda elde edilen sonuçlar ve istatistiksel değerler Tablo 4-8 ve Şekil 4-12’de sunulmuştur. Elde edilen verilere göre yemlere doğrudan bitki tozu eklenen gruplar hariç tüm gruplarda bir artış görülmüş ancak meydana gelen artışın istatistiksel açıdan bir anlam taşımadığı saptanmıştır.

Tablo 4-8: Karaciğer Glutasyon S-Transferaz Enzimi Aktivitesi

Karaciğer Glutasyon S-Transferaz Düzeyleri	GST aktivitesi Ortalamaları (U/mg protein)	Standart Hata	P değeri
Kontrol	3,73	0,35	
250 mg uçucu yağ/ kg yem (UY250)	4,48	0,40	0,9661
500 mg uçucu yağ/ kg yem (UY500)	4,49	0,45	0,9631
1000 mg uçucu yağ/ kg yem (UY1000)	4,57	0,52	0,7094
250mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE250)	4,16	0,45	0,9994
500 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE500)	4,41	0,49	0,9823
1000 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE1000)	4,51	0,39	0,9565
% 0,5 toz bitki/ kg yem (BT0,5)	3,61	0,47	1,0000
% 1 toz bitki / kg yem (BT1)	3,67	0,49	1,0000
% 2 toz bitki / kg yem (BT2)	3,72	0,36	1,0000

p>0,05 Güven faktörü % 95 One way ANOVA- Tukey HSD Post-Hoc n=15



Şekil 4-12: Karaciğer Glutasyon S-Transferaz Enzim Aktivitesi

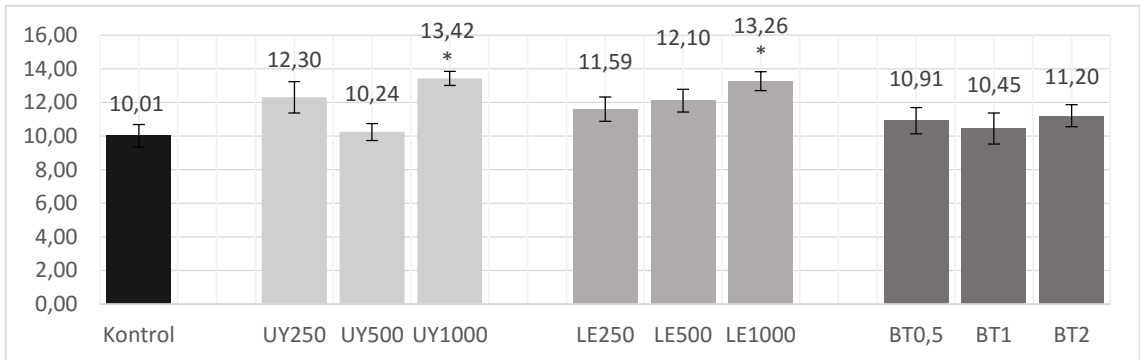
4.4.5. Katalaz Enzim Aktivitesi

Deney grupları karaciğer ekstraktlarında katalaz enziminin aktivitesi, hidrojen peroksitin parçalanmasına bağlı meydana gelen absorbands düşüşü olarak takip edilmiştir. Elde edilen sonuçlar karaciğer protein seviyelerine bölünerek (ünite/mg protein) Tablo 4-9 ve Şekil 4-13’de sunulmuştur. Deney grupları içerisinde UY1000’de (13,42 U/mg protein $\pm$ 0,42) ve LE1000’de (13,26 U/mg protein $\pm$ 0,56) istatistiksel anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Diğer deney gruplarında rakamsal bir artış görülmesine rağmen kontrol grubuna kıyasla fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 4-9: Karaciğer Katalaz Enzim Aktivitesi

Deney grubu	Katalaz aktivitesi Ortalamaları (U/mg protein)	Standart Hata	P değeri
Kontrol	10,01	0,67	
250 mg uçucu yağ/ kg yem (UY250)	12,30	0,93	0,3954
500 mg uçucu yağ/ kg yem (UY500)	10,24	0,50	1,0000
1000 mg uçucu yağ/ kg yem (UY1000)	13,42	0,42	0,0268*
250mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE250)	11,59	0,73	0,8522
500 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE500)	12,10	0,68	0,5310
1000 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE1000)	13,26	0,56	0,0433*
% 0,5 toz bitki/ kg yem (BT0,5)	10,91	0,79	0,9961
% 1 toz bitki / kg yem (BT1)	10,45	0,92	1,0000
% 2 toz bitki / kg yem (BT2)	11,20	0,66	0,9720

P<0,05 Güven faktörü % 95 One way ANOVA- Tukey HSD Post-Hoc n=15



Şekil 4-13: Karaciğer Katalaz Enzim Aktivitesi

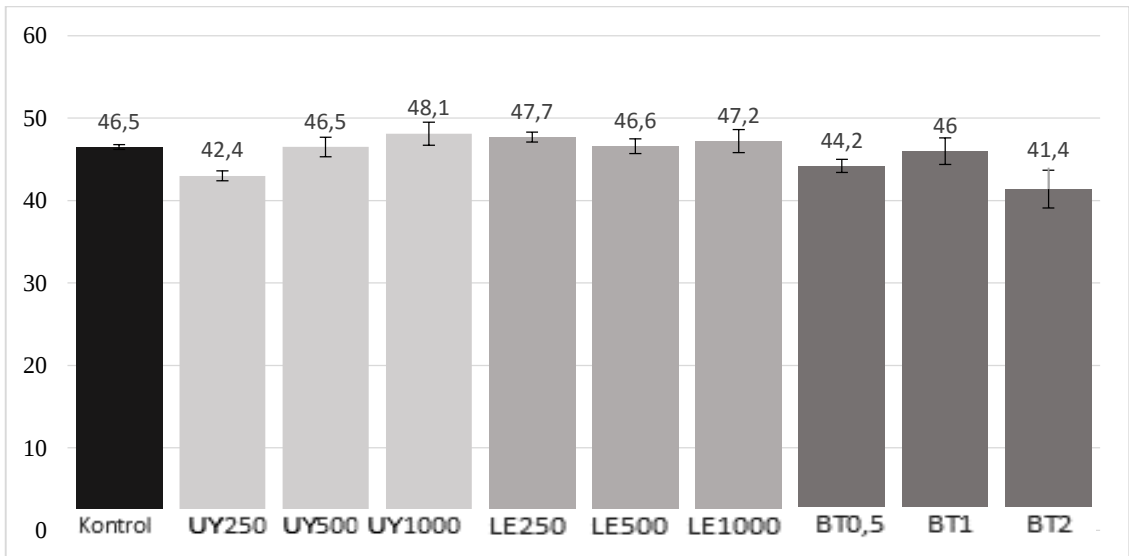
4.5. Karaciğer Toplam Protein Miktarı

Deney gruplarından alınan karaciğer örneklerinden Mikro Lowry yöntemiyle spektrofotometrik olarak saptanan toplam protein miktarı Tablu 4-10 ve Şekil 4-14’da sunulmaktadır. Yapılan analizin sonucunda deney gruplarının karaciğer protein seviyelerinde kontrole kıyasla veya gruplar arasında istatistiksel farklılık olmadığı saptandı.

Deney grubu	Karaciğer toplam protein miktarı Ortalamaları (mg/ml)	Standart Hata	P değeri
Kontrol	46,5	0,3	
250 mg uçucu yağ/ kg yem (UY250)	42,4	0,6	0.3761
500 mg uçucu yağ/ kg yem (UY500)	46,5	1,2	1.00
1000 mg uçucu yağ/ kg yem (UY1000)	48,1	1,4	0.9959
250mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE250)	47,7	0,6	1.00
500 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE500)	46,6	0,9	1.00
1000 mg liyofilize ekstrakt/ kg yem (LE1000)	47,2	1,4	1.00
% 0,5 toz bitki/ kg yem (BT0,5)	44,2	0,8	0.9505
% 1 toz bitki / kg yem (BT1)	46	1,6	1.00
% 2 toz bitki / kg yem (BT2)	41,4	2,3	0.1155

Tablo 4-10: Karaciğer Toplam Protein Miktarı

p>0,05 Güven faktörü % 95 One way ANOVA- Tukey HSD Post-Hoc n=15



Şekil 4-14: Karaciğer Toplam Protein Miktarı

5. TARTIŞMA

Su ürünleri üretiminde temel hedef, balık sağlığının korunması ve en yüksek verimin elde edilmesidir. Gelişimi artırıcı antibiyotiklerin kullanımının yasaklanması sonucunda yemden yararlanma oranını artırmak, hastalıklardan korunmak ve immunostimülan etki oluşturmak amacıyla bitkilerin kök, yaprak, çiçek gibi kısımları, bunlardan elde edilen ekstrakt veya uçucu yağların yem içerisinde kullanımları önem kazanmıştır (Rawling ve ark. 2009; Zheng ve ark. 2009). Bu kapsamda balık yemleri içerisinde bitkisel katkı maddelerinin kullanım potansiyelinin araştırılması popüler bir çalışma konusu haline gelmiştir. Bitki ve bitkisel ekstraktların balıklarda immun yanıtı güçlendirerek hastalığa karşı dayanıklılığın artırılması ve antioksidan özellikleri nedeniyle balık etinin saklanması sırasında et kalitesinin korunması amacıyla kullanılabileceği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Gatlin ve ark. 1992; Jian ve Wu 2003).

Çalışmamızda, gökkuşaağı alabalığı ülkemizde çok yetiştirilen tatlı su balık türü olması ve ortama adaptasyon yeteneğinin yüksekliği nedeniyle tercih edilmiştir (Zeng 2011; Anonim 2015b). Gökkuşaağı alabalıklarında immunostimülan ve antioksidan etkilerini araştırdığımız *Origanum minutiflorum* ise ülkemizde toplama ve ihracat miktarı yüksek olan endemik bir bitkidir. *Origanum minutiflorum*'dan elde edilen uçucu yağların ve su ekstraktının *in vitro* analizler sonucunda yüksek antioksidan özellik gösterdiği bildirilmiş ve antioksidan etkinlik göstermesinin nedeni karvakrol ve timol gibi fenolik maddeleri yüksek konsantrasyonda içermesine bağlanmıştır (Baddal 2010; Öke ve Aslım 2010). Bu bağlamda, *O. minutiflorum*'un sıcak su maserasyonunun liyofilize edilmesiyle elde edilen liyofilize ekstrakt, hidrodistilasyon ile elde edilen uçucu yağ ve bitkinin doğrudan öğütülmesiyle elde edilen toz halleri yeme üç farklı konsantrasyonda mevcut literatür çalışmalarına uygun olarak eklenmiştir (Haghighi ve Rohani 2015; Sönmez ve ark 2015; Zheng ve ark. 2009). Balıklarda bitkisel maddelerin ve ekstraktların verilmesinde en yaygın kullanım şekli olan yem içerisinde (oral) uygulama, ticari olarak uygulanabilir olması ve stres oluşturmaması nedeniyle tercih edilmiştir (Dalmo 2002; Galindo-Villegas ve Hosokawa 2004).

Çalışmamızda, balıklarda nonspesifik immun sisteme yönelik etkilerin önemli göstergeleri olarak kabul edilen respiratory burst aktivitesi, lizozomal aktivite ve fagositik

aktivite analizleri sekiz haftalık yedirme deneyi sonrasında alınan kan ve serum örneklerinden gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bitkinin *in vivo* antioksidan etkisinin belirlenmesi amacıyla alabalıkların karaciğer homojenatlarından malondialdehit düzeyleri, superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz ve katalaz aktivitesi saptanmıştır. Nonspesifik immün sistem ile ilgili analizler serum ve heparinli kanda gerçekleştirilmiş; antioksidan aktivitenin değerlendirilmesinde ise oksidatif strese karşı daha duyarlı olan karaciğer dokusu kullanılmıştır.

Origanum minutiflorum bitkisinin öğütülmüş tozu, sıcak su maserasyonunun liyofilize ekstraktı ve uçucu yağının yem içerisinde verilmesinin gökkuşağı alabalıklarının gelişim performansı üzerindeki etkisi incelendiğinde genel bir artış gözlenmesine rağmen bu artışın gruplar arası veya kontrole kıyasla istatistiksel anlamlılık taşımadığı tespit edilmiştir.

Zheng ve ark. (2009) *Origanum heracleoticum* uçucu yağlarının ve karvakrolün kanal yayın balıklarında canlı ağırlık artışını olumlu yönde etkilediğini bildirmesine rağmen, Yılmaz ve ark. (2015) gökkuşağı alabalıklarında karvakrolün canlı ağırlık üzerinde istatistiksel olarak belirgin bir fark oluşturmadığını gözlemlemiştir ($p>0,05$). Bu çalışma sonuçları arasındaki farklılığın bitki türlerinin, ekstrakt kompozisyonlarının ve balık türünün farklı olması nedeniyle gerçekleştiği düşünülmektedir.

Canlı ağırlık kazancının yanı sıra kondisyon faktörünün belirlenmesi de balıklarda beslenme ve gelişmenin değerlendirilmesinde yaygın kullanılan bir kriterdir. Genel olarak balıklarda kondisyon faktörünün 1'e yakın olması istenirken, iyi beslenen bir alabalıkta kondisyon faktörünün 1,14-1,53 olması gerektiği bildirilmektedir (Korkut ve ark. 2007). Çalışmamızda deney gruplarında belirlenen kondisyon faktör değerleri 0,86-1,05 arasında saptanmıştır ve elde edilen değerlerin Özoğul (2000) tarafından alabalıkların gerçekleştirilen bir çalışmada tespit edilen kondisyon faktörü (0,83-1,12) değerleri ile paralel olduğu gözlenmiştir. *Origanum minutiflorum* içeriklerinin gökkuşağı alabalıklarının kondisyon faktörü üzerinde istatistiksel öneme sahip bir farka olmadığı görülmüştür.

Nonspesifik immün yanıt aktivasyonunda fagositik hücrelerin fagositoz sırasında oksijen tüketiminin artmasıyla açığa çıkan serbest radikaller enfeksiyöz ajanların inaktive edilmesine yardımcı olmaktadır. Fagositoz sırasında fagositlerin oksijen tüketiminin ve

serbest radikallerin artışı respiratory burst olarak tanımlanmaktadır. Yabancı ajanlar ile stimüle edilen fagositlerdeki oksidasyon seviyelerinin artışının bir ölçütü olan respiratory burst aktivitesi nonspesifik immun sistemin önemli bir indikatörü olarak kabul edilmektedir (Akhlaghi ve ark. 2011; Nematollahi ve ark. 2005). Respiratory burst aktivitesinin saptanması nitro blue tetrazolium'un indirgenmesinin azidlerin varlığında peroksidaza bağlı oksidasyonun luminole bağlı kemilüminesans oluşumunun tespitine dayalı yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Dahlgren ve Karlsson 1999). Toplam kandan gerçekleştirilen kemilüminesansa dayalı respiratory burst analiz yönteminin diğer analiz yöntemlerine kıyasla daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu bildirilmektedir (Follin ve ark. 1991a; 1991b). Çalışmamız ile ülkemizde balıklarda kandan kemilüminesansa dayalı respiratory burst analizi ilk defa gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızdaki respiratory burst aktivitesi UY500, UY1000, LE500, LE1000 deney gruplarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Respiratory burst aktivitesinde meydana gelen artış, *Origanum minutiflorum*'dan elde edilen uçucu yağın ve liyofilize ekstraktın söz konusu konsantrasyonlarda nonspesifik immunostimülan etkinliğinin bir göstergesi olarak kabul edilebilir. *Origanum vulgare*'nin gökkuşağı alabalıklarının nonspesifik immun sistemleri üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, araştırmacılar yem içerisinde uygulanan etanolik perkolasyonun (% 1) kontrol grubuna kıyasla respiratory burst aktivitesini artırdığını bildirmişlerdir (Pourmoghimi ve ark. 2015). *Origanum minutiflorum*'a kimyasal bileşim yönünden benzerlik gösteren *Zataria multiflora* ve *Eucalyptus globulus* bitkilerine ait uçucu yağların da sazan balıklarında respiratory burst aktivitesini artırdığı belirlenmiştir (Soltani ve ark. 2010; Sheikhzadeh ve ark. 2011; Shokr ve ark. 2006). Karvakrolün origanum türlerinin temel bileşenlerinden biri olduğu göz önüne alındığında, çalışmamızda respiratory burst aktivitesinde görülen artışın *Origanum minutiflorum*'un diğer aktif bileşenlerinin bir sonucu olabileceği düşünülmektedir.

Lizozim, gram pozitif ve gram negatif bakterilerin hücre duvarının peptidoglikan yapısını parçalayarak bakterilerin lize olmasına sebep olan hidrolitik bir enzimdir. Nonspesifik immun sistemin önemli bir savunma sistemi olarak balıklarda kan, mukus ve diğer dokularda bulunmaktadır. Enfeksiyon varlığının veya immunostimülan etkili maddelerin balıklarda serum lizozim aktivitesini artırdığı bildirilmiştir (Fletcher ve White 1973; Studnicka ve ark. 1986). Çalışmamızda *O. minutiflorum*'un çeşitli ekstraktlarının

serum lizozim düzeyi üzerindeki etkinliği incelendiğinde, UY500 ve UY1000 deney grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Diğer deney gruplarında görülen artış ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara paralel olarak, *Origanum heracleoticum* L. bitkisinin uçucu yağlarını içeren Orego-Stim® ticari preparatın yem içerisinde % 0,05 konsantrasyonda uygulanmasının balıklarda serum lizozim aktivitesini kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artırdığı bildirilmiştir (Zhang ve ark. 2009). Pourmoghimi ve ark. (2015) tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise, gökkuşuğu alabalıklarına 8 hafta süresince yem içerisinde verilen *Origanum vulgare* etanolik perkolasyon ekstraktının balıklarda lizozim aktivitesini artırdığı saptanmıştır. Origanum türlerinin temel bileşeni olarak bilinen karvakrolün tek başına uygulandığında gökkuşuğu alabalıklarında lizozim aktivitesi üzerine herhangi bir etkisinin görülmediğinin bildirilmesi (Yılmaz ve Ergün 2015) nedeniyle lizozim aktivitesindeki artışın bitkinin içerdiği diğer kimyasal bileşenlerin kompozisyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. İçerdikleri aktif bileşenler yönünden benzerlik gösteren bitkisel ekstraktların farklı lizozim aktivitesi oluşturması bitkilerin kimyasal kompozisyonlarının farklılığına ve su sıcaklığı, pH, suyun tuzluluk oranı gibi çeşitli çevresel faktörlere bağlanmaktadır (Dominguez ve ark. 2005).

Nonspesifik immun sistem parametrelerden biri olan fagositik aktive, mikroorganizma ve diğer yabancı maddeleri fagosite etmiş fagositik hücrelerin, mevcut tüm fagositik hücrelere oranı olarak tanımlanmaktadır (Neumann ve ark. 2001). Yeme ilave edilerek uygulanan bitkisel maddelerin balıklarda fagositik aktiviteyi artırdığını bildiren çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, gökkuşuğu alabalıklarına 8 hafta boyunca yem içerisinde %1 konsantrasyonda verilen *Origanum vulgare* etanolik ekstraktının respiratory burst aktivitesi üzerinde herhangi bir etkisi saptanmazken, fagositik aktivite ve lizozomal aktivitede kontrol grubuna kıyasla istatistiksel öneme sahip bir artış meydana getirdiği bildirilmiştir (Haghighi ve Rohani 2015). Aynı bitki türünün etanolik perkolasyon ekstraktının ise gerek respiratory burst aktivitesini, gerekse lizozomal ve fagositik aktiviteyi artırdığı bildirilmiştir (Pourmoghimi ve ark. 2015). Çalışmamızda, UY500, UY1000, LE500 ve LE1000 deney gruplarında görülen fagositik aktivite artışının diğer Origanum türleri ile gerçekleştirilen çalışmalarla paralellik gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

İmmun sistem ile antioksidan mekanizmalar arasında ilişkiyi incelemeye yönelik araştırmalarda immün sistemde görev alan hücrelerin membranlarında oksidatif stres sonucu oluşan lipidik peroksidasyonun, bu hücrelerin membran bütünlüğüne ve membranlarında yer alan reseptörlere zarar verdiği saptanmıştır. İmmun sistem hücreleri membranlarında bulunan reseptörlerin doğrudan etkilenmesi veya ekspresyonunun bozulması hücreler arası iletişimi, hücre içi sinyal mekanizmalarını ve hücresel fonksiyonları bozarak immün sistem üzerinde olumsuz etki meydana getirmektedir. Ayrıca fagositik hücreler tarafından gerçekleştirilen respiratory burst sırasında reaktif oksijen türlerinin yüksek miktarda açığa çıkması, antioksidan aktivitenin yeterli olmadığı durumlarda lizozomal membrana veya fagositik hücrenin kendisine de zarar verebilir (Hughes 1999).

Biyolojik dokularda lipit peroksidasyonun, balık etinde ise otooksidasyonun belirlenmesinde malondialdehit (MDA) düzeylerinin saptanması yaygın olarak kullanılan bir kriterdir (Giera ve ark. 2012). Lipit peroksidasyonun son ürünü olarak meydana gelen MDA'nın saptanmasında gaz kromatografisi (GC-MS(MS)) ve likit kromatografi (LC-MS(MS)) gibi daha duyarlı tekniklerin yanı sıra çalışmamızda kullanılan spektrofotometrik yöntem de pratik ve duyarlı olması nedeniyle en yaygın analiz yöntemlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Giera ve ark. 2012). Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre; uçucu yağların 250, 500 ve 1000 mg/kg/yem ve 1000 mg/kg/yem liyofilize ekstraktın eklendiği yemlerle beslenen deney gruplarında karaciğer MDA düzeyinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür ($p < 0,05$). Bu etki en belirgin olarak 1000 mg/kg/yem konsantrasyonunda uçucu yağ verilen deney grubunda saptanmıştır. Sönmez ve ark. (2015), *Origanum*'un da ait olduğu *Lamiaceae* ailesinde bulunan *Salvia officinalis* (adaçayı), *Mentha spicata* (nane) ve *Thymus vulgaris* (kekik) uçucu yağlarının 60 gün süreyle 500, 1000 ve 1500 mg/kg/yem konsantrasyonlarında gökkuşağı alabalıklarına verilmesinin oluşturduğu antioksidan etkinliğini incelemişlerdir. Bu çalışmada MDA seviyelerinde meydana gelen azalma ile çalışmamızda *Origanum minutiflorum* 1000 mg/kg yem liyofilize ekstrakt verildiği deney grubunun ve uçucu yağlarının verildiği deney gruplarındaki MDA seviyelerindeki azalma paralellik göstermektedir. *Origanum minutiflorum* 'un uçucu yağ ve liyofilize ekstraktında bulunan karvakrol, timol gibi fenolik maddelerin radikal süpürücü etki göstererek antioksidan aktivite oluşturduğu düşünülmektedir. Uçucu

yağların tüm konsantrasyonlarının gökkuşağı alabalıklarında MDA seviyeleri düşürmesi ve dolayısıyla antioksidan aktivitesinin uçucu yağın içerdiği karvakrol gibi fenolik bileşiklerin yanı sıra diğer minör bileşiklerin de varlığı ve sinerjik etkisinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Origanum uçucu yağlarının antioksidan aktivitesinde fenolik bileşiklere ek olarak γ -terpinene, p-cymene ve α -terpinene varlığının da etkili olduğu (Teixeira ve ark. 2013) ve sıcak su maseratinin liyofilize tozunda bulunan bu apolar maddelerin antioksidan etkinliğe katkıda bulunduğu ileri sürülebilir. Bu durumu açıklamaya uygun olarak polar paradoks teorisine göre, polar antioksidanların daha apolar ortamlarda, apolar antioksidanların su veya daha polar ortamlarda daha yüksek antioksidan etki göstermesi, su maseratinin liyofilize tozunun meydana getirdiği *in vivo* antioksidan etkinin bir nedeni olarak görülmektedir (Shahidi ve ark. 2011). Origanum uçucu yağlarının içerisinde bulunan uçucu özelliği yüksek olan glikosidik bileşikler ve aglikonların standart antioksidanlardan hidroperoksitlerin oluşumunu daha fazla inhibe ettiğinin bildirilmiştir (Milos ve ark. 2000). Uçucu yağın kimyasal bileşenlerinin ette veya dokularda identifiye edilmesi veya miktarının belirlenmesi için uygun bir yöntem bulunmadığından dolayı doğrudan ölçüm yapılamamaktadır (Botsoglou ve ark. 2003). Uçucu yağların metabolizmasının ve atılımının hızlı olması nedeniyle vücutta akümülyasyonunun düşük düzeyde olduğu olduğu düşünüldüğünde, origanum uçucu yağlarındaki antioksidan maddelerin emilerek dolaşıma geçmesi ve et veya çeşitli dokularda varlığının kesim sonrası da antioksidan etkinliğe neden olabileceği bildirilmiştir (Botsoglou ve ark. 2003; Luna ve ark. 2010). Giannenas ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada biri karvakrol diğeri de timol içeren iki bitkisel gıda katkısının 8 hafta boyunca yemle birlikte gökkuşağı alabalıklarına verdikleri deney sonrasında balık etlerini 5 gün buzdolabında muhafaza edilmiş ve bu süre sonucunda yapılan analizlerde MDA seviyelerinin azaldığı ve oksidasyonun geciktiği bildirilmiştir. Timol ve karvakrol içeren yemlerle beslenen deney gruplarında MDA seviyelerinin anlamlı bir düşüş gösterdiği sonucundan hareketle origanum uçucu yağları ve liyofilize ekstraktında bulunduğu bilinen karvakrolün, lipidik oksidasyonun önlenmesinde etkin olduğu yorumu yapılabilir. MDA seviyelerindeki düşüş, *Origanum minutiflorum*'un antioksidan etkinliğinin, otooksidasyona bağlı olarak lezzet, koku, yağların bozulması gibi etin kalite değişimlerini önleyebilme potansiyelinin yüksek olduğunu göstermektedir. Balık dışındaki tavuk, hindi, domuz, tavşan ve koyun gibi hayvan türlerinde de yem içerisinde

origanumun çeşitli ekstraktlarının verilmesinin kesim sonrası etlerin saklanması sırasında MDA oluşumunu azalttığı ve lipidik oksidasyonu geciktirdiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Botsoglou ve ark. 2002, 2003; 2004; Simitzis ve ark. 2008).

Süperoksit dismutaz enzimi, süperoksit radikallerin hidrojen ve suya dönüşümünü katalize eden güçlü antioksidan etkili bir enzimdir. Süperoksit dismutaz aktivitesinin oksidatif strese bağlı olarak değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir (Mccord ve Fridovich 1969). Uzun süre oksidatif stres maruziyetinde, süperoksit dismutazın kendi oluşturduğu reaksiyon ürünleri olan H_2O_2 ve $OH^\cdot$ ile süperoksit dismutazı inhibe ettiği ileri sürülmektedir (Streit 2013).

Gökkuşığı alabalığı dokularında en yüksek süperoksit dismutaz aktivitesinin karaciğerde olduğu bildirildiğinden (Trenzado ve ark. 2006) dolayı çalışmamızda süperoksit dismutaz aktiviteleri karaciğer homojenatlarından tespit edilmiştir. Çalışmamızda karaciğer süperoksit dismutaz aktivitesi kontrol grubunda ve deney gruplarında % 40,2-57,2 arasında değişkenlik gösterirken tüm deney gruplarında süperoksit dismutaz aktivitesinde bir artış gözlenmiş; sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece uçucu yağ ve liyofilize ekstraktın 1000 mg/kg/yem konsantrasyonu ile beslenen deney grubundaki artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Malondialdehit seviyelerindeki düşüşün yüksek bulunması nedeniyle antioksidan aktivitesinin yüksek olduğunu kabul ettiğimiz UY250 ve UY500 deney gruplarında süperoksit dismutaz aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir artış görülmemiştir. Bu durumun olası nedeninin uçucu yağ içinde yüksek miktarda bulunan karvakrol ve diğer fenolik bileşiklerin radikal süpürücü etkinlik göstererek oksidatif strese neden olan radikalleri doğrudan ortadan kaldırmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle liyofilize ekstraktın 1000 mg/kg/yem konsantrasyonunda verildiği deney grubunda süperoksit dismutaz aktivitesi artışının farklı bir etki mekanizması ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Benzer bir çalışmada Puangkaew ve ark. (2005) yüksek antioksidan kapasiteye sahip ve doğrudan antioksidan etkili olan E vitaminini yem içerisinde gökkuşığı alabalıklarına verdiklerinde deney gruplarındaki karaciğer süperoksit dismutaz aktivitelerinde (% 62,4-68,6) istatistiksel bir farklılık tespit etmemişlerdir. Gökkuşığı alabalıklarında süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi ile ilgili Yonar (2012)'ın yaptığı çalışmada gökkuşığı alabalığı yemlerine likopen ilave edildiğinde süperoksit seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı

bir fark gözlenmediği bildirilirken oksitetrasiklin içeren yemle beslenen gruplarda likopen katkısının oksitetrasiklinin oluşturduğu oksidatif stresi önlediği bildirilmiştir. Bu çalışmalardan hareketle oksidatif stresin şiddetli olmadığı durumlarda superoksit dismutaz aktivitesinin değişmediği ancak oksidatif stresi artıran durumlarda origanum içeriklerinin süperoksit dismutaz aktivitesinde artışa neden olabileceği düşünülmektedir.

Glutatyon peroksidaz enzimi, oksijen metabolizması sırasında ortaya çıkan hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin detoksifiye edilmesinde görev alır. Glutatyon peroksidaz ve diğer glutatyon temelli enzimlerin aktivitesinin azalması, oksidatif stres oluşumunun bir göstergesidir. Glutatyon peroksidaz aktivitesi balık türüne ve dokuya bağlı olarak farklılık göstermektedir (Hasspieler ve ark. 1994). Çalışmamızda tüm uçucu yağ ve liyofilize ekstrakt içeren yemler ile beslenen gruplarda karaciğer glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldiği tespit edilmiştir. *Origanum minutiflorum* uçucu yağ ve liyofilize ekstrakt gruplarında meydana gelen karaciğer glutatyon peroksidaz enziminin artışı; kimyasal bileşenlerin oluşturduğu radikal süpürücü mekanizmalara bağlı olarak (Aeschbach 1994) ve reaktif oksijen türlerinin inaktive ettiği enzimatik antioksidanlarının seviyelerinin korunmasına yardımcı olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Yeh ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada fenolik maddelerin karaciğer süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz'ın mRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığını gözlemlemişlerdir. Bu mekanizmaya ek olarak origanum uçucu yağının glutatyon enzim ekspresyonu gerçekleştiren genlerde de artış meydana getirerek glutatyon peroksidaz enzim seviyelerinde artışa neden olabileceğini bildirilmiştir (Ranucci ve ark. 2015). *Origanum minutiflorum* içeren deney gruplarında saptadığımız glutatyon peroksidaz seviyeleri (11,85 – 20,34 U/mg protein) ile Deng ve ark.(2013)'nın gerçekleştirdiği çalışmada bildirilen değerler (12,03 – 21,27 U/mg protein) benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada yem içerisindeki kolesterol katkısının, deney gruplarında karaciğer glutatyon peroksidaz aktivitesini ve diğer antioksidan enzimleri artırdığı ve MDA seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir.

Sönmez ve arkadaşlarının nane, kekik ve adaçayı yağlarını 500, 1000, 1500 mg/kg/yem konsantrasyonunda içeren yemler ile gökkuşığı alabalıklarını besledikleri çalışmada 500 ve 1000 mg/kg kekik yağı içeren yemle beslenen hayvanlarda glutatyon S-transferaz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Sönmez ve ark. 2015).

Katalaz enzimi, glutatyon peroksidaz ile beraber etkinlik göstererek, oksijen metabolizması sonucunda açığa çıkan hidrojen peroksit ve diğer hidroperoksitler (ROOH) gibi peroksitlerin oluşturduğu hücresel hasarı, hidrojen peroksidin oksijen ve suya dönüşümüne katalizleyerek önler (Dorval ve Hontela 2003). Katalaz aktivitesinin azalması ile hidrojen peroksitin uzaklaştırılmasındaki kapasitenin azalması balıklarda oksidatif stresin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir.

Karaciğer dokusundaki katalaz enzim aktivitesi incelendiğinde, uçucu yağlar ile beslenen UY1000 ve LE1000 deney grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli bir artış görülmüş ancak diğer deney gruplarında meydana gelen artış, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir bulunmamıştır. Gao ve ark. (2010) ile Urso ve Clarkson (2003)'ün yaptıkları çalışmalarda katalaz enzim aktivitesinin değişmemesinin glutatyon peroksidaz enzim aktivitesinde gerçekleşen artış sonucunda olduğu ileri sürülmektedir.

5.1. SONUÇ

Origanum minutiflorum bitkisinin toz olarak yeme eklenmesinin balıklarda, nonspesifik immun parametreler üzerinde bir etkinlik göstermediği ancak bitkiden elde edilen sıcak su maseratı liyofilize tozunun ve uçucu yağların doza bağlı değişken derecelerde içerdiği aktif bileşenlere bağlı olarak gökkuşağı alabalıklarında fagositik aktivite, lizozomal aktivite ve respiratory burst aktivitelerin artışına sebep olarak nonspesifik immun sistemi stimüle ettiği görülmektedir. Bitkiden elde edilen uçucu yağ ve liyofilize ekstraktın 500 ve 1000 mg/kg/yem konsantrasyonlarında yemlere eklenmesinin nonspesifik immun sistemi stimüle ederek hastalıklara karşı direnci artırma amacıyla su ürünleri yetiştiriciliğinde uygulama potansiyeli taşıdığı görülmüştür. Ayrıca *Origanum minutiflorum*'dan elde edilen uçucu yağların 250, 500 ve 1000 mg/kg/yem konsantrasyonlarında ve liyofilize ekstraktın 1000 mg/kg/yem konsantrasyonunda yeme katılmasının malondialdehit seviyelerini düşürmesi ve antioksidan enzim aktivitesinin artışına sebep olmasından hareketle bitkinin özellikle uçucu yağının tüm konsantrasyonlarda ve liyofilize ekstraktın 1000 mg/kg konsantrasyonlarında yem içerisine eklenmesi sonucunda balıklarda antioksidan etkinliğin arttığı belirlenmiştir. Çalışmamızın sonucu olarak alabalıklarda *Origanum minutiflorum* bitkisinin uçucu yağının ve liyofilize ekstraktının 500 ve 1000 mg/kg/yem konsantrasyonlarında 8 hafta

süresince verilmesinin gökkuşuğı alabalıklarında nonspesifik immun sistemi desteklediğı ve antioksidan aktiviteye neden olduğı ileri sürülebilir. Bu etkinlik sadece temel kimyasal bileşenlere bağlanamayacağı, bitki uçucu yağları ve liyofilize ekstrakt içerisindeki bileşenlerin kompozisyonunun sinerjik etki meydana getirebileceğinden dolayı uçucu yağların ve liyofilize ekstraktın kimyasal bileşenlerinin bireysel ve kompozisyon biçiminde alabalıklardaki yararlılığı araştırılmalıdır.



KAYNAKLAR

- Ackman, R. (1980). *Fish lipids, part 1*. Advances in Fish Science and Technology. Fishing News Books, Birleşik Krallık, 87-103.
- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
- Aeschbach, R., Löliger, J., Scott, B. C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., ve Aruoma, O. I. (1994). Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 31-36.
- Ai, Q., Mai, K., Tan, B., Xu, W., Zhang, W., Ma, H. ve ark. (2006). Effects of dietary vitamin c on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *pseudosciaena crocea*. *Aquaculture*, 261(1), 327-336.
- Akhlaghi, M., Hoseini, A., Nematollahi, A. ve Hoseini, S.M. (2011). Humoral and non-specific immune responses in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) naturally exposed to and immunized with streptococcus iniae. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 5(4), 218-224.
- Akkuş, İ. (1999). *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*. Konya: Mimoza Yayınları.
- Alderman, D. ve Hastings, T. (1998). Antibiotic use in aquaculture: Development of antibiotic resistance–potential for consumer health risks. *International journal of food science & technology*, 33(2), 139-155.
- Alexander, J.B. ve Ingram, G.A. (1992). Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 249-279.
- Aly, S.M., Mohamed, M.F. ve John, G. (2008). *Echinacea as immunostimulatory agent in nile tilapia (oreochromis niloticus) via earthen pond experiment*. 8th international symposium on Tilapia in aquaculture. 1033.
- Anderson, D.P. (1996). Adjuvants and immunostimulants for enhancing vaccine potency in fish. *Developments in biological standardization*, 90, 257-265.
- Anderson, D.P. (1992). Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: Applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 281-307.

Anderson, D.P. ve Jeney, G. (1992). Immunostimulants added to injected aeromonas salmonicida bacterin enhance the defense mechanisms and protection in rainbow trout (oncorhynchus mykiss). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 34(3-4), 379-389.

Anderson, D.P., Moritomo, T. ve De Grooth, R. (1992). Neutrophil, glass-adherent, nitroblue tetrazolium assay gives early indication of immunization effectiveness in rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 30(4), 419-429.

Anderson, G.J., Lesuisse, E., Dancis, A., Roman, D.G., Labbe, P. ve Klausner, R.D. (1992). Ferric iron reduction and iron assimilation in saccharomyces-cerevisiae. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 47(3-4), 249-255.

Anonim. (2015a). Su ürünleri İstatistikleri. Erişim tarihi: 26.01.2016 T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Balıkçılık ve Su Ürünleri Genel Müdürlüğü, <http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BSGM.pdf>

Anonim. (2015b). Su ürünleri İstatistikleri. Erişim tarihi: 26.01.2016, T.C Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu, http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?tb_id=47&ust_id=13

Aranishi, F. (1999). Purification and characterization of α 1-proteinase inhibitor from carp (cyprinus carpio) serum. *Marine Biotechnology*, 1(1), 33-43.

Aranishi, F. ve Nakane, M. (1997). Epidermal proteases of the japanese eel. *Fish Physiology and Biochemistry*, 16(6), 471-478.

Aslım, B. ve Yücel, N. (2008). *In vitro* antimicrobial activity of essential oil from endemic *Origanum minutiflorum* on ciprofloxacin-resistant campylobacter spp. *Food Chemistry*, 107(2), 602-606.

Assaf, M., Ali, A., Makboul, M., Beck, J. ve Anton, R. (1987). Preliminary study of phenolic glycosides from origanum majorana. Quantitative estimation of arbutin. Cytotoxic activity of hydroquinone. *Planta Medica*, 53(4), 343-345.

Aşkun, T., Tümen, G., Satıl, F. ve Kılıç, T. (2008). Effects of some lamiaceae species methanol extracts on potential mycotoxin producer fungi. *Pharmaceutical Biology*, 46(10-11), 688-694.

Ayvaz, A., Karabörklü, S. ve Sağdıç, O. (2009). Fumigant toxicity of five essential oils against the eggs of *ephestia kuehniella* zeller and *plodia interpunctella* (hübner)(lepidoptera: Pyralidae). *Asian Journal of Chemistry*, 21(1), 596-604.

Baddal, M.K. (2010). *Origanum minutiflorum* bitkisinin antioksidan özelliklerinin İncelenmesi. (Yüksek Lisans), Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.

Basmacıoğlu, M.H., Baysal, Ş., Mısırlıoğlu, Z., Polat, M., Yılmaz, H. ve Turan, N. (2010). Effects of oregano essential oil with or without feed enzymes on growth performance, digestive enzyme, nutrient digestibility, lipid metabolism and immune response of broilers fed on wheat–soybean meal diets. *British Poultry Science*, 51(1), 67-80.

Başer, K.H.C. (2008). Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design*, 14(29), 3106-3119.

Başer, K.H.C., Özek, T., Tümen, G. ve Sezik, E. (1993). Composition of the essential oils of turkish *origanum* species with commercial importance. *Journal of Essential Oil Research*, 5(6), 619-623.

Bateman, L., Hughes, H. ve Morris, A. (1953). Hydroperoxide decomposition in relation to the initiation of radical chain reactions. *Discussions of the Faraday Society*, 14, 190-199.

Baydan, E., Yurdakök, B. ve Aydın, F.G. (2012). Balıklarda antibiyotik kullanımı. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 3(3), 45-52.

Baydar, H. (2005). Yayla kekiği (*Origanum minutiflorum* o. Schwarz et. Ph davis)'nde farklı toplama zamanlarının uçucu yağ içeriği ve uçucu yağ bileşenleri üzerine etkisi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(2), 175-178.

Bayne, C.J. ve Gerwick, L. (2001). The acute phase response and innate immunity of fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 25(8), 725-743.

Baytop, T. (1999). *Türkiye’de bitkiler İle tedavi*. 2. Baskı İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti.

Beers, R.F. ve Sizer, I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 195(1), 133-140.

Beghelli, D., Cardinali, R., Caterbi, S., Bistoni, O. ve Bistoni O., A.A., Gerli R., Castellini C. (2012, 2012). *Phytoderivates in rabbit diet and immune responses*. Paper presented at the World Rabbit Science Association Proceedings 10th, World Rabbit Congress Sharm El-Sheikh- Mısır.

Bendich, A., Phillips, M. ve Tengerdy, R.P. (2012). *Antioxidant nutrients and immune functions*. Springer Science & Business Media.

Björklund, H. ve Bylund, G. (1990). Temperature-related absorption and excretion of oxytetracycline in rainbow trout (*salmo gairdneri* r.). *Aquaculture*, 84(3), 363-372.

Boltaña, S., Roher, N., Goetz, F.W. ve Mackenzie, S.A. (2011). Pamps, prrs and the genomics of gram negative bacterial recognition in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1195-1203.

Botsoglou, N. A., Christaki, E., Fletouris, D. J., Florou-Paneri, P., ve Spais, A. B. (2002). The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. *Meat Science*, 62(2), 259-265.

Botsoglou, N. A., Govaris, A., Botsoglou, E. N., Grigoropoulou, S. H., ve Papageorgiou, G. (2003). Antioxidant activity of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate supplementation in long-term frozen stored turkey meat. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51, 2930-2936.

Botsoglou, N. A., Florou-Paneri, P., Christaki, E., Giannenas, I., ve Spais, A. B. (2004). Performance of rabbits and oxidative stability of muscle tissues as affected by dietary supplementation with oregano essential oil. *Archives of Animal Nutrition*, 58, 209-218.

Boshra, H., Li, J. ve Sunyer, J.O. (2006). Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 239-262.

Bragadóttir, M. (2001). *Endogenous antioxidants in fish*. University of Iceland, Dublin.

Bricknell, I. ve Dalmo, R.A. (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology*, 19(5), 457-472.

Buege, J.A. ve Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, 52, 302-310.

Buettner, G.R. ve Jurkiewicz, A. (1996). Handbook of antioxidants, New York: Marcel Dekker., 91-115.

Caballero, M. J., Obach, A., Rosenlund, G., Montero, D., Gisvold, M., ve Izquierdo, M. S. (2002). Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 214(1), 253-271.

Canbek, M., Uyanoğlu, M., Bayramoğlu, G., Şentürk, H., Erkasap, N., Köken, T. ve ark. (2008). Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver. *Phytomedicine*, 15(6), 447-452.

Carocho, M. ve Ferreira, I.C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.

Chakraborty, S.B. ve Hancz, C. (2011). Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. *Reviews in Aquaculture*, 3(3), 103-119.

Charai, M., Faid, M. ve Chaouch, A. (1999). Essential oils from aromatic plants (thymus broussonetti boiss., origanum compactum benth., and citrus limon (l.) nl burm.) as natural antioxidants for olive oil. *Journal of Essential Oil Research*, 11(4), 517-521.

Company, R., Calduch-Giner, J. A., Kaushik, S., ve Pérez-Sánchez, J. (1999). Growth performance and adiposity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): risks and benefits of high energy diets. *Aquaculture*, 171(3), 279-292.

Congleton, J.L. ve Wagner, E.J. (1991). Acute-phase hypoferremic response to lipopolysaccharide in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 98(2), 195-200.

Cuéllar-Cruz, M., Castaño, I., Arroyo-Helguera, O. ve De Las Peñas, A. (2009). Oxidative stress response to menadione and cumene hydroperoxide in the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(4), 649-654.

Çetin, H., Çilek, J.E., Aydın, L. ve Yanıkoğlu, A. (2009). Acaricidal effects of the essential oil of *Origanum minutiflorum* (Lamiaceae) against *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 160(3), 359-361.

Dabrowski, K., Lee, K.-J., Guz, L., Verlhac, V. ve Gabaudan, J. (2004). Effects of dietary ascorbic acid on oxygen stress (hypoxia or hyperoxia), growth and tissue vitamin concentrations in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 233(1), 383-392.

Dadaloğlu, I. ve Evrendilek, G.A. (2004). Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8255-8260.

Dahlgren, C., ve Karlsson, A. (1999). Respiratory burst in human neutrophils. *Journal of Immunological Methods*, 232(1), 3-14.

Daferera, D.J., Ziogas, B.N. ve Polissiou, M.G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2576-2581.

Dalmo, R., Seternes, T., Arnesen, S., Joergensen, T. ve Bøgwald, J. (1998). Tissue distribution and cellular uptake of *Aeromonas salmonicida* lipopolysaccharide (LPS) in some marine fish species. *Journal of Fish Diseases*, 21(5), 321-334.

Dalmo, R.A. (2002). Immunostimulation of fish. Erişim Tarihi: (04.02.2016), <http://www.ices.dk/products/CMdocs/2002/R/R0902.PDF>

Dalmo, R.A., Kjerstad, A.A., Arnesen, S.M., Tobias, P.S. ve Bøgwald, J. (2000). Bath exposure of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) yolk sac larvae to bacterial lipopolysaccharide (LPS): Absorption and distribution of the LPS and effect on fish survival. *Fish & Shellfish Immunology*, 10(2), 107-128.

Davis, P.H. (1965). *Flora of turkey and the east aegean islands*. İngiltere: Edinburgh University Press.

Dediu, L., Cristea, V., Mocanu, M., Dicu, D., Docan, A. ve Grecu, I. (2011). The effect of feeding frequency on growth performance of rainbow trout fingerlings reared in recirculating system. *AACL Bioflux*, 4(2), 141-145.

Del Rio, D., Stewart, A.J. ve Pellegrini, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, 15(4), 316-328.

Deng, J., Kang, B., Tao, L., Rong, H. ve Zhang, X. (2013). Effects of dietary cholesterol on antioxidant capacity, non-specific immune response, and resistance to aeromonas hydrophila in rainbow trout (oncorhynchus mykiss) fed soybean meal-based diets. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(1), 324-331.

Dimitroglou, A., Merrifield, D., Moate, R., Davies, S., Spring, P., Sweetman, J. ve ark. (2009). Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout (walbaum). *Journal of Animal Science*, 87(10), 3226-3234.

Dominguez, M., Takemura, A. ve Tsuchiya, M. (2005). Effects of changes in environmental factors on the non-specific immune response of nile tilapia, oreochromis niloticus l. *Aquaculture Research*, 36(4), 391-397.

Dorval, J. ve Hontela, A. (2003). Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (oncorhynchus mykiss). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 192(2), 191-200.

Düğenci, S.K., Arda, N. ve Candan, A. (2003). Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(1), 99-106.

Ellis, A. (1980). Non-specific defense mechanisms in fish and their role in disease processes. Erişim Tarihi: (06.02.2015), <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301972275>

Ellis, A. (1987). Inhibition of the aeromonas salmonicida extracellular protease by α 2-macroglobulin in the serum of rainbow trout. *Microbial Pathogenesis*, 3(3), 167-177.

- Ellis, A. (1990). Lysozyme assays. *Techniques in fish immunology*, 1, 101-103.
- Ellis, A. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, 25(8), 827-839.
- Engstad, R.E. (1993). Recognition of yeast cell wall glucan by atlantic salmon (*salmo salar* l.) macrophages. *Developmental & Comparative Immunology*, 17(4), 319-330.
- Ergönül, M.B. (2012). Balık sağlığı ve İmmunostimulanların kullanımı. *Journal of FisheriesSciencescom*, 6(3), 188-202.
- Erickson, M.C. (2002). *Lipid oxidation of muscle foods*. CRC Press.
- Erkan, A. (2013). Üzüm çekirdeği yağı ve/veya e vitamini+ organik selenyum katkısının etlik piliçlerde performans ve oksidatif stabilite üzerine etkileri. Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Evans, D.L. ve Gratzek, J.B. (1989). Immune defense mechanisms in fish to protozoan and helminth infections. *American Zoologist*, 29(2), 409-418.
- Evans, D.L. ve Jaso-Friedmann, L. (1992). Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 109-121.
- Fearon, D.T. (1997). Seeking wisdom in innate immunity. *Nature*, 388(6640), 323-324.
- Fletcher, T.C. ve White, A. (1973). Lysozyme activity in the plaice (*pleuronectes platessa* l.). *Cellular and Molecular Life Sciences*, 29(10), 1283-1285.
- Follin, P., Briheim, G., ve Dahlgren, C. (1991a). Mechanisms in Neutrophil Priming: Characterization of the Oxidative Response Induced by Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanine in Human Exudated Cells. *Scandinavian journal of immunology*, 34(3), 317-322.
- Follin, P., Johansson, A., & Dahlgren, C. (1991b). Intracellular production of reactive oxygen species in human neutrophils following activation by the soluble stimuli FMLP, dioctanoylglycerol and ionomycin. *Cell biochemistry and function*, 9(1), 29-37.

Forlenza, M., Fink, I.R., Raes, G. ve Wiegertjes, G.F. (2011). Heterogeneity of macrophage activation in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1246-1255.

Francis, G., Makkar, H.P. ve Becker, K. (2005). Quillaja saponins—a natural growth promoter for fish. *Animal Feed Science and Technology*, 121(1), 147-157.

Frøystad, M.K., Rode, M., Berg, T. ve Gjøn, T. (1998). A role for scavenger receptors in phagocytosis of protein-coated particles in rainbow trout head kidney macrophages. *Developmental & Comparative Immunology*, 22(5), 533-549.

Fuller, M.F. (2004). *The encyclopedia of farm animal nutrition*. CABI Pub.

Gabor, E.F., Ichim, O. ve Şuteu, M. (2012). Phyto-additives in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) nutrition. *Biharean Biologist*, 6(2), 134-139.

Galina, J., Yin, G., Ardo, L. ve Jeney, Z. (2009). The use of immunostimulating herbs in fish. An overview of research. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(4), 669-676.

Galindo-Villegas, J. ve Hosokawa, H. (2004). Immunostimulants: Towards temporary prevention of diseases in marine fish. *Advances en Nutricion Acuicola VII Memorias del VII Simposium Internationale de Nutricion Acuicola*, 16-19.

Gannam, A.L. ve Schrock, R.M. (1999). Immunostimulants in fish diets. *Journal of Applied Aquaculture*, 9(4), 53-89.

Giannenas, I., Triantafillou, E., Stavrakakis, S., Margaroni, M., Mavridis, S., Steiner, T. ve ark. (2012). Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 350–353, 26-32.

Giao, M., Pestana, D., Faria, A., Guimarães, J., Pintado, M., Calhau, C. ve ark. (2010). Effects of extracts of selected medicinal plants upon hepatic oxidative stress. *Journal of Medicinal Food*, 13(1), 131-136.

Giera, M., Lingeman, H. ve Niessen, W.M. (2012). Recent advancements in the lc-and gc-based analysis of malondialdehyde (mda): A brief overview. *Chromatographia*, 75(9-10), 433-440.

Goetz, F.W., Planas, J.V. ve Mackenzie, S. (2004). Tumor necrosis factors. *Developmental and Comparative Immunology*, 28(5), 487-497.

Grayson, T., Williams, R., Wrathmell, A., Munn, C. ve Harris, J. (1987). Effects of immunopotentiating agents on the immune response of rainbow trout, *salmo gairdneri richardson*, to erm vaccine. *Journal of Fish Biology*, 31, 195-202.

Grinde, B. (1989). Lysozyme from rainbow trout, *salmo gairdneri richardson*, as an antibacterial agent against fish pathogens. *Journal of Fish Diseases*, 12(2), 95-104.

Guselle, N., Markham, R. ve Speare, D.J. (2007). Timing of intraperitoneal administration of β -1, 3/1, 6 glucan to rainbow trout, *oncorhynchus mykiss* (walbaum), affects protection against the microsporidian *loma salmonae*. *Journal of Fish Diseases*, 30(2), 111-116.

Güner, A. (2000). *Flora of turkey and the east aegean islands*. İngiltere: Edinburgh University Press.

Habig, W.H., Pabst, M.J. ve Jakoby, W.B. (1974). Glutathione s-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.

Haghighi, M. ve Rohani, M.S. (2013). The effects of powdered ginger (*zingiber officinale*) on the haematological and immunological parameters of rainbow trout *oncorhynchus mykiss*. *Journal of Medicinal Plant and Herbal Therapy Resource*, 1, 8-12.

Haghighi, M. ve Rohani, M.S. (2015). Non-specific immune responses and heamatological parameters of rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) fed with *origanum vulgare* extract diets. *American Advances Journal of Biological Sciences*, 1(1), 1-9.

Halliwel, B., Aeschbach, R., Löliger, J. ve Aruoma, O. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33(7), 601-617.

Halliwel, B. ve Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*, 57(5), 715-724.

Halliwell, B. ve Gutteridge, J. (1989). Lipid peroxidation: A radical chain reaction. *Free radicals in biology and medicine*, 2, 188-218.

Halver, J.E. ve Hardy, R.W. (2002). *Fish nutrition*. ABD: Elsevier Science.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C. ve Heo, M.-S. (2011). Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317(4), 1-15.

Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Kim, M.C., Kim, J.S., Han, Y.J. ve Heo, M.S. (2009). Innate immune response and disease resistance in *carassius auratus* by triherbal solvent extracts. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(3), 508-515.

Harikrishnan, R., Heo, J., Balasundaram, C., Kim, M.-C., Kim, J.-S., Han, Y.-J. ve ark. (2010). Effect of traditional korean medicinal (tkm) triherbal extract on the innate immune system and disease resistance in *paralichthys olivaceus* against *uronema marinum*. *Veterinary Parasitology*, 170(1), 1-7.

Harris, J. ve Bird, D.J. (2000). Modulation of the fish immune system by hormones. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 77(3), 163-176.

Hasspieler, B.M., Behar, J.V. ve Digiulio, R.T. (1994). Glutathione-dependent defense in channel catfish (*ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*amériurus nebulosus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 28(1), 82-90.

Heo, H.-J., Cho, H.-Y., Hong, B., Kim, H.-K., Heo, T.-R., Kim, E.-K. ve ark. (2002). Ursolic acid of *origanum majorana* l. Reduces abeta-induced oxidative injury. *Molecules and Cells*, 13(1), 5-11.

Hidalgo, M.C., Expósito, A., Palma, J.M. ve De La Higuera, M. (2002). Oxidative stress generated by dietary zn-deficiency: Studies in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *The international journal of biochemistry & cell biology*, 34(2), 183-193.

Hoar, W.S., Randall, D.J., Iwama, G. ve Nakanishi, T. (1997). *The fish immune system: Organism, pathogen, and environment*. A.B.D.: Academic Press.

Horsberg, T. (2003). Aquatic animal medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 26(1-2), 39-42.

Hughes, D. A. (1999). Effects of dietary antioxidants on the immune function of middle-aged adults. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58(1), 79-84.

Hultin, H. (1994). Oxidation of lipids in seafoods İçinde (Ed.), *Seafoods: Chemistry, processing technology and quality Springer Science & Business Media*; 49-74.

Ishihara, N., Araki, T., Tamaru, Y., Inoue, M., Nishimura, A., Aoi, N. ve ark. (2002). Influence of green tea polyphenols on feed performance, growth performance, and fish body component in yellowtail (*seriola quinqueradiata*). *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*, 9, 7-14.

İspir, U. ve Yonar, M.E. (2007). Effects of levamisole on phagocytic activity of rainbow trout (*oncorhynchus mykiss* w.). *Acta Veterinaria Brno*, 76(3), 493-497.

Iwama, G. ve Nakanishi, T. (1996). *The fish immune system: Organism, pathogen, and environment*. Academic Press.

Jang, S., Marsden, M., Kim, Y., Choi, M. ve Secombes, C. (1995). The effect of glycyrrhizin on rainbow trout, *oncorhynchus mykiss* (walbaum), leucocyte responses. *Journal of Fish Diseases*, 18(4), 307-315.

Jayathirtha, M. ve Mishra, S. (2004). Preliminary immunomodulatory activities of methanol extracts of *eclipta alba* and *centella asiatica*. *Phytomedicine*, 11(4), 361-365.

Jeney, G. ve Anderson, D.P. (1993). Enhanced immune response and protection in rainbow trout to *aeromonas salmonicida* bacterin following prior immersion in immunostimulants. *Fish & Shellfish Immunology*, 3(1), 51-58.

Jollès, P. ve Jollès, J. (1984). What's new in lysozyme research? *Molecular and Cellular Biochemistry*, 63(2), 165-189.

Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S. ve Kobayashi, M. (1990). The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathology*, 25(2), 93-98.

Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S. ve Kobayashi, M. (1992). Immunopotential activity of freund's complete adjuvant in rainbow trout *oncorhynchus mykiss*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58(3), 433-437.

Kanazawa, K., Kawasaki, H., Samejima, K., Ashida, H. ve Danno, G.-I. (1995). Specific desmutagens (antimutagens) in oregano against a dietary carcinogen, trp-p-2, are galangin and quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(2), 404-409.

Karásková, K., Suchý, P., & Straková, E. (2015). Current use of phytogetic feed additives in animal nutrition: a review. *Czech Journal of Animal Science*, 60(12), 521-530.

Karkabounasli, S., Metsios, A., Lekkas, P., Kotsis, N. ve Skoufos, I. (2006). Anticarcinogenic and antiplatelet effects of carvacrol. *Experimental oncology*, 28.

Keembiyehetty, C. ve Gatlin, D.M. (1995). Evaluation of different sulfur compounds in the diet of juvenile sunshine bass *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 112(1), 155-159.

Kodama, H., Hirota, Y., Mukamoto, M., Baba, T. ve Azuma, I. (1993). Activation of rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) phagocytes by muramyl dipeptide. *Developmental & Comparative Immunology*, 17(2), 129-140.

Kokou, F., Rigos, G., Henry, M., Kentouri, M. ve Alexis, M. (2012). Growth performance, feed utilization and non-specific immune response of gilthead sea bream (*sparus aurata* l.) fed graded levels of a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture*, 364, 74-81.

Korkut, A. Y., Kop, A., Demirtaş, N. ve Cihaner, A. (2007). Balık Beslemede Gelişim Performansının İzlenme Yöntemleri. *Su Ürünleri Dergisi*, 24(1).

Korukluoğlu, M., Gürbüz, O., Şahan, Y., Yiğit, A., Kaçar, O. ve Rouseff, R. (2009). Chemical characterization and antifungal activity of *origanum onites* l. Essential oils and extracts. *Journal of Food Safety*, 29(1), 144-161.

Koukoulitsa, C., Zika, C., Geromichalos, G.D., Demopoulos, V.J. ve Skaltsa, H. (2006). Evaluation of aldose reductase inhibition and docking studies of some secondary metabolites, isolated from *origanum vulgare* l. Ssp. *Hirtum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(5), 1653-1659.

Krantz, G.E., Reddecliff, J.M. ve Heist, C.E. (1963). Development of antibodies against *aeromonas salmonicida* in trout. *The Journal of Immunology*, 91(6), 757-760.

Kristinsson, H.G., Meaden, A. ve Andersson, N. (2014). *Antioxidants and functional components in aquatic foods*. Wiley Online Library.

Kum, C. ve Sekkin, S. (2011). *The immune system drugs in fish: Immune function, immunoassay, drugs*. INTECH Open Access Publisher.

Lai, H. T., Hou, J. H., Su, C. I., ve Chen, C. L. (2009). Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui*. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 72(2), 329-334.

Langston, A., Bricknell, I. ve Ellis, A. (1998). *Iron binding capacity of peripheral blood leucocyte lysates from atlantic salmon (salmo salar l.)*.

Le Breton, A.D. (2009). Farming and health management: Prevention and policy measures İçinde (Ed.),^(Eds.), *The use of veterinary drugs and vaccines in mediterranean aquaculture* Zaragoza : CIHEAM; 207-220.

Lee, C.-S. (2015). *Dietary nutrients, additives and fish health*. John Wiley & Sons.

Lemhadri, A., Zeggwagh, N.-A., Maghrani, M., Jouad, H. ve Eddouks, M. (2004). Anti-hyperglycaemic activity of the aqueous extract of *origanum vulgare* growing wild in tafilalet region. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(2), 251-256.

Lim, C. ve Webster, C.D. (2001). Nutrition and fish health. Erişim Tarihi: (08.10.2015), <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300063355>

Lin, Y.L., Wang, C.N., Shiao, Y.J., Liu, T.Y. ve Wang, W.Y. (2003). Benzolignanoid and polyphenols from *origanum vulgare*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 50(5), 1079-1083.

Lindsay, G. ve Gooday, G. (1985). Chitinolytic enzymes and the bacterial microflora in the digestive tract of cod, *gadus morhua*. *Journal of Fish Biology*, 26(3), 255-265.

Liu, H.-W., Tong, J.-M. ve Zhou, D.-W. (2011). Utilization of chinese herbal feed additives in animal production. *Agricultural Sciences in China*, 10(8), 1262-1272.

Logambal, S. ve Michael, R.D. (2000). Immunostimulatory effect of azadirachtin in oreochromis mossambicus (peters). *Indian Journal of Experimental Biology*, 38, 1092-1096.

Loizzo, M.R., Menichini, F., Conforti, F., Tundis, R., Bonesi, M., Saab, A.M. ve ark. (2009). Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of origanum ehrenbergii boiss and origanum syriacum l. Essential oils. *Food Chemistry*, 117(1), 174-180.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.

Lu, J.M., Lin, P.H., Yao, Q. ve Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4), 840-860.

Luna, A., Labaque, M. C., Zygadlo, J. A., ve Marin, R. H. (2010). Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. *Poultry Science*, 89, 366-370.

Macarthur, J., Fletcher, T., Pirie, B., Davidson, R. ve Thomson, A. (1984). Peritoneal inflammatory cells in plaice, pleuronectes platessa l.: Effects of stress and endotoxin. *Journal of Fish Biology*, 25(1), 69-81.

Machado, M., Dinis, A.M., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Custódio, J.B. ve Do Céu Sousa, M. (2010). Anti-giardia activity of phenolic-rich essential oils: Effects of thymbra capitata, origanum virens, thymus zygis subsp. Sylvestris, and lippia graveolens on trophozoites growth, viability, adherence, and ultrastructure. *Parasitology Research*, 106(5), 1205-1215.

Magnadottir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 137-151.

Magnadottir, B. (2010). Immunological control of fish diseases. *Marine Biotechnology*, 12(4), 361-379.

Manson, F., Fletcher, T. ve Gooday, G. (1992). Localization of chitinolytic enzymes in blood of turbot, *scophthalmus maximus*, and their possible roles in defence. *Journal of Fish Biology*, 40(6), 919-927.

Maqsood, S., Samoon, M. ve Singh, P. (2009). Immunomodulatory and growth promoting effect of dietary levamisole in cyprinus carpio fingerlings against the challenge of aeromonas hydrophila. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 9(1).

Maqsood, S., Singh, P., Samoon, M.H. ve Munir, K. (2011). Emerging role of immunostimulants in combating the disease outbreak in aquaculture. *International Aquatic Research (Islamic Azad University, Tonekabon Branch)*, 3(3).

Marcincak, S., Popelka, P. ve Šoltysová, L. (2008). Polyphenols and antioxidative capacity of extracts from selected slovakian plants. *Acta Scientiarum Polonorum-Medicina Veterinaria*, 7(2), 9-14.

Marnett, L.J. (1999). Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424(1), 83-95.

Martinez-Alvarez, R.M., Morales, A.E. ve Sanz, A. (2005). Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and fisheries*, 15(1-2), 75-88.

Mccord, J.M. ve Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.

McCormick, S. D. (2011). The hormonal control of osmoregulation in teleost fish. *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*, 2, 1466-1473.

Milos, M., Mastelic, J., ve Jerkovic, I. (2000). Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). *Food Chemistry*, 71, 79-83.

Mead, J.F. (1976). *Free radical mechanisms of lipid damage and consequences for cellular membranes*.

Montero, D., Izquierdo, M., Tort, L., Robaina, L. ve Vergara, J. (1999). High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical

parameters in gilthead seabream, *sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry*, 20(1), 53-60.

Moritoma, T., Noda, H., Yamaguchi, I. ve Watanabe, T. (1992). Enhancement of granulocytopoiesis by freund's complete adjuvant in carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58(6), 1145-1149.

Muchuweti, M., Kativu, E., Mupure, C., Chidewe, C., Ndhlala, A. ve Benhura, M. (2007). Phenolic composition and antioxidant properties of some spices. *American Journal of Food Technology*, 2(5), 414-420.

Munday, B. ve Zilberg, D. (2003). Efficacy of, and toxicity associated with, the use of levamisole in seawater to treat amoebic gill disease. *Journal*, 23, 3-6.

Nakagawa, H., Sato, M. ve Gatlin, D.M. (2007). *Dietary supplements for the health and quality of cultured fish*. CABI.

Nauta, A.J., Daha, M.R., Van Kooten, C. ve Roos, A. (2003). Recognition and clearance of apoptotic cells: A role for complement and pentraxins. *Trends in immunology*, 24(3), 148-154.

Navarrete, P., Toledo, I., Mardones, P., Opazo, R., Espejo, R. ve Romero, J. (2010). Effect of thymus vulgaris essential oil on intestinal bacterial microbiota of rainbow trout, *oncorhynchus mykiss* (walbaum) and bacterial isolates. *Aquaculture Research*, 41(10), 667-678.

Nematollahi, A., Pasmans, F., Haesebrouck, F. ve Decostere, A. (2005). Early interactions of *flavobacterium psychrophilum* with macrophages of rainbow trout *oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 64(1), 23-28.

Neumann, N.F., Stafford, J.L., Barreda, D., Ainsworth, A.J. ve Belosevic, M. (2001). Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental and Comparative Immunology*, 25(8-9), 807-825.

Nikoskelainen, S., Kjellsen, O., Lilius, E.M. ve Schroder, M.B. (2006). Respiratory burst activity of atlantic cod (*gadus morhua* l.) blood phagocytes differs markedly from that of rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology*, 21(2), 199-208.

Nikoskelainen, S., Verho, S., Airas, K. ve Lilius, E.M. (2005). Adhesion and ingestion activities of fish phagocytes induced by bacterium aeromonas salmonicida can be distinguished and directly measured from highly diluted whole blood of fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 29(6), 525-537.

Ninomiya, M., Hatta, H., Fujiki, M., Kim, M., Yamamoto, T. ve Kusuda, R. (1995). Enhancement of chemotactic activity of yellowtail (seriola quinqueradiata) leucocytes by oral administration of quillaja saponin. *Fish & Shellfish Immunology*, 5(4), 325-328.

Ocana-Fuentes, A., Arranz-Gutiérrez, E., Senorans, F. ve Reglero, G. (2010). Supercritical fluid extraction of oregano (origanum vulgare) essentials oils: Anti-inflammatory properties based on cytokine response on thp-1 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1568-1575.

Orhan, I., Kartal, M., Kan, Y. ve Şener, B. (2008). Activity of essential oils and individual components against acetylcholinesterase. *Zeitschrift fuer Naturforschung C*, 63(7-8), 547-553.

Öke, F. ve Aslım, B. (2010). Biological potentials and cytotoxicity of various extracts from endemic *Origanum minutiflorum* o. Schwarz & ph davis. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1728-1733.

Özcan, M.M. ve Chalchat, J.C. (2009). Chemical composition and antimicrobial properties of the essential oil of origanum saccatum l. *Journal of Food Safety*, 29(4), 617-628.

Özkan, G., Baydar, H. ve Erbaş, S. (2010). The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of turkish oregano (origanum onites l.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(2), 205-209.

Özoğul. Y. (2000). The possibility of using crutacean waste products (CWP) on Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) Feding”, *Turk Journal of Biology*, 24, 850.

Pearson, A., Gray, J., Wolzak, A.M. ve Horenstein, N. (1983). Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. *Journal*.

Pérez, R., Romeu, B., Lastre, M., Morales, Y., Cabrera, O., Reyes, L. ve ark. (2014). Immunopotenciadores para la acuicultura. *Vaccimonitor*, 23(1), 24-31.

Pizzale, L., Bortolomeazzi, R., Vichi, S., Überegger, E. ve Conte, L.S. (2002). Antioxidant activity of sage (*salvia officinalis* and *s. fruticosa*) and oregano (*origanum onites* and *o. onites*) extracts related to their phenolic compound content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(14), 1645-1651.

Plumb, J.A. ve Hanson, L.A. (2011). *Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes*. John Wiley & Sons.

Pourmoghim, H., Haghighi, M. ve Rohani, M.S. (2015). Effect of dietary inclusion of *origanum vulgare* extract on non-specific immune responses and hematological parameters of rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *Bulletin Environmental Pharmacology Life Sciences*, 4, 33-39.

Press, C.M., Evensen, O., Reitan, L. ve Landsverk, T. (1996). Retention of furunculosis vaccine components in atlantic salmon, *salmo salar* L., following different routes of vaccine administration. *Journal of Fish Diseases*, 19(3), 215-224.

Puangkaew, J., Kiron, V., Satoh, S. ve Watanabe, T. (2005). Antioxidant defense of rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) in relation to dietary n-3 highly unsaturated fatty acids and vitamin e contents. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 140(2), 187-196.

Raa, J. (1996). The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Reviews in Fisheries Science*, 4(3), 229-288.

Raa, J. (2000). The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. *Avances en nutrición acuicola v memorias del V simposium internacional de nutrición acuicola*, 19, 22.

Ranjbar, M., Ghorbanpoor, M., Peyghan, R. ve Mesbah, M. (2010). Effects of dietary aloe vera on some specific and nonspecific immunity in the common carp (*cyprinus carpio*). *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 4(3).

Ranucci, D., Beghelli, D., Trabalza-Marinucci, M., Branciarri, R., Forte, C., Olivieri, O., ve Acuti, G. (2015). Dietary effects of a mix derived from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil and sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) wood

extract on pig performance, oxidative status and pork quality traits. *Meat science*, 100, 319-326.

Raudonis, R., Jakstas, V., Burdulis, D., Benetis, R. ve Janulis, V. (2008). Investigation of contribution of individual constituents to antioxidant activity in herbal drugs using postcolumn hplc method. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 45(5), 382-394.

Reid, S.G., Bernier, N.J. ve Perry, S.F. (1998). The adrenergic stress response in fish: Control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 120(1), 1-27.

Renoux, G. (1980). The general immunopharmacology of levamisole. *Drugs*, 20(2), 89-99.

Reznick, A., Packer, L. ve Sen, C. (1998). Strategies to assess oxidative stress İçinde (Ed.). *Oxidative stress in skeletal muscle* Springer; 43-58.

Ribas Cabezas, L., Mackenzie, S. ve Tort, L. (2006). *Functional genomics in fish: Towards understanding stress and immune responses at a molecular level*. Barselona Üniversitesi.

Rigos, G., ve Troisi, G. M. (2005). Antibacterial agents in Mediterranean finfish farming: a synopsis of drug pharmacokinetics in important euryhaline fish species and possible environmental implications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15(1-2), 53-73.

Rigos, G., Samartzis, A., Henry, M., Fountoulaki, E., Cotou, E., Sweetman, J. ve ark. (2010). Effects of additive iron on growth, tissue distribution, haematology and immunology of gilthead sea bream, *sparus aurata*. *Aquaculture International*, 18(6), 1093-1104.

Robertsen, B. (2006). The interferon system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 172-191.

Rombout, J. H. W. M., Berg, A. A., Berg, C. T. G. A., Witte, P., ve Egberts, E. (1989). Immunological importance of the second gut segment of carp. III. Systemic and/or mucosal immune responses after immunization with soluble or particulate antigen. *Journal of Fish Biology*, 35(2), 179-186.

Rombout, J. H. W. M., Huttenhuis, H. B. T., Picchietti, S., ve Scapigliati, G. (2005). Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish & shellfish immunology*, 19(5), 441-455.

Rombout, J. H., Abelli, L., Picchietti, S., Scapigliati, G., ve Kiron, V. (2011). Teleost intestinal immunology. *Fish & shellfish immunology*, 31(5), 616-626.

Ross, L.G., Ross, B. ve Ross, B. (2008). Anaesthesia of fish: I. Inhalation anaesthesia İçinde (Ed.),^(Eds.), Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals Oxford, İngiltere: Blackwell Publishing Ltd; 82-84.

Saether, B. S., ve Jobling, M. (1999). The effects of ration level on feed intake and growth, and compensatory growth after restricted feeding, in turbot *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture Research*, 30(9), 647-653.

Sahoo, P. (2007). Role of immunostimulants in disease resistance of fish. Erişim Tarihi: (20.02.2016), <http://www.cabi.org/cabreviews/?loadmodule=review&page=4051&reviewid=31924&site=167>

Sakai, D. (1992). Repertoire of complement in immunological defense mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 223-247.

Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172(1-2), 63-92.

Sanchez-Martínez, J. G., Pérez-Castañeda, R., Rábago-Castro, J. L., Aguirre-Guzmán, G., ve Vázquez-Sauceda, M. L. (2008). A preliminary study on the effects on growth, condition, and feeding indexes in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, after the prophylactic use of potassium permanganate and oxytetracycline. *Journal of the World Aquaculture Society*, 39(5), 664-670.

Saraç, N., Uğur, A., Duru, M. ve Varol, O. (2007). *Antimicrobial activity, antioxidant activity and chemical composition of origanum onites l. And origanum vulgare l. Ssp. Hirtum (link) ietswaart from mugla (turkey)*. Paper presented at the International Medicinal and Aromatic Plants Conference on Culinary Herbs Antalya.

Sargent, J.R., Tocher, D.R. ve Bell, J.G. (2002). The lipids. *Fish nutrition*, 3, 181-257.

Sari, M., Biondi, D.M., Kaâbeche, M., Mandalari, G., D'arrigo, M., Bisignano, G. ve ark. (2006). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of algerian *origanum glandulosum* desf. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(6), 890-898.

Savan, R. ve Sakai, M. (2006). Genomics of fish cytokines. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 1(1), 89-101.

Scholz, T. (1999). Parasites in cultured and feral fish. *Veterinary Parasitology*, 84(3), 317-335.

Secombes, C. (1996). *The nonspecific immune system: Cellular defenses*. Academic Press.

Secombes, C. ve Fletcher, T. (1992). The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 53-71.

Secombes, C.J. (1994). Enhancement of fish phagocyte activity. *Fish & Shellfish Immunology*, 4(6), 421-436.

Senso, L., Suárez, M., Ruiz-Cara, T. ve García-Gallego, M. (2007). On the possible effects of harvesting season and chilled storage on the fatty acid profile of the fillet of farmed gilthead sea bream (*sparus aurata*). *Food Chemistry*, 101(1), 298-307.

Sevaraj, V., Sampath, K. ve Sekar, V. (2004). Extraction and characterization of lipopolysaccharide from *aeromonas hydrophila* and its effects on survival and hematology of the carp, *cyprinus carpio*. *Asian Fisheries Science*, 17(1/2), 163-173.

Sharon, N. ve Lis, H. (1993). Carbohydrates in cell recognition. *Scientific American*, 268(1), 82-89.

Sheikhzadeh, N., Soltani, M., Ebrahimzadeh-Mousavi, H., Shahbazian, N. ve Norouzi, M. (2011). Effects of *zataria multiflora* and *eucalyptus globolus* essential oils on haematological parameters and respiratory burst activity in *cyprinus carpio*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 10(2), 316-323.

Shoemaker, C.A., Klesius, P.H. ve Plumb, J.A. (1997). Killing of *edwardsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 58(2), 181-190.

Sies, H. (1991). Oxidative stress: From basic research to clinical application. *The American journal of medicine*, 91(3), S31-S38.

Simitzis, P. E., Deligeorgis, S. G., Bizelis, J. A., Dardamani, A., Theodosiou, I., ve Fegeros, K. (2008). Effect of dietary oregano oil supplementation on lamb meat characteristics. *Meat Science*, 79, 217-223.

Sinyakov, M.S., Dror, M., Zhevelev, H.M., Margel, S. ve Avtalion, R.R. (2002). Natural antibodies and their significance in active immunization and protection against a defined pathogen in fish. *Vaccine*, 20(31), 3668-3674.

Sivaram, V., Babu, M., Immanuel, G., Murugadass, S., Citarasu, T. ve Marian, M. (2004). Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against vibrio harveyi infections. *Aquaculture*, 237(1), 9-20.

Siwicki, A., Morand, M., Klein, P., Studnicka, M. ve Terech-Majewska, E. (1998). Modulation of nonspecific defence mechanisms and protection against diseases in fish. *Acta Veterinaria Brno*, 67(4), 323-328.

Siwicki, A.K., Anderson, D.P. ve Rumsey, G.L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41(1), 125-139.

Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A.R., Simonič, M. ve Knez, Ž. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89(2), 191-198.

Slatter, D., Bolton, C. ve Bailey, A. (2000). The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia*, 43(5), 550-557.

Sobhana, K., Mohan, C. ve Shankar, K. (2002). Effect of dietary vitamin c on the disease susceptibility and inflammatory response of mrigal, *cirrhinus mrigala* (hamilton) to experimental infection of *aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 207(3), 225-238.

Soltani, M., Sheikhzadeh, N., Ebrahimzadeh-Mousavi, H. ve Zargar, A. (2010). Effects of *zataria multiflora* essential oil on innate immune responses of common carp (*cyprinus carpio*). *Journal of Fisheries and Aquatic science*, 5(3), 191-199.

Sökmen, M., Serkedjieva, J., Daferera, D., Gulluce, M., Polissiou, M., Tepe, B. ve ark. (2004). *In vitro* antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *origanum acutidens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3309-3312.

Sönmez, A.Y., Bilen, S., Alak, G., Hisar, O., Yanık, T. ve Biswas, G. (2015). Growth performance and antioxidant enzyme activities in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) juveniles fed diets supplemented with sage, mint and thyme oils. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(1), 165-175.

Srihari, T., Sengottuvelan, M. ve Nalini, N. (2008). Dose-dependent effect of oregano (*origanum vulgare* l.) on lipid peroxidation and antioxidant status in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(6), 787-794.

Streit, B. (2013). *Fish ecotoxicology*. Birkhäuser Basel.

Studnicka, M., Siwicki, A. ve Ryka, B. (1986). Lysozyme level in carp (*cyprinus-carpio* l). *Bamidgeh*, 38(1), 22-25.

Subasinghe, R. (2009). Disease control in aquaculture and the responsible use of veterinary drugs and vaccines: The issues, prospects and challenges. *Options Méditerranéennes*, 86, 5-11.

Svendsen, Y. S., Dalmo, R. A., ve Bøgwald, J. (1999). Tissue localization of *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following experimental challenge. *Journal of fish diseases*, 22(2), 125-131.

Symons, M. ve Gutteridge, J. (1998). *Superoxide, peroxides, and iron in biological systems in: Free radicals and iron*. University Press, Oxford.

Şahan, A. ve Duman, S. (2010). Effect of β glucan on haematology of common carp (*cyprinus carpio*) infected by ectoparasites. *Mediterranean Aquaculture Journal*, 1(1), 1-7.

Şarer, E., Pançalı, S. ve Yıldız, S. (1996). *Origanum minutiflorum* o. Schwarz et p.H. Davis uçucu yağının bileşimi ve antimikrobiyal aktivitesi. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 25(1), 29-38.

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N.R. ve ark. (2013). Chemical composition and bioactivity of different oregano (*origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(11), 2707-2714.

Tognolini, M., Barocelli, E., Ballabeni, V., Bruni, R., Bianchi, A., Chiavarini, M. ve ark. (2006). Comparative screening of plant essential oils: Phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Sciences*, 78(13), 1419-1432.

Tort, L., Balasch, J. ve Mackenzie, S. (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Immunología*, 22(3), 277-286.

Trenzado, C., Hidalgo, M.C., Garcia-Gallego, M., Morales, A.E., Furne, M., Domezain, A. ve ark. (2006). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *acipenser naccarii* and trout *oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture*, 254(1-4), 758-767.

Keleştemur, G. (2011). Balıklarda antioksidan savunma ve oksidatif stres. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 4(1), 69-73.

Turner, R.J. (1994). *Immunology: A comparative approach*. John Wiley & Sons Ltd.

Urso, M.L. ve Clarkson, P.M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189(1), 41-54.

Volpatti, D., Chiara, B., Francesca, T. ve Marco, G. (2013). Growth parameters, innate immune response and resistance to *listonella (vibrio) anguillarum* of *dicentrarchus labrax* fed carvacrol supplemented diets. *Aquaculture Research*, 45(1), 31-44.

Walter, B. ve Bilkei, G. (2004). Immunostimulatory effect of dietary oregano etheric oils on lymphocytes from growth-retarded, low-weight growing-finishing pigs and productivity. *Tijdschrift voor diergeneeskunde*, 129(6), 178-181.

Wanasundara, U.N. ve Shahidi, F. (1994). Canola extract as an alternative natural antioxidant for canola oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(8), 817-822.

Yeh, C. T., ve Yen, G. C. (2006). Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. *The Journal of nutrition*, 136(1), 11-15.

Yıldız, H.Y. ve Pulatsü, S. (1999). Evaluation of the secondary stress response in healthy Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) after treatment with a mixture of formalin, malachite green and methylene blue. *Aquaculture Research*, 30(5), 379-383.

Yılmaz, E. ve Ergün, S. (2015). Influence of carvacrol on the growth performance, hematological, non-specific immune and serum biochemistry parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food and Nutrition Sciences*, 6(05), 523.

Yin, G., Jeney, G., Racz, T., Xu, P., Jun, X. ve Jeney, Z. (2006). Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 253(1-4), 39-47.

Yoshino, K., Higashi, N. ve Koga, K. (2006). Antioxidant and anti-inflammatory activities of oregano extract. *Journal of Health Science*, 52(2), 169-173.

Yousif, A., Albright, L. ve Evelyn, T. (1994). *In vitro* evidence for the antibacterial role of lysozyme in salmonid eggs. *Diseases of Aquatic Organisms*, 19(1), 15-19.

Zeng, Y. (2011). *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Salmoniformes, Salmonidae), a newly introduced fish recorded in natural freshwaters of Jiuzhaigou Valley, Sichuan, China. *Animal Biology & Animal Husbandry*, 3(2).

Zhang, H.J., Fang, Q., Zhang, Z.G., Wang, Y.C. ve Zheng, X.B. (2009). The role of respiratory burst oxidase homologues in elicitor-induced stomatal closure and hypersensitive response in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Experimental Botany*, 60(11), 3109-3122.

Zheng, W. ve Wang, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165-5170.

Zheng, Z., Tan, J.Y., Liu, H., Zhou, X., Xiang, X. ve Wang, K. (2009). Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 292(3), 214-218.

Zhou, Z., Ding, Z., ve Huiyuan, L. V. (2007). Effects of Dietary Short-chain Fructooligosaccharides on Intestinal Microflora, Survival, and Growth Performance of Juvenile White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38(2), 296-301.

Zhu, Y., Chen, Y., Liu, Y., Yang, H., Liang, G. ve Tian, L. (2012). Effect of dietary selenium level on growth performance, body composition and hepatic glutathione peroxidase activities of largemouth bass *Micropterus salmoides*. *Aquaculture Research*, 43(11), 1660-1668.

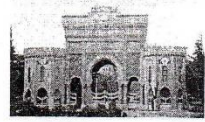
Zuo, X. ve Woo, P. (1997). *In vivo* neutralization of *Cryptobia salmositica* metalloprotease by α 2-macroglobulin in the blood of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and in brook charr *Salvelinus fontinalis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29(1), 67-72.

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2013/ 89

29 / 07 / 2013

Sayın: Prof. Dr. Oya ÜSTÜNER
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Karar No :2013/89

Başvuru :19.07.2013

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen Araştırma Görevlisi Ataman Bilge SARI'ya ait "Gökkuşağı alabalıklarında Origanum Minutiflorum O.Schwarz & P.H.Davis Bitki Türevinin Antioksidan ve Nonspesifik İmmun Üzerine Etkileri" isimli projenin Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Balık
	Cinsiyeti	Dişi/Erkek
	Sayısı	150
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi		01 Eylül 2013/01Eylül 2014

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYЕК Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
İÜ HADYЕК Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Pınar YAMANTÜRK ÇELİK
Üye

Prof.Dr.Ufuk ÇAKATAY
Üye

Doç.Dr.Alper OKYAR
Üye

Yard.Doç.Dr.Altan ARMUTAK
Üye

Uzm.Vet.Hek.Fatma TEKELİ
Üye

Yard.Doç.Dr.Burak OLGUN
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye