

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

**BALIK SEPSİS MODELİNDE *Echinacea purpurea* ÖZÜ
ETKİSİNİN NBT, MPO, LİZOZİM TESTİNİN KULLANILARAK
ARAŞTIRILMASI**

Mabrouka Alfazzani Egrabi JIRA

**Danışman
Jüri Üyesi
Jüri Üyesi**

**Doç. Dr. Bayram KIRAN
Yrd. Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU
Yrd. Doç. Dr. Aytaç GÜDER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GENETİK VE BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI**

KASTAMONU – 2016

TEZ ONAYI

Mabrouka Alfazzani Egrabi JIRA tarafından hazırlanan “Balık Sepsis Modelinde *Echinacea Purpurea* Özü Etkisinin NBT, MPO, Lizozim Testinin Kullanılarak Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde savunulmuş ve oy birliği ile Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Doç. Dr. Bayram KIRAN Kastamonu Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Yrd. Doç. Dr. Yasemin ÇELİK ALTUNOĞLU Kastamonu Üniversitesi	
Jüri Üyesi	Yrd. Doç. Dr. Aytaç GÜDER Giresun Üniversitesi	

7/11/2016

Enstitü Müdür V. Prof. Dr. Temel SARIYILDIZ



TAAHHÜTNAME

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildirir ve taahhüt ederim.

İmza

Mabrouka Alfazzani Egrabi JIRA



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BALIK SEPSİS MODELİNDE *Echinacea purpurea* ÖZÜ ETKİSİNİN NBT, MPO, LİZOZİM TESTİNİN KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI

Mabrouka Alfazzani Egrabi JIRA

Kastamonu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Bayram KIRAN

ÖZET: Bu çalışma NBT, MPO ve lizozim testi kullanılarak balık sepsis modelinde bir *Echinacea purpurea* özü etkilerinin araştırılmasıdır.

Sepsis akut hayatı tehdit eden klinik bir durumdur ve yoğun bakım ünitelerinde ölüm ana nedeni olmaya devam ettiği bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı, septik balığın sepsisin erken ve son aşamasında iken, *Ekinezya purpurea* (*E. purpurea* ekstresi) metanolik ekstraktlarının kısa süreli uygulamalarının bağışıklık sistemini uyarıcı etkilerini araştırmaktır. Sepsis modeli, ilk 7 gününde ve deney II yedinci günde sazan balığının bir türü olan *Cyprinus carpio*’a intraperitoneal olarak anaerobik gram negatif bakteri (*Aeromonas hydrophila*) enjekte edilerek oluşturulmuştur. Özler iki farklı konsantrasyonda (24 mg, 36 mg) oral Deney I ve Deney II, 18 gün boyunca sazan balığının *Cyprinus carpio* türüne (4,54 ± 0.1 g) uygulanarak çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılan doz, düşük dozda (24 mg) olarak seçilmiştir. Bu dozda *Echinacea purpurea*’nın önemli ölçüde, solunum patlaması, miyeloperoksidaz ve lysozyme gibi spesifik olmayan bağışıklık parametrelerinin artışına neden olduğu bildirilmektedir.

Anahtar Kelimeler: NBT, MPO, lizozim, *Ekinezya purpurea*, Sepsis, Bağışıklık uyarıcısı, *Aeromonas hydrophila*, *Cyprinus carpio*.

2016, 72 sayfa

Bilim Kodu: 923

ABSTRACT

MSc. Thesis

THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF *Echinacea purpurea* EXTRACT ON FISH SEPSIS MODEL USING NBT, MPO AND LYSOZYM TEST

Mabrouka Alfazzani Egrabi JIRA

Kastamonu University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Genetic and Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bayram KIRAN

This study to investigate of the effects of an *E. purpurea* extract on the fish sepsis model using NBT, MPO and lysozym test.

Sepsis is an acute life-threatening clinical condition and remains as the main reason of death in intensive care units. The aim of the study is to investigate the immunostimulant effects of the methanolic extracts of short term administration of *E. purpurea* (extract of *E. purpurea*) on the septic fish in the early and at the end stage of sepsis. Sepsis was caused by *Aeromonas hydrophila* that has been injected intraperitoneally in *Cyprinus carpio* on the first day of deney I and in the seventh day of deney II. Two different concentrations of extracts (24 mg and 36 mg) were orally administered to *Cyprinus carpio* ($4,54 \pm 0.1$ g) for one week in the deney I and for 18 days in the deney II. In this study, we report that *E. purpurea* at low dose (24 mg) significantly increased some non-specific immune parameters such as respiratory burst, myeloperoxidase, and lysozyme.

Key Words: NBT, MPO, Lysozym, *E. purpurea*, Sepsis, immunostimulant, *Aeromonas hydrophila*, *Cyprinus Carpio*.

2016, 72 pages

Science Code: 923

TEŞEKKÜR

Danışmanım Doç. Dr. Bayram KIRAN’a araştırma projesi süresince yapmış olduğu danışmanlık, rehberlik ve içten yol göstericiliği ve verdiği çok değerli tavsiyeler için ve ayrıca bir araştırmacı bilim insanı olma yönünde gelişimime olanak sağladığı için özel olarak minnettarlığımı ifade etmek istiyorum.

Çalışma boyunca sağladıkları destek, teşvik ve gösterdikleri sabır için aileme ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum. Yrd. Doç. Dr. Soner Bilen’e ayrıca teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmalarım için burs desteği sağlayan ülkem Libya’ya ve sağladığı eğitim imkânı için Kastamonu Üniversitesi’ne minnettarlığımı ifade etmek istiyorum.

Arkadaşlarım Eman ve Jamea’ya özel olarak teşekkürlerimi sunuyorum.

Mabrouka Alfazzani Egrabi JIRA

Kastamonu, Kasım, 2016

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TAAHHÜTNAME	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
GRAFİK DİZİNİ	x
FOTOĞRAF DİZİNİ	xi
TABLO DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Sazan Balığı (<i>Cyprinus carpio</i>)	3
1.2. <i>Ekinezya</i>	5
1.2.1. Tıbbi Türler.....	7
1.2.2 Botanik Ailesi	7
1.2.3. Uygulama Şekli ve Dozaj	7
1.2.4. <i>Ekinezya</i> 'nın Kimyasal Bileşenleri	8
1.2.4.1. Fenollü Bileşikler	9
1.2.4.2. Terpenoit Bileşikler	9
1.2.4.3. Lipit Bileşikler	9
1.2.4.4. Azotlu Bileşikler	10
1.2.4.5. Karbonhidrat	11
1.2.5. Yan Etkiler ve Alınacak Tedbirler.	12
2. TEORİK ÇERÇEVE.....	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	14
3.1. Deney Balığı.....	14
3.2. Deney Tasarımı.....	15
3.2.1. Deney 1.....	15
3.2.2. Deney 2.....	16
3.3. <i>Echinacea purpurea</i> Ekstratlarının Hazırlanması.	18
3.4. Bakteryal Dozun Hazırlanması.....	21

3.4.1. Triptik soya buyyon Hazırlanması.....	21
3.4.2. Triptik soya Agar Hazırlanması.....	22
3.4.3. Bakteri Kültürü ve Bakteri Uyarım Deneyleri.....	24
3.5. Numune Toplama	26
3.6. Ayıraçların Hazırlanması.	29
3.6.1. NBT Stok Solüsyonunun Hazırlanması.....	29
3.6.2. Fosfat Tamponlu Tuzlu Suyun Hazırlanması.	30
3.6.3. Lizozim Stok Solüsyonunun hazırlanması.....	30
3.6.4. Miyeloperoksidaz Stok Solüsyonunun hazırlanması.....	31
3.7. Metod ve Yöntem.	31
3.7.1. Nitroblue tetrazolium (NBT) İndirgeme Ölçümü.	31
3.7.2. Lizozim Aktivite Ölçümü.....	32
3.7.3. Miyeloperoksidaz Aktivite Ölçümü.	34
4. BULGULAR	35
4.1. Deney –I	35
4.1.1. Lizozim Aktivitesi.....	35
4.1.2 Solunumsal Patlama Aktivitesi.....	38
4.1.3. Miyeloperoksidoz Aktivite	40
4.2. Deney –II	42
4.2.1. Lizozim Aktivitesi	42
4.2.2. Solunumsal Patlama Deneyi	44
4.2.3. Miyeloperoksidaz Aktivite	46
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇ	52
7. KAYNAKLAR	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<i>E. purpurea</i>	<i>Echinacea purpurea</i>
NBT	Nitroblue tetrazolium
MPO	Miyeloperoksidaz



GRAFİK DİZİNİ

	Sayfa
Grafik 4.1. 7 gün süreyle Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi ile beslenen Sazan Balıklarının Lizozim Aktivitesi.....	36
Grafik 4.2. 7 gün süreyle 24 mg E.P ile beslenen Sazan Balıklarının Lizozim Aktivitesi.....	36
Grafik 4.3. 7 gün süreyle 36 mg E.P ile beslenen Sazan Balıklarının Lizozim Aktivitesi	37
Grafik 4.4. 7 gün süreyle Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi ile beslenen Sazan Balıklarının NBT Aktivitesi.....	39
Grafik 4.5. 7 gün süreyle 24 mg E.P ile beslenen Sazan Balıklarının NBT Aktivitesi.....	39
Grafik 4.6. 7 gün süreyle 36 mg E.P ile beslenen Sazan Balıklarının NBT Aktivitesi.....	39
Grafik 4.7. 7 gün süreyle Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi ile beslenen Sazan Balıklarının Miyeloperoksidaz (MPO) içeriği.	41
Grafik 4.8. 7 gün süreyle 24 mg E.P ile beslenen Sazan Balıklarının Miyeloperoksidaz (MPO) içeriği.....	41
Grafik 4.9. 7 gün süreyle 36 mg E.P ile beslenen Sazan Balıklarının Miyeloperoksidaz (MPO) içeriği.....	41
Grafik 4.10. 18 gün süreyle Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi ile beslenen Sazan Balıklarının Lizozim Aktivitesi.....	43
Grafik 4.11. 18 gün süreyle 24 mg E.P ile beslenen Sazan Balıklarının Lizozim Aktivitesi	43
Grafik 4.12. 18 gün süreyle 36 mg E.P ile beslenen Sazan Balıklarının Lizozim Aktivitesi	43
Grafik 4.13. 18 gün süreyle Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi ile beslenen Sazan Balıklarının NBT Aktivitesi.....	45
Grafik 4.14. 18 gün süreyle 24 mg E.P ile beslenen Sazan Balıklarının NBT Aktivitesi.....	45
Grafik 4.15. 18 gün süreyle 36 mg E.P ile beslenen Sazan Balıklarının NBT Aktivitesi.....	45
Grafik 4.16. 18 gün süreyle Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS) ile beslenen Sazan Balıklarının Miyeloperoksidaz (MPO) içeriği.....	47
Grafik 4.17. 18 gün süreyle 24 mg E.P ile beslenen Sazan Balıklarının Miyeloperoksidaz (MPO) içeriği.....	47
Grafik 4.18. 18 gün süreyle 36 mg E.P ile beslenen Sazan Balıklarının Miyeloperoksidaz (MPO) içeriği.....	47

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

	Sayfa
Fotoğraf 1.1. Sazan Balığı (<i>Cyprinus carpio</i>)	3
Fotoğraf 1.2. <i>Ekinezya</i>	6
Fotoğraf 3.1. Üç ayrı gruba rastgele balıkların dağıtılması	14
Fotoğraf 3.2. 200 litrelik akvaryuma balıkların doldurulması	14
Fotoğraf 3.3. <i>A. hydrophila</i> ile aşılama öncesinde Anestezi altındaki balıklar..	15
Fotoğraf 3.4. Patojen bakteri <i>A. hydrophila</i> 'nın balıklara enjekte edilmesi	15
Fotoğraf 3.5. Tek kullanımlık Esnek PTFE Besleme İğnesi.....	16
Fotoğraf 3.6. Balığın Ağzına Besleme İğnesinin Sokulması	17
Fotoğraf 3.7. Septisemik lezyonlardan muzdarip Doğal olarak enfekte olmuş sazan balığı.....	17
Fotoğraf 3.8. Filtre kağıdı kullanarak Filtrasyon.....	18
Fotoğraf 3.9. Büchner Hunisi kullanılarak oluşturulan Filtrasyon Düzeneği	19
Fotoğraf 3.10. Döner Buharlaştırıcı.....	19
Fotoğraf 3.11. Ekstraksiyon son Ürünü	20
Fotoğraf 3.12. Bitki ekstrakt dozlarının Hazırlanması	20
Fotoğraf 3.13. Triptik soya buyyon tozunun istenen ağırlıklarda Hazırlanması	21
Fotoğraf 3.14. Triptik soya buyyonun Hazırlanması.....	21
Fotoğraf 3.15. Triptik soya Agar tozunun istenen ağırlıklarda Hazırlanması....	22
Fotoğraf 3.16. Triptik Soya Agar'ın Hazırlanması.....	22
Fotoğraf 3.17. Triptik Soya Agar'ın Otoklavlanması	23
Fotoğraf 3.18. Tripton Soya Agar'ın petri kutularına boşaltılması.....	23
Fotoğraf 3.19. Çizgili <i>A. hydrophila</i> 'nın tripton Soya Agar petri kutularına dökülmesi	24
Fotoğraf 3.20. Tripton soya buyyon içine Bakterilerin Ekimi	25
Fotoğraf 3.21. 0,5 McFarland çözeltisine eklenen 1×10^8 CFU ml-1 içeren inoklum	25
Fotoğraf 3.22. <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın Stok Kültürü	26
Fotoğraf 3.23. Balığın kesilmesi ve Vent Bölümünün Açılması.....	27
Fotoğraf 3.24. Numunelerin Hazırlanması.....	28
Fotoğraf 3.25. NBT Ölçümü için Hücre Peletinin Hazırlanması	28
Fotoğraf 3.26. NBT Stok Solüsyonunun hazırlanması	29
Fotoğraf 3.27. Fosfat tamponlu tuzlu suyun hazırlanması	29
Fotoğraf 3.28. Lizozim Stok Solüsyonunun hazırlanması	30
Fotoğraf 3.29. TMB Hapı.....	30
Fotoğraf 3.30. Nitroblue tetrazolium (NBT) indirgeme Ölçümü	31
Fotoğraf 3.31. Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Mikro plaka okuyucu Spektrometre	32
Fotoğraf 3.32. Lizozim Aktivite Ölçümü.....	33
Fotoğraf 3.33. Miyeloperoksidaz Aktivite Ölçümü.....	34

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 4.1. <i>A. hydrophila</i> ile immune edilmiş sazan Balıklarının baş-böbrek lökositlerinde Lizozim Aktivitesi	36
Tablo 4.2. <i>A. hydrophila</i> ile immune edilmiş sazan Balıklarının baş-böbrek lökositlerinde Solunumsal Patlama Aktivitesi.....	38
Tablo 4.3. <i>A. hydrophila</i> ile immune edilmiş sazan Balıklarının baş-böbrek lökositlerinde Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi	40
Tablo 4.4. <i>A. hydrophila</i> ile immune edilmiş sazan Balıklarının baş-böbrek lökositlerinde Lizozim Aktivitesi	42
Tablo 4.5. <i>A. hydrophila</i> ile immune edilmiş sazan Balıklarının baş-böbrek lökositlerinde Solunumsal Patlama Aktivitesi.....	44
Tablo 4.6. <i>A. hydrophila</i> ile immune edilmiş sazan Balıklarının baş-böbrek lökositlerinde Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi	46

1. GİRİŞ

Enfeksiyona cevaben patolojik, fizyolojik ve biyokimyasal anormallikler sendromu olan Sepsis, 2011 yılında bütün Amerikan hastanelerinin % 5.2'den fazlasının masrafına karşılık gelen büyük bir halk sağlığı meselesiydi. Kayıtlı sepsis vakaları, yaşlanan nüfusu daha iyi tanıma, ek hastalıklar ve bazı ülkelerde geri ödemeye uygun kodlamayı muhtemelen yansıtır şekilde, giderek büyümektedir. Gerçek durum bilinmese de, ihtiyatlı tahminler sepsisin dünya çapında yoğun bakım ünitelerindeki kritik hastalıklar ve ölümlerin önde gelen sebebi olduğunu göstermektedir (Hotchkiss ve Karl, 2003). Ayrıca, sepsis hastalarının sıklıkla sosyal gereksinim ve önemli sağlık hizmetleri gerektiren psikolojik, uzun süreli fiziksel ve zihinsel sakatlıkları olduğuna dair artan bir farkındalık vardır (Singer vd, 2016).

Sepsisin patofizyolojisiyle ilgili daha iyi bir anlayış göstermiştir ki, mikroplar kendileri çoklu organ bozulmalarına sebep olmamaktadır, ancak enfeksiyon altta yatan ana reaksiyonlara öncülük etmektedir (Loisa, 2008) ve bu da şu anda kontrol edilemez aşırı bir iltihap ve bir yangısal yanıtı katkı sağlayan bozulmuş fibrinolizle birlikte pıhtılaşma yoluyla özdengede bozulmaya sebep olmaktadır (Cihan, Yarat, Tunalı Akbay, ve Sener, 2015). Organ işlev bozukluğu septik şoka ilerleyebilecek ciddi bir sepsis olarak adlandırılmaktadır. Sepsisin ana klinik belirtileri, çoklu organ işlev bozukluklarına ve sonunda ölüme götürebilecek ateş, yüksek tansiyon, vasoplegia ve nötrofil filtrelemedir (Rattmann vd, 2012).

Sepsis, karın, idrar yolu, akciğer, deri ya da yumuşak doku gibi vücudun herhangi bir yerinde herhangi bir tür enfeksiyon sonucunda oluşabilir. Her ne kadar parazitler, mantar ve virüsler sepsise neden olsa da, sepsisin gelişmesiyle çoğunlukla ilişkilendirilen patojenler bakterilerdir. Sepsisin patofizyolojisi hem gram-pozitif (peptidoglikan, lipoteichoic asit), hem de gram-negatif organizmaların (lipopolisakkarit, endotoksin, lipid A) dış zar bileşenlerince başlatılmaktadır. Bu dış zar bileşenleri, CD14 alıcılarını monositlerin yüzeyinde birleştirme yeteneğine sahiptir. Son zamanlarda tanımlanan toll benzeri reseptörler sonucunda, bir sinyal tümör nekroz faktör alfa ve proinflamatuvar sitokin interlekin-1 (IL-1) 'in en son

üretimine yol açarak, sonradan hücreye aktarılmaktadır,. Bu sitokinlerin dokular üzerinde doğrudan zehirli etkisi vardır (Cihan vd, 2015).

Aeromonas hydrophila, insan enfeksiyonları ile ilişkili olan en yaygın izole edilmiş türdür. *Hydrophila*, bakteremi, enterokolit, yumuşak doku enfeksiyonları ve menenjitte sebep olabilen bir gram-negatif, oksidaz pozitif bir basildir, ki bu da yagın bir tatlı su ve gıda kaynaklı bir patojendir. Bu bakteriler yaygın olarak tatlı ve tuzlu suda yayılmaktadır ve ayrıca yiyeceklerde, arıtılmış içme suyunda, hastane su rezerv sistemlerinde ve musluk suyu rezervinde bulunmaktadır. Tipik olarak hastalar *Aeromonas* türünü ağızdan tüketim veya kirli su ve deniz ürünü ile direk temas yoluyla almaktadırlar. Bu yüzden, mide bağırsak iltihabı ve hafif orta dereceli yumuşak doku enfeksiyonları en yaygın görünen rahatsızlıklardır (Kanne, Lakshmi, ve Dakshinamurthy, 2013).

Patolojik süreçlerin karmaşıklığı, iyice tanımlanmış teşhis belirtilerinin eksikliği, etkilenmiş popülasyonun heterojenliği ve metodolojik ve etik doğanın kısıtlamalarından dolayı, insanlarda sepsisin araştırılması zordur. Yukarıdaki zorluklar göz önüne alınarak, değerli ve düşük maliyetli araştırma aletleri olan hayvanlardaki sepsis modelleri üretilmiştir. Hastalığın mekanizmasını yorumlamak ve tedavi edici etkileşimin kapasite ve özel yaklaşımlarının bir taslağını çıkartmak için eşsiz bir olanak sağlarlar (Popov ve Pavlov, 2013). Ayrıca hayvan modellerinin kullanılması, araştırmacılara insanlarda uygulanmasının uygun olmadığı selüler ve moleküler teknikleri birleştirerek çalışmalarını ayrıntılı bir şekilde tamamlama olanağı sağlar. Her ne kadar hayvan modelleri klinik sepsislerin çevirisi ile ilgili olarak deneysel verinin geçerliliği konusunda eleştiriye maruz kalmışsa da, yine de sepsisin patofizyolojisi üzerinde çalışmak için en iyi kaynaklardan biridir. Bu bağlamda balık, bağışıklık sistemine farklı görüşler getiren avantajlı karakteriyle özgün bir hayvan modeli olarak kullanılmaktadır.

Son zamanlarda balıklar, bağışıklık bilimi, kanser araştırmaları, endokrinoloji, nörobiyoloji, su zehir bilimi ve gelişim biyolojisi alanlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Deneysel hayvanlar olarak balıkların pek çok avantajı vardır. Bu avantajlar arasında şunlar sayılabilir; türler arasında büyük bir çeşitlilik

bulunmaktadır, yüksek oranda doğurgandırlar ve pek çok durumda dış dölleme ile büyük yumurtaları olur. Şu anda balıklar sayı olarak laboratuvar hayvan grupları içinde üçüncüdürler.

1.1. Sazan Balığı (*Cyprinus carpio*)

Sazangiller, yaklaşık olarak 3000 türden oluşan en çeşitli tatlı su balığı grubudur. Güney Amerika hariç diğer tüm kıtalar boyunca kültürlenmiştir. Sazan türü dünya balık üretiminin %70'ine tekabül etmektedir. Su kültürü içinde saygın bir duruş sergilemesinin yanı sıra, sazanlar aynı zamanda önemli bir laboratuvar hayvanı modelidir. Temel araştırma ve biyolojik taylorlerde (çoğunlukla zehirlilik testlerinde) sazanlar tüm çalışmaların en az %25'inde kullanılırlar. Sazan balığı (*Cyprinus carpio*), sazanlar arasında en sık kullanılanıdır (Fotoğraf 1.1.) (Bongers, Sukkel, Gort, Komen, ve Richter, 1998).



Fotoğraf 1.1. Sazan Balığı (*Cyprinus carpio*)

Hayvanlarda (omurgalı ve omurgasız) ve bitkilerde, onları çeşitli mikroorganizmalardan korumak için bağışıklık sistemi mevcuttur. Bağışıklık ikiye ayrılmaktadır: spesifik olmayan ve hızlı tepkimeli savunma mekanizması olan, fiziksel parametre, hücresel ve humöral faktörler içeren doğal (doğuştan) bağışıklık ve hafıza oluşumu ile nitelendirilmiş yüksek özgünlük ve farklı sistemli uyarlayıcı bağışıklık. (Przybylska, 2012). Balık ve memeli türleri, bağışıklık tepkisinin humöral, hücre aracılı ve spesifik olmayan yönlerinde önemli olan bir takım fonksiyonel ve yapısal nitelikler paylaşırlar. Balıklarda spesifik olmayan bağışıklık tepkileri yabancı organizmalar tarafından yapılan hasar ve/veya istilalara karşı genel tepkilerdir. Diğer memeli emsallerinde olduğu gibi fagositoz ve iltihap genellikle

balıklarda görülen iki spesifik olmayan tepkimedir. Makrofajlar ve spesifik olmayan sitotoksik hücreler (NCC) ile birlikte nötrofiller, balıklarda spesifik olmayan bağışıklık tepkimelerini gerçekleştirmekle ilişkilendirilen esas hücre türleridir. Akyuvar tepkimeleri, balık serumunda bulunan, lizozom, komplement, transferin, interferon, C-reaktif protein, hemaglutinin ve çeşitli doğal hemolizinler içeren çeşitli spesifik olmayan faktörlerce desteklenmekte ve/veya çoğaltılmaktadır (Skouras, 2002).

Sepsis iltihaplı bir sendrom olduğu için, biz doğal bağışıklık tepkime yönlerini hesaba katmaktayız. Balık fagositleri solunumsal patlamalar (RBs) sırasında çeşitli tepkisel oksijen türleri (ROS) üretirler. Mantar ve bakteriler lökositler tarafından bir kere yutulduğu zaman, konakçının NADPH-oksidazı aktive edilir, o da sıra ile oksijen tüketimini artırır ve ardından hidrojen peroksit, süperoksit anyonlar, singlet oksijen ve hidroksil radikaller gibi ROS üretir. Süperoksit anyonların bu salınımı RB olarak bilinmektedir ve türevleri bakterisidaldir. Şiddetli ve kronik stresler sürecince balıkların hastalıklara yakalanmaya elverişli olmasının ana sorumlularından biri gezici lökositlerin hem sayısı hem de bileşimindeki farklılıklardır. Stres aynı zamanda dalak, baş - böbrekler (HKs) ve plazma lökositlerinin fagositik ve/veya RB aktivitelerini de etkilemektedir (Velmurugan, Jiang, Shih, ve Lee, 2013).

Her ne kadar sepsisin sebebi ve teşhisi üzerinde büyük ilerlemeler kaydedilmiş olsa da, tatmin edici bir tedavi ortaya çıkmamıştır. Dolayısıyla, sepsisin iyileştirilmesi veya hafifletilmesi için etkili bir tedavi bulmak acil ve kaçınılmazdır. Geleneksel tıpta insanlar ve hayvanlardaki pek çok hastalığı iyileştirmek ve önlemek için bitkiler kullanılmıştır. İnsanlar için bitkisel tıpta bitki özlerini kullanmak olan Fitoterapi (bitkisel tedavi), binlerce yıldır bilinmektedir. Hindistan, Çin, SEA gibi bazı ülkeler ve Güney ve Orta Amerika'daki bazı ülkelerde fitoterapi yaygın olarak görülürken, Batı tıbbında ise natüropati ve bitkisel tedavi daha fazla kabul görmüştür. Değişik tıbbi bitkiler ve otlar ve/veya onların karışımlarının mantar önleyici, antibakteriyel, fizyolojik sistemleri destekleyici (sindirim sistemi, bağışıklık sistemi), hormon dengeleyici gibi özellikleri ve pek çok diğer özelliği olduğu bilinmektedir (Kolkovski, ve Kolkovski, 2011).

Modern tıpta olası kullanımı önerildiğinden beri bitkisel immunostimülanı tanımlamak için artan bir ilgi vardır. (Tiwari, Rastogi, Singh, Saraf, ve Vyas, 2004). İmmunostimülan, savunma mekanizmalarını ya da bağışıklık tepkimelerini (hem spesifik olan, hem de spesifik olmayan) artıran, böylece hayvanları hastalıklara ve harici saldırılara karşı daha dirençli hale getiren bir maddedir. (Reverter, Bontemps, Lecchini, Banaigs, ve Sasal, 2014). Küresel olarak popüler bir bitkisel ilaç olan *echinacea purpurea*, insanlarda ve hayvanlarda değişik hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır. Ancak, bir septisemik modeli olarak balıklar üzerindeki etkisi hakkında çok az rapor vardır. Bu çalışmada, challenge enfeksiyonuna bir cevap olduğu kadar *E. purpurea*'nın immünolojik parametreler üzerindeki etkilerini değerlendirmek üzere yaygın bir sazan balığı türü olan *cyprinus carpio* seçilmiştir.

1.2. *Ekinezya*

Echinacea türü Aster ailesi üyesi olan, çiçekli bir bitki türüdür. (Asteraceae or Compositae) (Fotoğraf 1.2) (Pilkington, Consortium, ve January, 2015). Yaygın bir şekilde kullanılan “*Echinacea*” ismi Yunanca bir kelime olan ve kirpi ya da denizkestanesi anlamına gelen, keskin, iğneli tohum başlarını ifade eden (echino) kelimesinden türemiştir (Goldhaber-fiebert, ve Kemper, 1999). Kuzey Amerika'nın yerlisi olan ve çok yıllık bir bitki olan *Echinacea* (Mishima vd, 2004), Delaware Kızılderilileri tarafından venüs hastalığını tedavi etmek için ve Plains Kızılderilileri tarafından da solunum enfeksiyonları ve ateşi tedavi etmek için kullanılmıştır. Ezilmiş bitkinin tamamından yapılan hamur, lenf bezlerinin, yanıkların, arı sokmasının ve yılan ısırıklarının şişmesini tedavi etmek için bölgesel olarak kullanılmıştır. Diş ağrıları, boğaz ağrıları ve dişeti ağrılarını tedavi etmek için bitkinin kökleri çiğnenmiş ya da suyu içilmiştir. Avrupalı sömürgeciler kısa zamanda *Echinacea* kullanmaya başlamışlar ve bu değerli bitkiyi Avrupa pazarlarına göndermişlerdir.



Fotoğraf 1.2. *Ekinezya*

1800’lerde *Echinacea angustifolia* anti-enfektif ajan ve çok amaçlı kan temizleyici olarak kullanıldı. Menenjit, kızıl hastalığı, çiçek hastalığı ve difterinin tedavisinde kullanıldı. 1800’lerin sonlarında "*E. angustifolia*" Amerika’da en yaygın kullanılan bitki tedavisiydi (Goldhaber-fiebert, ve Kemper, 1999; Kumar ve Ramaiah, 2011). Son zamanlarda bilimsel çalışmalar ve anektodsalları başarıları *Echinacea*’yı Amerikan bitkisel satış zirvesine geri çıkarmıştır. Bugünlerde öncelikli olarak solunum enfeksiyonları (URTI)’nı tedavi etmek ve daha ileri gitmesini önlemek amacıyla ve nonspesifik bir immunostimulan olarak, ancak bazen de idrar yolu enfeksiyonları, kulak enfeksiyonları, maya mantarlarının sebep olduğu enfeksiyon, sivilce, çıban, bademcik iltihabı, prostat iltihabı ve faranjiti önlemek ya da tedavi etmek için tamamlayıcı ya da birincil tedavi olarak kullanılmaktadır. Küçük yaralar, yanıklar, egzama, uçuk, sedef hastalığı ve diğer dermatolojik durumların iyileştirilmesini artırmak için topical bir hazırlık olarak daha az yaygın kullanılmaktadır. Ayrıca pek çok kozmetik ve diş ürününde bulunmaktadır (Mistríková ve Vavrková, 2006). Farmakolojik araştırmalar, *E. purpurea*’nın aktif bileşenlerinin hücrel oksidatif durumu, antibakteriyel aktiviteleri ve iltihaplanma önleyici vb.’ni geliştirebilecek olan fagositozu desteklemenin yanı sıra akyuvar aktivitesini geliştirmek için T hücrelerini uyarabildiğini göstermiştir (Matthias, Banbury, Bone, Leach ve Lehmann, 2008).

1.2.1. Tıbbi Türler

Günümüzde Echinacea türünün kapsamına giren dokuz değişik türden üç tanesi tıbbi olarak kullanılmaktadır: *E. purpurea* (mor koniçiçeği), *Echinacea angustifolia* (dar yapraklı mor koniçiçeği), and *E. pallida* (soluk mor koniçiçeği) (Pilkington vd, 2015), ancak diğer altı Echinacea türü de tanımlanmıştır ve ikisi nesli tükenmekte olan türler listesindedir. Çeşitli türler sıklıkla yanlış tanımlanmıştır. 1955 yılında *E. angustifolia* *E. pallida*'nın bir çeşidi olarak sınıflandırılmıştır (Goldhaber-fiebert ve Kemper, 1999). Halen *E. purpurea* (L.) isminin genel olarak yanlış bir biçimde kullanıldığına dair bir görüş vardır ve türle ilgili iki alt cins ve dört tür içeren bir taksonomik düzeltme önerilmiştir: *E. atrorubens*, *E. pallida*, *E. purpurea* and *E. laevigata*, ile *E. angustifolia* ve *E. pallida* var *angustifolia* olarak yeniden gözden geçirilmiş *E. pallida* (DC.) Cronq. Furthermore, *E. pallida* var *pallida* (Nutt.) Cronq (Binns, Baum ve Arnason, 2002).

1.2.2. Botanik Ailesi

Echinacea, aynı zamanda krizantem, sarı papatya ve aynısefa çiçeğini de kapsayan Asteraceae ailesindeki cinslerden biridir. Bitki tanımı: *Echinacea* bitkileri, boyu 10-60 cm'e uzanan otsul çok yıllık bitkilerdir. Gövdesi ya dallanmış dikey anakökten (*E. angustifolia*) ya da lifli köklerden (*E. purpurea*) çıkar. Compositae ailesinin üyeleri olarak her papatya benzeri baş birimi ya da çiçek, gerçekten pek çok küçük çiçeklerin bir karışımıdır. İç disk çiçekleri iğnelerde son bulur ve sonlarındaki dişlerle birlikte sarkık dış çiçekler tarafından çevrelenir. *Echinacea*, koni şeklini alan yüksek çiçek tablası ile birlikte dikenli çiçeklenmiş başlar ile diğerlerinden ayırt edilir. Disk çiçekleri yeşilden kırmızı kahveye kadar renklerde çeşitlilik gösterirken, ray çiçeklerin taç yaprağı mor, pembe ya da beyaz olabilir. *Echinacea* bitkileri elastic ve kuraklığa karşı dirençlidirler, ancak yavaş büyürler (Goldhaber-fiebert ve Kemper, 1999).

1.2.3. Uygulama Şekli ve Dozaj

Echinacea sıklıkla ağızdan alınır. *Echinacea* olarak mevcut olan ürünler, türlerine, kullanılan bitki bölümlerine ve üretimde kullanılan ekstraksiyon metoduna bağlı

olarak bileşimde çeşitlilik gösterirler. Hazırlıklar (ekstraklar ve bütün bitki ürünleri) *E. angustifolia*, *E. purpurea* ve *E. Pallida*'nın köklerinden ve toprak üstü bölümlerinden yapılmaktadır (Pilkington vd, 2015). Ağızdan verilişte *Echinacea* bitki suyu ya da çay olarak, tablet ya da kapsül şeklinde ya da tentür olarak verilebilir (Goldhaber-fiebert ve Kemper, 1999). Formülasyona bağlı olarak değişik dozlar kullanılabilir ancak bunlar genellikle grip ve soğuk algınlığının önlenmesi ya da tedavisinde kullanılmasıyla ilgilidir. Önerilen dozlar geçmiş uygulamalara dayanmaktadır. 12 yaş altındaki çocuklarda kullanımı önerilmemektedir ve 1 yaşın altındaki çocuklarda *Echinacea* tedavi için uygun değildir (kontrendike). Ayrıca küçük yüzeysel yaraların tedavisinde lokal olarak uygulanabilir. *Echinacea*'nın enjekte edilebilir ilaçları sert tepkilerle karşılaşmış ve bazı Avrupa ülkelerinde yasaklanmış, Amerika Birleşik Devletlerinde asla izin verilmemiştir. Enjekte edilebilir ilaçlar sadece araştırma çalışmalarında kullanılmaktadır (Pilkington vd, 2015).

1.2.4. *Ekinezya*'nın Kimyasal Bileşenleri

Echinacea türleri, aktivitelerine katılan çok çeşitli kimyasal elementlerden oluşmaktadır. *Echinacea*'nın temel aktif bileşikleri kafeik asit türevleri, yüksek doymamış alkamidler, poliasetilenler ve yüksek moleküler ağırlık polisakkaritleri kapsamaktadır. Kafeik asit türevleri ve biyolojik olarak daha çok kullanılabilir alkamidler, etanolik sıvı ekstraktlarında tıbbi kullanım amaçlı bulunan farmakolojik etkilerden sorumlu *Echinacea* bileşenlerindendir (Goey vd, 2013). Diğerleri ticari olarak önemli olan iki ya da daha fazla türde bulunurken, bazı bileşenler sadece bir türe özgüdür. *Echinacea* ilaçları kimyasal yapıda farklılık gösterebildiği için, tedavi edici etkililiği tutarsız olabilmektedir. *Echinacea* ilaçlarının kimyasal yapısını etkileyebilecek olan ajanlar, bitkinin hangi bölümünün kullanıldığı (çiçekler, yapraklar, kökler veya gövdeler), *Echinacea*'nın hangi türünün kullanıldığı (*E. purpurea*, *E. pallida* and *E. angustifolia*), büyüme, depolama koşulları ve kurutma ve ekstraksiyon metodlarını kapsamaktadır. Uzun süreli depolama yararlı aktif bileşenlerin kaybı ya da zarara uğramasıyla sonuçlanabileceği için, uzun süreli depolanan *Echinacea* taze hasat edilmiş hazırlanan ilaçtan muhtemelen daha az etkili olacaktır.

1.2.4.1. Fenollü Bileşikler

Fenilpropanoitler

Echinacea türlerinden rapor edilen kafeik asit glikositler, kikorik asit, 3,5-dikaffeoilkinik asit, verbaskozit ve cynarin, ekinakosit, caffeoylechinaside, caftaric, chlorogenic ve isochlorogenic asitler ve diğerlerinden oluşmaktadır (Mistriková ve Vaverková, 2006). Kafeik asit glikositlerinin değişik karışımları üç türde de bulunmaktadır. Ekinakosit, *E. pallida* ve *E. angustifolia* (Pietta, Mauri ve Bauer, 1998)'nın köklerinin ana bileşenidir, *E. purpurea*'da ise bulunmamaktadır. Ekinakositin *vitro*da hem antiviral hem de antibakteriyel etkileri vardır (Thomsen, 2012).

Flavanoidler

E. purpurea, *E. pallida* ve *E. angustifolia*'nın yapraklarında ve gövdelerinde bulunan başlıca flavanoid, Rutoside'dir. Ayrıca aşağıdaki flavanoidlerin de çeşitli şekerlerle birlikte hem aglikon hem de konjugata olarak bulunduğu rapor edilmiştir: apigenin, quercetagenin, kaempferol, kersetin, isorhamnetin, luteolin.

1.2.4.2. Terpenoit Bileşikler

Bu üç tıbbi *Echinacea* türü yapraklar, çiçekler, kökler ve diğer anten bölümlerinde yeterli yağları değişik miktarlarda içermektedir. Toplam gerekli yağ yoğunluğu türden türe büyük değişiklik göstermektedir. *E. purpurea*'daki gerekli yağ diğer bileşikler arasında bornyl acetate, caryophyllene, caryophyllene epoxide, germacrene D, borneol, and pentadeca-8-(Z)-en-2-one içermektedir.

1.2.4.3. Lipid Bileşikler

Poliasetilenler

Oldukça düşük yoğunlukta amidler içeren polienler ve poliasetilenler, *E. pallid* köklerinin başlıca lipofil bileşenleridir (Mistriková ve Vaverková, 2006). *E. pallida*

and *E. purpurea* köklerinin aklenleri, çoğunlukla alkilketon olan *E. angustifolia* 'ninkilerden belirgin bir şekilde farklıdır. Ketoalkinler içeren poliasetilenler bitkiye immunostimülatör özellikler vermektedirler (Lienert, Anklam ve Panne, 1998).

1.2.4.4. Azotlu Bileşikler

Alkilamidler

Alkilamidler, *E. purpurea* ve *E. angustifolia* köklerinin ana lipofil bileşenleridir. Alkilamid içeriği, bitki olgunlaştıkça köklerde yavaş yavaş artarak ve anten bölümlerinde azalarak *E. purpurea* 'nın yaşam döngüsünde değişiklik göstermektedir. *E. angustifolia* ve *E. purpurea* 'nın köklerindeki alkilamidler değişik yapılar içermektedir ancak anten bölümleri benzer bileşiklerden oluşmaktadır. Echinacein, *Echinacea* 'dan ayrılan ilk alkilamid ve *E. angustifolia* ve *E. pallida* 'nın köklerinde bulunan doymamış amiddir (Goldhaber-fiebert ve Kemper, 1999; Mistriková ve Vaverková, 2006).

Alkaloidler

İsotussilagine, pyrrolizidine ve tussilagine alkaloidleri *E. angustifolia* ve *E. purpurea* 'da sadece eser miktarda bulunmaktadır ve kendi benzersiz kimyasal yapılarından dolayı diğer bitkilerdeki pirolizidin alkaloidler gibi hepatotoksik olduklarına inanılmamaktadır (Goldhaber-fiebert ve Kemper, 1999).

1.2.4.5. Karbonhidrat

Polisakkarit

Echinacea 'dan izole edilen polisakkarit heteroksilanlar, inulin, arabinogalaktanlar, bağışıklık sistemi hücrelerinin aktivitelerini uyardığını ve iltihap çözücü aktiviteyi sergilediğini göstermiştir. Bu polisakkaritlerden iki tanesi *E. purpurea* 'nın anten bölümlerinden izole edilmiştir: 50 000 civarında ortalama nispi moleküler kütlesi olan arabinorhamnogalaktan (e.g. PS II), ve 35 000 civarında ortalama nispi

moleküler kütlesi olan heteroksilan (e.g. PS I). *Echinacea* aynı zamanda fruktan ve fruktoz polimerleri içermektedir. *E. purpurea*'nın toplam fruktoz içeriği kış boyunca artarken bu prosedür *E. angustifolia*'da mevsimin sonunda gerçekleşmektedir. *E. purpurea*'nın köklerinin fruktan içeriği *E. angustifolia*'nın anten bölümlerinden 10 kat daha fazladır (Mistríková ve Vavrková, 2006). *E. purpurea*'dan izole edilen polisakkarit fraksiyonun kemoterapinin tetiklediği lökopeniyi azalttığı görülmüştür (EPS-EPO VIIa) (Cichello, Yao ve He, 2016).

1.2.5. Yan Etkiler ve Alınacak Tedbirler

Geçmiş kullanım, modern araştırmalar ve tıbbi referans yayınları, *Echinacea*'nın mükemmel bir güvenlik profili olduğunu göstermektedir. Ancak, bir bağışıklık uyarıcı ilaç olduğu için, cyclosporine, corticosteroids, amiodarone, methotrexate ve ketoconazole gibi bağışıklığı bastırıcı etkisi olan ilaçlarla karıştırırken dikkat edilmelidir. *Echinacea* kullanımının sıklıkla ters deri tepkimelerine sebep olduğu rapor edilmektedir, bu yüzden atopik bireylerde dikkatle kullanılmalıdır. Ağızdan alındığında *Echinacea*'nın genellikle herhangi bir yan etkisi yoktur. Ancak, bazı insanlar kızarıklık, anaflaksi, ve yüksek astım (yaşamı tehdit eden bir alerjik reaksiyon) gibi alerjik reaksiyonlar yaşamaktadırlar. Klinik deneylerde sindirim sistemi ile ilgili yan etkiler daha yaygındır. İnsanların papatya ailesi içindeki bitkilerden yakup otu, kasımpatı, papatya ve kadife çiçeği içeren bitkilere alerjisi varsa, *Echinacea*'ya alerjik tepki vermeleri daha olasıdır. Ayrıca astım veya atopi (alerjik reaksiyolara genetik eğilim) li insanların *Echinacea* alırken alerjik tepki göstermeleri de daha muhtemeldir (Izzo ve Ernst, 2009).

2. TEORİK ÇERÇEVE

Sepsis, yaşamı tehdit eden ciddi bir klinik durumdur ve yoğun bakım ünitelerindeki ölümlerin ana sebebi olmaya devam etmektedir. Patolojik sürecin karmaşıklığından, kesin olarak belirlenmiş teşhis edici işaretlerin eksikliğinden, etkilenen popülasyonun heterojenliğinden ve metodolojik ve etik doğanın sınırlamalarından dolayı insanlarda sepsis araştırması zordur. Yukarıdaki zorluklar gözönüne alındığında, değerli ve düşük maliyetli bir araştırma aleti olan hayvan sepsis modelleri üretilmiştir. Bu bağlamda, bağışıklık sistemine farklı görüşler getiren avantajlı niteliği ile balıklar yeni bir hayvan modeli olarak kullanılmaya çalışılmaktadır. Evrimsel ve fizyolojik olarak insanlara diğer hayvan modellerinden daha uzak olmasına rağmen, bazı balık türlerinin özgün özellikleri *vivo* 'da beklenen etkileri açısından kimyasalların yüksek giripçiktılı ve büyük ölçekli görüntülenmesine izin vermektedir. Son zamanlarda balıklar bağışıklık birimi, kanser araştırmaları, endokrinoloji, nörobiyoloji, akuatik zehir bilim ve gelişim biyolojisi alanlarında yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Şu anda balık, sayı olarak üçüncü laboratuvar hayvan grubudur. Örneğin, zebra balıklarında hem gram-pozitif, hem de gram-negatif bakterilerle başarılı enfeksiyonlar gösterilmiştir. Enfeksiyonlar hem doğal balık patojenleri, hem de özgün insan patojenleri ile birlikte elde edilmektedir (O'Callaghan ve Vergunst, 2010; Vergunst, Meijer, Renshaw ve O'Callaghan, 2010). Ancak, Feng vd, (2009) formalin-killed ile uyarılmış Atlantik morinası (tipik bir *Aeromonas salmonicida*) nın bağışıklık dokularındaki farklı biçimde ifade edilmiş genlerin analizi ve tanımlaması ile ilgili bir çalışma yapmıştır. Ayrıca, Awad (2010) gökkuşağı alabalığındaki *Aeromonas hydrophila* enfeksiyonlarının kontrolü için bitki bazlı besinsel tamamlayıcılar üzerinde çalışmalar yapmıştır (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*).

Değişik tıbbi bitkiler ve otlar ve/veya bunların karışımının mantar önleyici, anti bakteriyel, fizyolojik sistemleri (sindirim sitemi, bağışıklık sistemi) destekleyici, hormonal dengeyi sağlayıcı gibi özellikleri ve başka pek çok özellikleri olduğu bilinmektedir (Kolkovski ve Kolkovski, 2011). Modern tıpta muhtemel kullanımları önerildiğinden beri bitkisel immunostimülanları tanımlama konusunda artan bir ilgi oluşmaktadır (Tiwari, Rastogi, Singh, Saraf, ve Vyas, 2004). İmmünostimülan,

savunma mekanizmaları veya bağışıklık tepkimelerini (hem nonspesifik hem de sprsifik) ilerleten ve böylece hayvanları hastalıklara ve dış saldırılara karşı daha dirençli hale getiren bir maddedir (Reverter, Bontemps, Lecchini, Banaigs ve Sasal, 2014). Küresel olarak popüler bir bitkisel ilaç olan *Echinacea purpurea* (EP) hayvanlarda ve insanlarda farklı hastalıkları tedavi etmekte kullanılmıştır. Echinacea tedavisi çeşitli sitokinler, lenfositler ve fagositoz aktivitesinde bir artışla sonuçlanmıştır (Sasagawa vd, 2006). Aly ve Mohamed (2010) Nil çipurası (*Oreochromis niloticus*) kullanarak *Allium sativum* ve *E. purpurea*'nın balık kültüründe immünostimülan olarak yeterliliğini ölçmek için bir çalışma yapmışlardır. Bu bağlamda, El-Sayed, El-Galil ve Rashied (2014), *Ginseng* ekstraktları, *Echinacea* ve antibiyotik ilavenin Nil çipurasının bağışıklık durumu ve büyüme performansı üzerindeki etkilerini ölçmüşlerdir. *Echinacea* ilavesinin hastalık direnci üzerindeki etkileri Nil çipurası (*Oreochromis niloticus*) (Aly, Mohamed ve George 2008) ve gökkuşağı alabalığı üzerinde çalışılmıştır (*Oncorhynchus mykiss*) (Oskoi, Kohyani, Parseh, Salati ve Sadeghi, 2012).

E. purpurea'nın balıklarda spesifik büyüme oranı (SGR), hayatta kalma oranı, bağışıklık enfeksiyonuna direnme, toplam ve diferansiyel akyuvar sayısı, nitroblue tetrazolium değerleri ve hematokrik ve lizozim aktivitesini artırdığı rapor edilmiştir (Aly vd, 2007, 2008; Aly ve Mohamed 2010). Bauer (1996), *E. purpurea* 'nın anten bölümlerinden alınan ekstraktlar ve *E. pallida*, *E. angustifolia* ve *E. purpurea*'nın köklerinden alınan alkollü ekstraktlarla bağlantılı farmolojik etkilerin *vitro* ve *vivo* delillerini ileri sürmüştür. Etkiler daha çok spesifik olmayan hücresel bağışıklık sisteminin glikoproteinler, polisakkaritler, alkilamidler ve kafeik asit türevleri tarafından düzenlenmesiyle bağlantılıdır. Oskoi, Kohyani, Parseh, Salati ve Sadeghi (2012), 0.5 g *E. purpurea* kg⁻¹'deki *E. purpurea* uygulamasının gökkuşağı sazan balıklarında büyüme belirtileri ve kan biyokimyasal ve hematolojik belirtilerinde pozitif etkileri olduğunu not etmişlerdir. Artmış NBT değerleri, 0.5 % *Echinacea* tedavisi ile beslenen *shirbotta da* Mesbah ve Mohammadian (2015) tarafından rapor edilmiştir. Ayrıca, *vitro*da farklı bağışıklık hücreleri (monositler, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler) *Echinacea* ekstraktları tarafından uyarılmıştır. (Bauer, 1999; Rininger, Kickner, Chigurupati, McLean ve Franck, 2000).

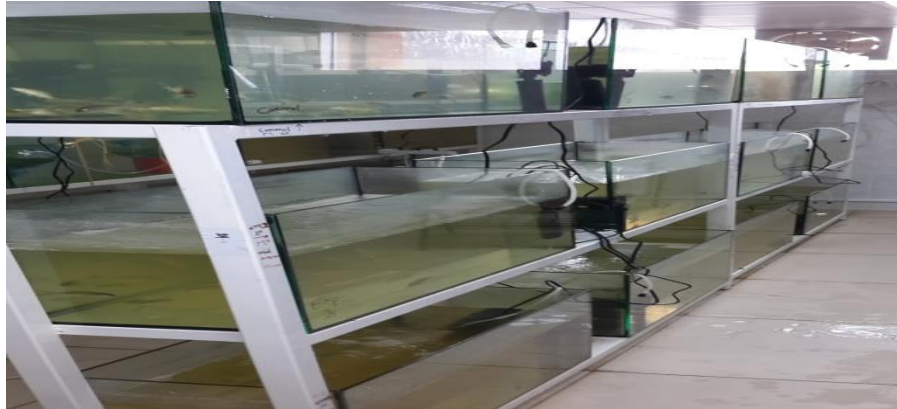
4. MATERYAL VE METOD

3.1. Deney Balıkları

Sazan balığı (*Cyprinus carpio*) (ortalama vücut ağırlığı 3.54 ± 0.1 g) Kastamonu ilindeki ticari bir balık çiftliğinden temin edilmiştir (Turkey). Balıklar Balıkçılık Fakültesine nakledilmiş (Kastamonu Üniversitesi) ve 2 hafta süresince klimatize edilmiştir. Bütün sazan balıkları aklimasyon süresi boyunca günde üç defa beslenmiş ve aynı ticari diyeti almıştır. Sonrasında, balıklar rastgele olarak, bir tanesi kontrol grubu olmak üzere, üç eşit gruba dağıtılmıştır (Fotoğraf 3.1) Her grup, 200-L akvaryumda stoklanan 20 balık eşleminin iki kopyasından oluşmuştur (Fotoğraf 3.2). Deney süresince su dakikada 11.1 L akmış, her akvaryuma havalandırma sağlanmış ve suyun %20'si günlük olarak değiştirilmiştir.



Fotoğraf 3.1. Üç ayrı gruba rastgele balıkların dağıtılması



Fotoğraf 3.2. 200 litrelik akvaryuma balıkların doldurulması

3.2. Deney Tasarımı

Bu çalışmada iki deney yapılmıştır. Araştırılan sazan balığı (8 aylık) aşağıdaki gruplara göre rastgele belirlenmiştir:

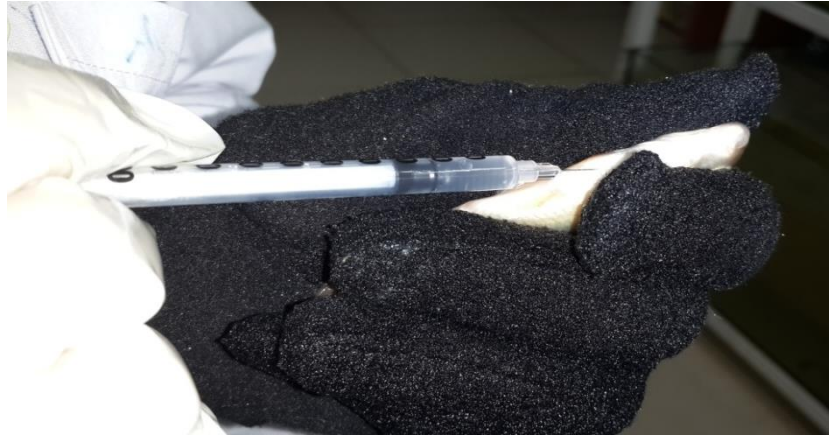
3.2.1. Deney 1

Bu deneyin balıkları birinci, üçüncü ve yedinci günlerdeki enfeksiyonu takip eden 8 saatte feda edilmiştir ve sazan balığını anestezi etmek için her galon suda 5-7 damla oranında Tricaine Methanesulfonate (MS-222) kullanılmıştır. (Fotoğraf 3.3).



Fotoğraf 3.3. *A. hydrophila* ile aşılama öncesinde Anestezi altındaki balıklar

Besinsel uygulama sonunda, ilk gün bütün balıklara *hydrophila* (ATCC 20662) süspansiyonu (100 µL PBS içinde 1×10^8 CFUs karıştırılmış) intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir (Fotoğraf 3.4).



Fotoğraf 3.4. Patojen bakteri *A. hydrophila*'nın balıklara enjekte edilmesi

Bir hafta boyunca günde iki defa sazan balıklarına Flexible PTFE Disposable Feeding Needle ile oral doz yapılmıştır (Fotoğraf 3.5).



Fotoğraf 3.5. Tek kullanımlık Esnek PTFE Besleme İğnesi

Grup I: Kontrol Balıkları:

Bu gruptaki balıklar, 100µl fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) ile sadece 7 gün boyunca ticari diyet ile beslenmişlerdir.

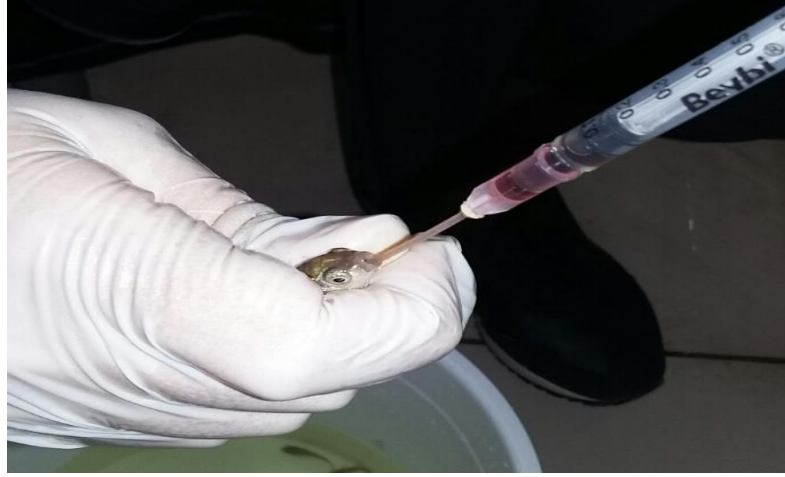
Grup II: DeneySEL Gruplar:

DeneySEL grup (I): Balıklar 24 mg *E. purpurea* 'nın 100 µl metanol ekstraktlarıyla beslenmiştir. Sazan balığı bir hafta boyunca günde iki defa beslenmiştir.

DeneySEL grup (II): Balıklar 36 mg *E. purpurea*'nın 100µl metanol ekstraktlarıyla beslenmiştir. Sazan balığı bir hafta boyunca günde iki defa beslenmiştir.

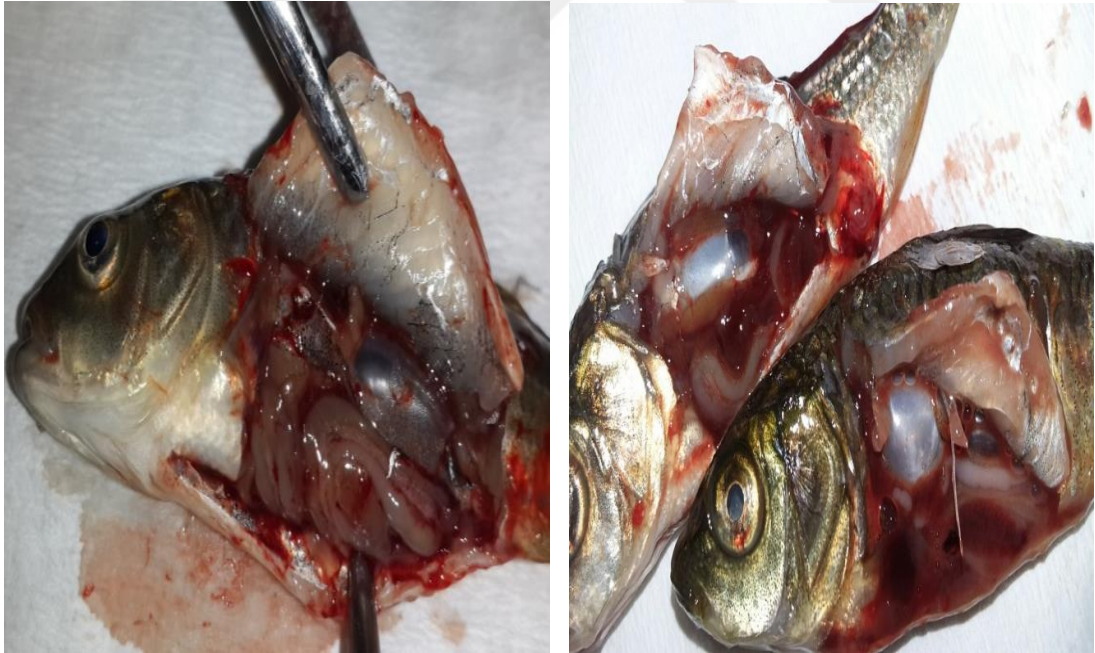
3.2.2. Deney 2

Sazan balığına 18 gün boyunca oral doz ile bitki materyali veriliyor (Fotoğraf 3.6). DiyetSEL uygulama sonunda, yedinci günde *A. hydrophila* süspansiyonu (ATCC 20662) (100 µL PBS içine 1×10^8 CFU karıştırılmış olarak) bütün balıklara intraperitoneal olarak enjekte ediliyor.



Fotoğraf 3.6. Balığın Ağızına Besleme İğnesinin Sokulması

Balıklara patojenik bakteri olan *A. hydrophila* enjekte edildikten beş gün sonra enfeksiyonun görülen bir ya da daha fazla tipik belirtisi kanama (çok ve düzensiz) ve iltihaplı yarıktan dışarı çıkmış sero-hemorajik sıvılarla birlikte karında şişkinliktir. (Fotoğraf 3.7). Bu deneydeki balıklar 12, 15 ve 18 günde feda edilmektedir.



Fotoğraf 3.7. Septisemik lezyonlardan muzdarip Doğal olarak enfekte olmuş sazan balığı.

Grup I: Kontrol Balıkları:

Bu grubun balıkları 100 µl BPS'lik ticari diyetle sadece 18 gün boyunca beslenmektedirler.

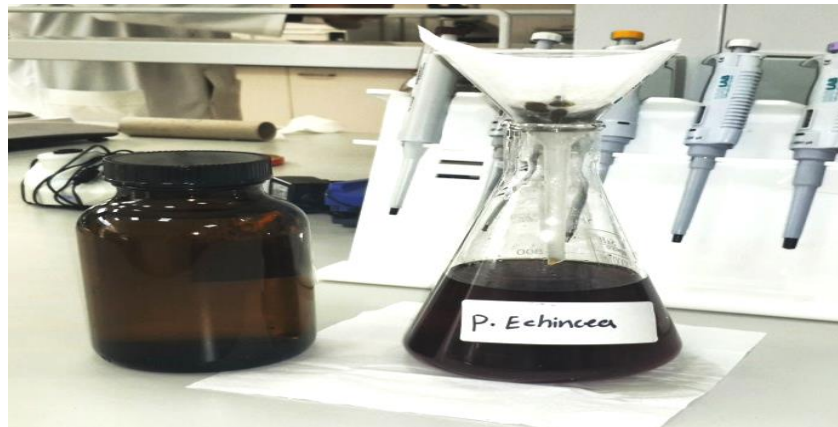
Grup II: Deneysel Gruplar:

Deneysel grup (I): Balıklara 24 mg *E. purpurea*'nın 100 µl metanol ekstraktlarıyla ağızdan ilaç uygulanmaktadır. Sazan balığı 14 gün boyunca günde iki defa beslenmektedir.

Deneysel grup (II): Balıklar 36 mg *E. purpurea*'nın 100 µl metanol ekstraktıyla beslenmektedir. Sazan balığı 18 gün boyunca günde 2 defa beslenmektedir.

3.3. *Echinacea purpurea* Ekstratlarının Hazırlanması

Echinacea türleri Aster ailesinin üyelerinden (Asteraceae veya Compositae) biri olan çiçekli bitkilerdir. Bu çalışmada, Kastamonu ilindeki (Türkiye) ticari bir şirketten elde edilen *Echinacea*'nın yukarıda bahsedilen bölümleri kullanılmıştır. Pakravan, Hajimoradloo, ve Ghorbani (2012)'ye göre, kurutulmuş numune ekstrakt küçük değişikliklerle uygulanmıştır. Kısaca, üç gün boyunca 1 L metanol ile birlikte 50 g numune (*E. purpurea*'nın üstteki zemin parçaları) süzgeçten geçirildi (40%), sonra Whatman No. 1 filtre kağıtlarını kullanarak filtrelendi (Fotoğraf 3.8).



Fotoğraf 3.8. Filtre kağıdı kullanarak Filtrasyon

Ekstrakt çözeltisi, uygun bir filtre kağıdı (Whatman No. 1 filtre kağıtları) ile donatılmış bir Büchner hunisine aktarıldı ve Fotoğraf 3.9’ da gösterildiği gibi, herhangi bir parçacıklı maddeyi uzaklaştırmak için vakum birimlerini kullanarak ekstrakt çözeltisini filtreledi (Fotoğraf 3.9).

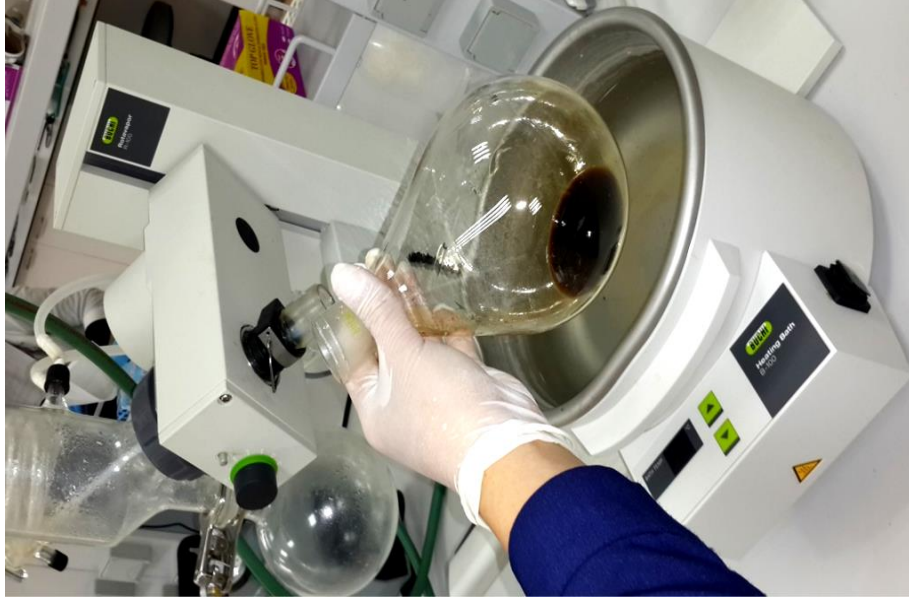


Fotoğraf 3.9. Büchner Hunisi kullanılarak oluşturulan Filtrasyon Düzeneği

Çözücü, su banyosunda (55°C’de) döner buharlaştırıcı ile buharlaştırıldı (Buchi Rotavapor® R-100) (Fotoğraf 3.10) ve son olarak, konsantre karışım, kullanıma kadar depolanmak amacıyla, 50 ml iyonsuzlaştırılmış ılık suda eritildi. Bu, ekstraktı oluşturdu (Fotoğraf 3.11).



Fotoğraf 3.10. Döner Buharlaştırıcı



Fotoğraf 3.11. Ekstraksiyon son Ürünü

Bitki ekstrakt solüsyonunun tam miktarı fosfat tamponlu tuzlu su içinde dozajına göre (*E. purpurea*, 24 mg and 36 mg) sulandırıldı. Deneysel diyet kullanıma kadar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de depolandı (Fotoğraf 3.12).

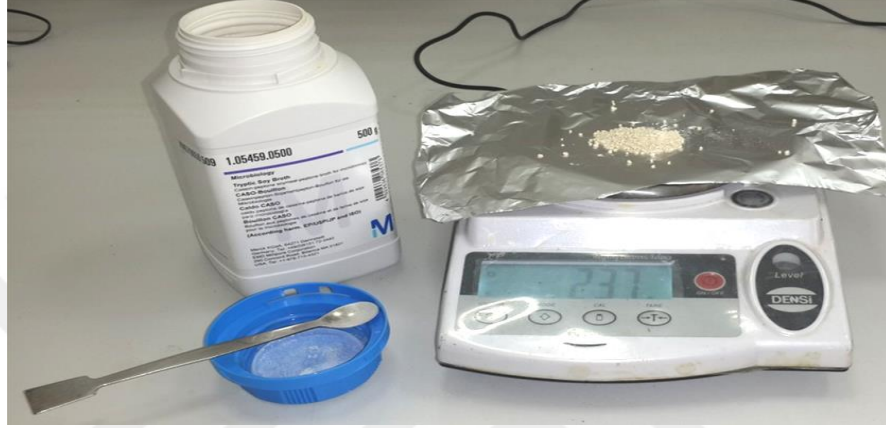


Fotoğraf 3.12. Bitki ekstrakt dozlarının Hazırlanması.

3.4. Bakteryal Dozun Hazırlanması

3.4.1. Triptik Soya Buyyon Hazırlanması

Triptik soya buyyon, 7.5 gram triptik soya buyyon tozunun iyonşuzlaştırmış H₂O ile 250 ml'nin son hacminde karıştırılmasıyla hazırlandı (Fotoğraf 3.13).



Fotoğraf 3.13. Triptik soya buyyon tozunun istenen ağırlıklarda Hazırlanması

Karışım kaşıkla karıştırıldı ve otoklavlama öncesi toz tamamen çözölüne kadar kaynatıldı (Fotoğraf 3.14). Ardından, 15 dakika boyunca 121°C'de otoklavlayarak sterilize edildi. Kullanımdan önce buyyonun oda sıcaklığına gelene kadar soğuması sağlanmalıdır.



Fotoğraf 3.14. Triptik soya buyyonun Hazırlanması

3.4.2. Triptik Soya Agar Hazırlanması

Triptik soya agar (TSA) 10 gram triptik soya agar tozunun iyonşuzlaştırmış H₂O ile 250 ml'nin son hacminde karıştırılmasıyla hazırlandı (Fotoğraf 3.15).



Fotoğraf 3.15. Triptik soya Agar tozunun istenen ağırlıklarda Hazırlanması

Karışım kaşıkla karıştırıldı ve otoklavlama öncesi toz tamamen çözölene kadar kaynatıldı (Fotoğraf 3.16).



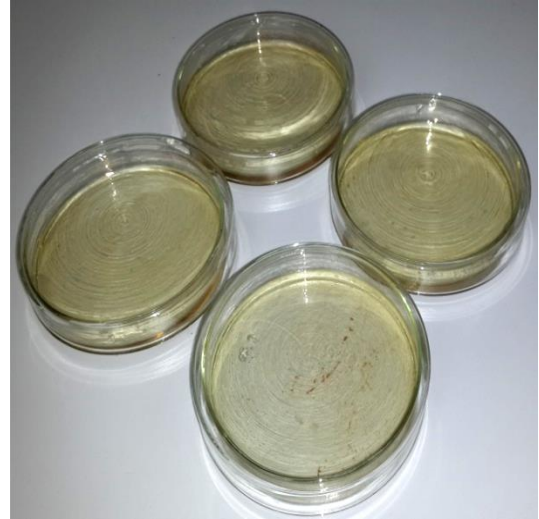
Fotoğraf 3.16. Triptik Soya Agar'ın Hazırlanması

Sonra 15 dakika boyunca 121 °C’de otoklavlayarak sterilize edildi (Fotoğraf 3.17). Otoklavlamanın hemen sonrasında 45 ila 50 °C su banyosunda soğuması sağlandı.



Fotoğraf 3.17. Triptik Soya Agar’ın Otoklavlanması

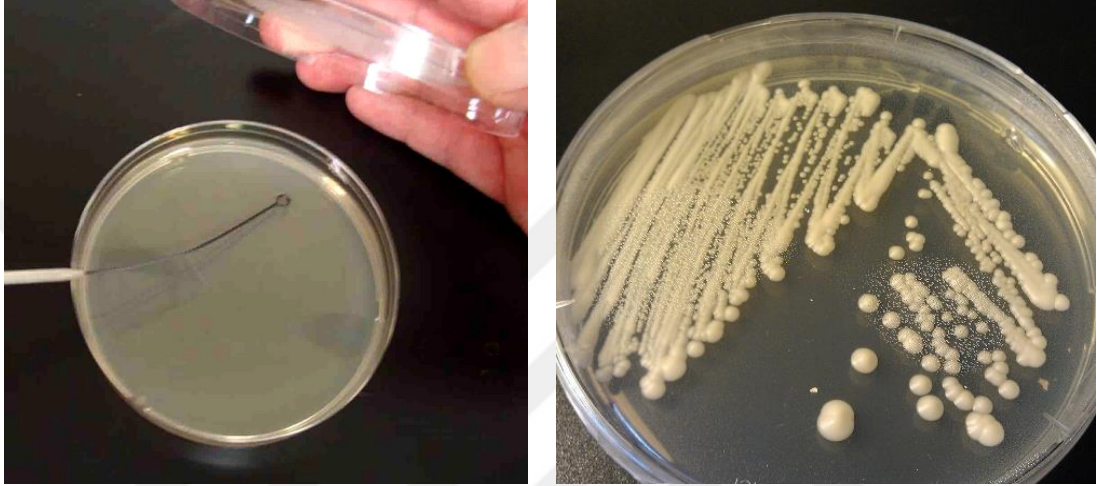
Yeni hazırlanan madde, plastik düz tabanlı petri kutularına aynı hızda ve yatay yüzeyde, kutu yarısına kadar agarla doldurulacak şekilde dökülür. Agar mddesinin oda sıcaklığında soğuması sağlanır (Fotoğraf 3.18).



Fotoğraf 3.18. Tripton Soya Agar’ın petri kutularına boşaltılması

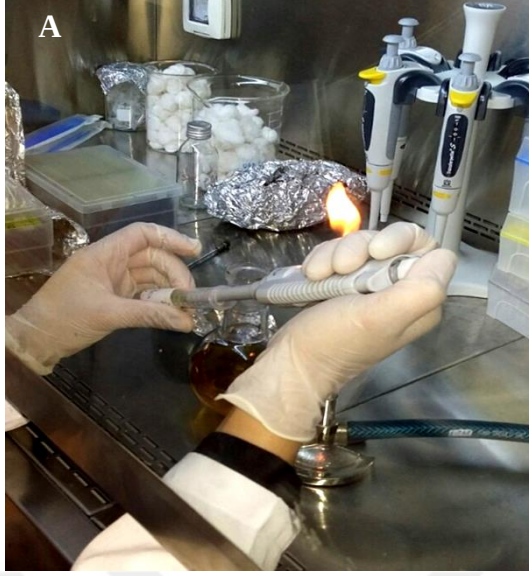
3.4.3. Bakteri Kùltürü ve Bakteri Uyarım Deneyleri

Uyum sağlama sonrasında, sazan balığı, kùltür koleksiyonumuzda -80 °C’de gliserin buyyonu içinde muhafaza edilen *A. hydrophila* ile karşılaşır. *A. hydrophila* tripton soya agar üzerinde kùltürlenmiş ve tripton soya buyyon içinde hasat edilmiştir (Fotoğraf 3.19).



Fotoğraf 3.19 Çizgili *A. hydrophila*’nın tripton Soya Agar petri kutularına dökùlmesi ve tripton Soya Agar içerisindeki *A. hydrophila* kolonileri

Buyyon, bir gece boyunca 20 °C’de bir çalkalayıcı içinde 12 saatliğine kuluçkaya yatırıldı ve 4 °C’de 5 dakikalığına 1800 rpm’de santrifüjlendi; üst faz atıldı ve bakteriyel pellet PBS (pH 7.2) ile homojenize edilmiş ve santrifüjlenmiş üç döngü ile yıkandı (Fotoğraf 3.20).



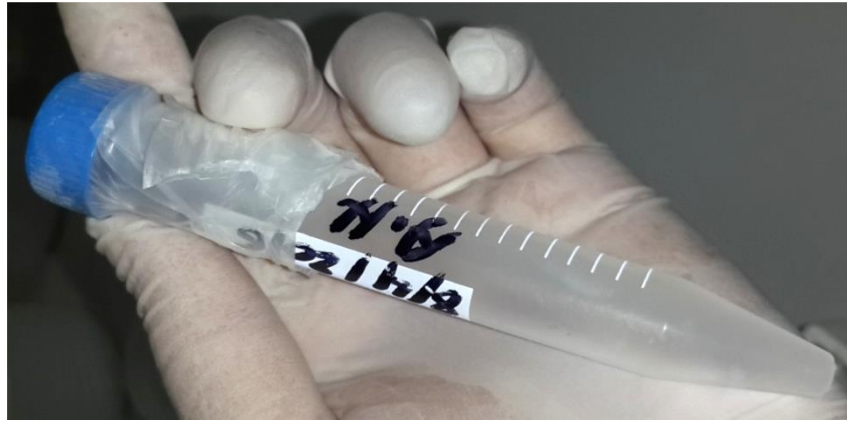
Fotoğraf 3.20. Tripton soya buyyon içine Bakterilerin Ekimi

Pellet steril PBS içinde tekrar bekletildi ve sonra süspansiyonu McFarland No -0.5 turbiditeyle eşleşmesi için ayarlayarak 10^8 CFU/ml içeren aşı maddesi hazırlandı (Fotoğraf 3.21).



Fotoğraf 3.21. 0,5 McFarland çözeltisine eklenen 1×10^8 CFU ml⁻¹ içeren inoklum

Çalışma boyunca sabit bir inoklum sağlamak için, -80 °C’de 0.85% (w/v) NaCl ve 20% (v/v) gliserin ile birlikte tripton soya buyyon (Himedia) içinde stok kültürü depolandı (Chabot ve Thune, 1991) (Fotoğraf 3.22).

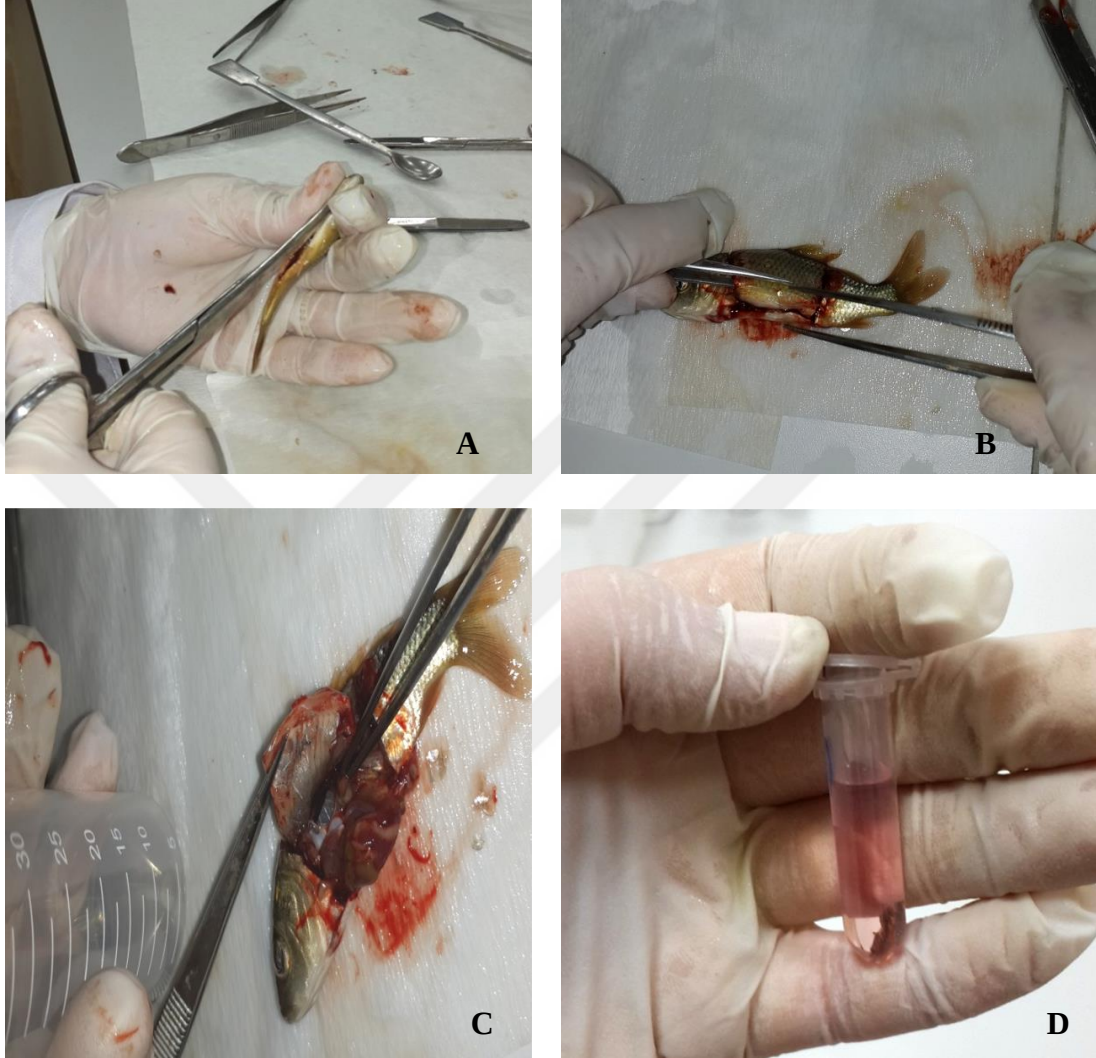


Fotoğraf 3.22. *Aeromonas hydrophila*’nın Stok Kültürü.

3.5. Numune Toplama

Tüm deneyler 2 tekrarlama (her tekrarda 8), rastgele blok düzeni içinde gerçekleştirildi. Balıklar, içinde su olan geniş ağızlı kaba alındı, sonra öldürüldü ve Secombes’a göre baş - böbrek balıktan ayrıldı (1990). Biswas vd, (2013) a göre, küçük değişikliklerle (Braun-Nesje, Kaplan, ve Seljelid,1982), baş - böbrek ventral

bir kesikle parçalara ayrıldı, aseptik olarak çıkarıldı ve 1.5 ml RPMI-1640 ortama aktarıldı (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Fotoğraf 3.23).



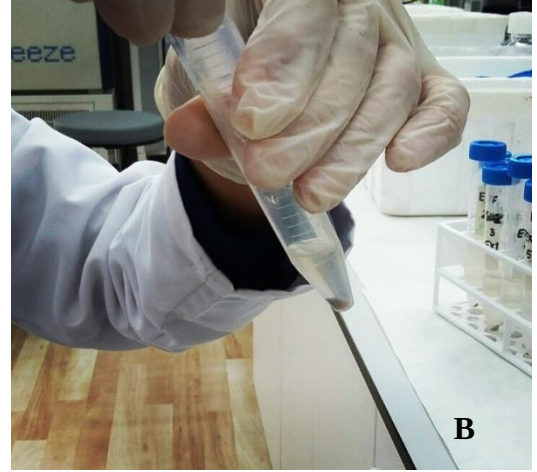
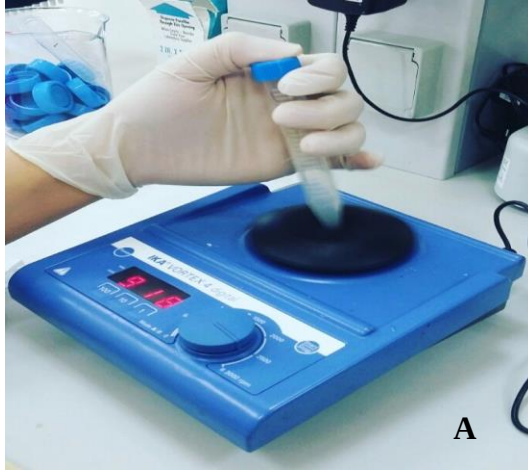
Fotoğraf 3.23. Numune toplama. A. Balığı kesme. B. Karın bölgesinden açma. C. Enfeksiyonlu balıktan baş - böbrek dokusunu çıkarma. D. RPMI-1640 ortama aktarılan baş - böbrek. Balığın kesilmesi ve Vent Bölümünün Açılması

Baş - böbrekler toplandı ve naylon ağ aracılığıyla sıkıştırıldı ($\Phi 100 \mu\text{m}$; Becton, Dickinson and Company, NJ, USA), Hank's Balanced Salt Solüsyon ile iyice yıkandı (HBSS) ve 1% solution of 10,000 g ml⁻¹ streptomycin+ 10,000 U ml⁻¹ penicillin ve 5% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen) ile takviye edildi. Solüsyonun son hacmi falkon tüp içinde 3 ml'dir. Baş böbrek hücresi süspansiyonları santrifüjde 4°C'de 3 dakika boyunca 1800 rpm'de peletlenmiştir (Fotoğraf 3.24).



Fotoğraf 3.24. Numunelerin hazırlanması. A. Baş böbreğin naylon ağa aktarılması B. Baş böbreğe baskı yapılması ve 100 μ m naylon ağdan geçirilmesi C. Hücre süspansiyonu oluşturmak için baş böbreğin ezilerek yumuşatılması D. Baş böbrek hücre süspansiyonunun santrifüj yapılması.

Santrifüj yapıldıktan sonra Pasteur pipeti kullanılarak üst faz toplandı ve 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Sonra topak tekrar aynı solüsyonda bekletildi ve direk olarak NBT'yi tahlil etmek için kullanıldı (Fotoğraf 3.25).

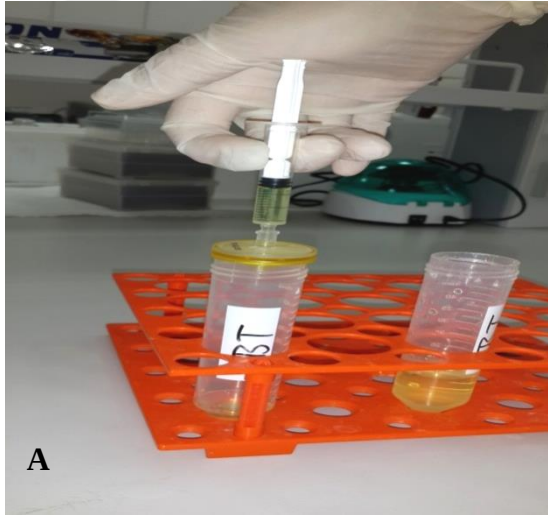


Fotoğraf 3.25. NBT'yi tahlil etmek için hücre topağı hazırlanması. A. Hücre pelletinin homojenize edilmesi B. Hücre pelleti.

3.6. Ayıraçların Hazırlanması

3.6.1. NBT Stok Solüsyonunun Hazırlanması

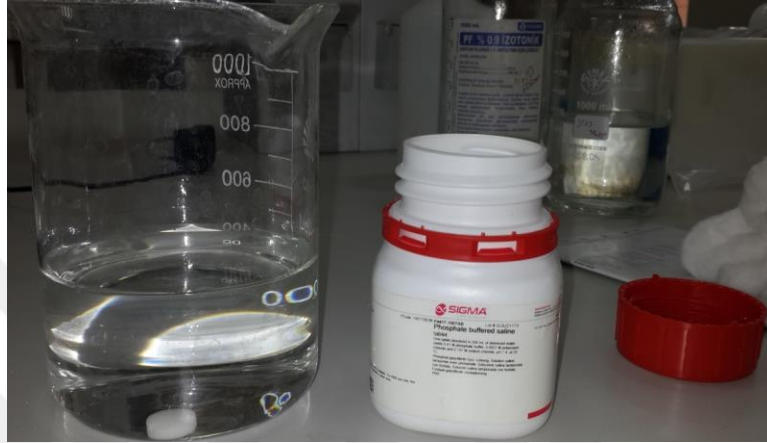
10 ml'lik iyonşuzaştırılmış suda 1 NBT tabletu çözülerek NBT stok solüsyonu hazırlanır. Sonra mikrofilter ile filtreleme yapılır (Fotoğraf 3.26).



Fotoğraf 3.26. A. Microfilter kullanılarak NBT stok Solüsyonunun hazırlanması. B. Tablet of NBT. NBT Stok Solüsyonunun hazırlanması.

3.6.2. Fosfat Tamponlu Tuzlu Suyun Hazırlanması

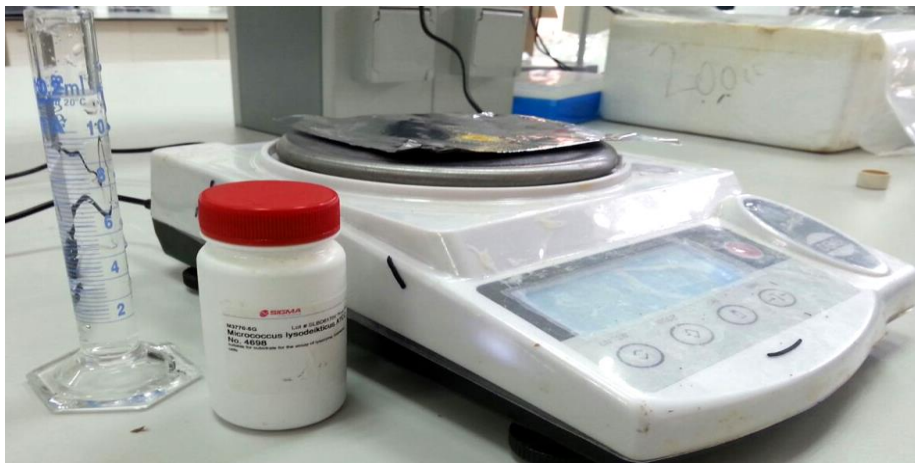
200 ml'lik iyonsuzlaştırılmış suda bir tablet eritilerek Fosfat Tamponlu Tuzlu Suyun hazırlandı ve 25°C'de 0.01 M fosfat tampon, 0.0027 M potasyum klorür ve 0.137 M sodyum klorür, pH 7.4 üretildi (Fotoğraf 3.27).



Fotoğraf 3.27. Fosfat tamponlu tuzlu suyun hazırlanması

3.6.3. Lizozim Stok Solüsyonunun hazırlanması

Kısaca, stok solüsyonları yeterli miktarda toz *Micrococcus lysodeikticus* bakteriyel hücreleri (0.02 g) 100 ml son hacimde Fosfat Tamponlu Tuzlu Suyun ile eritilerek hazırlandı. Daha sonra stok solüsyonu 15 dakika süresince 121 °C'de otoklavlanarak siterilize edildi ve 4 °C'de saklandı (Fotoğraf 3.28).



Fotoğraf 3.28. Lizozim Stok Solüsyonunun hazırlanması

3.7.1. Miyeloperoksidaz Stok Solüsyonunun hazırlanması

İlk aşamada, 100 ml distile suyun içinde bir tablet fosfat sitrat eritildi (Fotoğraf 3.29). TMB substrat solüsyon – Dissolve one 3,3',5,5'-Tetra-methylbenzidine dihydrochloride tablet in 10 ml of 0.05 M Phosphate-Citrate Buffer, pH 5.0.



Fotoğraf 3.29. TMB Hapı

3.7. Metod and Yöntem

3.7.1. Nitroblue tetrazolium (NBT) İndirgeme Ölçümü

Genel Protokol: Her ne kadar tamamen O_2^- 'ye özgü olmasa da, NBT'nin çözülemez mavi formazana azaltılması süperoksit üretimi için bir araştırma olarak kullanılmıştır (Munoz vd, 2000). Biswas vd, (2013)'a göre, çok az bir değişiklikle, her numuneden ayrılan HK hücreleri (1×10^8 cells ml⁻¹) 96-hazne plakasında haznelerde 100 μ L'de tohumlandı (Nunc A/S, Roskilde, Denmark). Canlı fagositik hücreler 50 μ L NBT solüsyonuyla uyarıldı ve 1 saat süresince 25 °C'de kuluçkalandı (CO₂ Incubator Nuve EC 160). PBS ile yıkayarak yapışmamış hücreleri giderdikten sonra, hücrelerin yaklaşık 15 dakika süresince oda sıcaklığında metanol %100 ile tutturulmasına imkan verilir ve açık havada kurutulur. Üretilen formazan 140 μ L dimetilsülfoksit (DMSO; Sigma-Aldrich) ve 120 μ L 2 M potasyum hidroksit (KOH; Wako, Tokyo, Japan) ekleyerek çözündürülür (Fotoğraf 3.30). Ardından, solüsyonun optikal yoğunluğu mikroparka fotoğraf makinası kullanılarak 620 nm'de ölçülür (Multiskan GO, Thermo Scientific, Fotoğraf 3.31). KOH ve DMSO boş kullanılır.



Fotoğraf 3.30. Nitroblue tetrezolium (NBT) azaltılma analizi. A. NBT solüsyonları düz tabanlı 96-hazne plağa eklenir. B. NBT solüsyonu azaltma analizi. C. NBT tahlilinde 96-hazne plaka kullanıldı, Solunum patlaması aktivitesi deneyinin son bölümü.

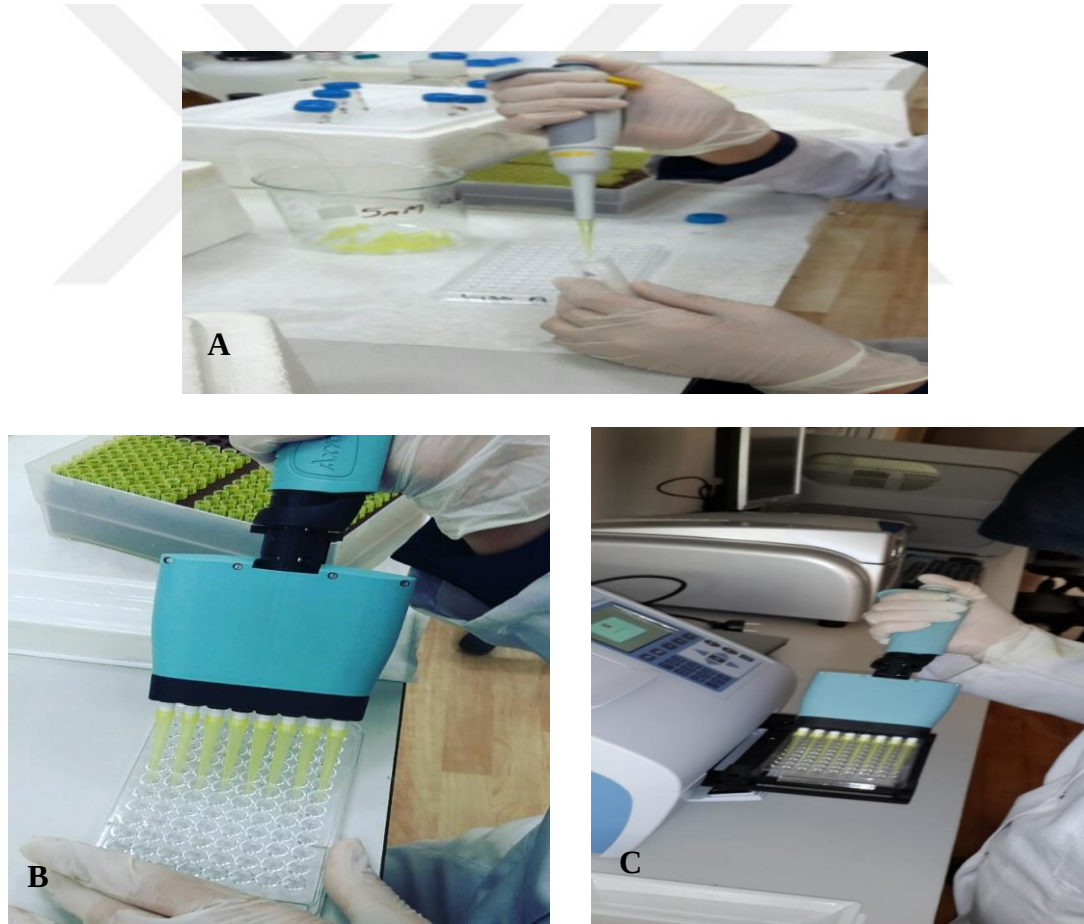


Fotoğraf 3.31. Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Mikro plaka okuyucu Spektrometre.

3.7.2. Lizozim Aktivite Ölçümü

Genel protokol: *Micrococcus lysodeikticus* bakteriyel hücreler kullanarak gerçekleştirdiğimiz lizozim testi lizozim için bir alt yapıdır. *M. lysodeikticus*

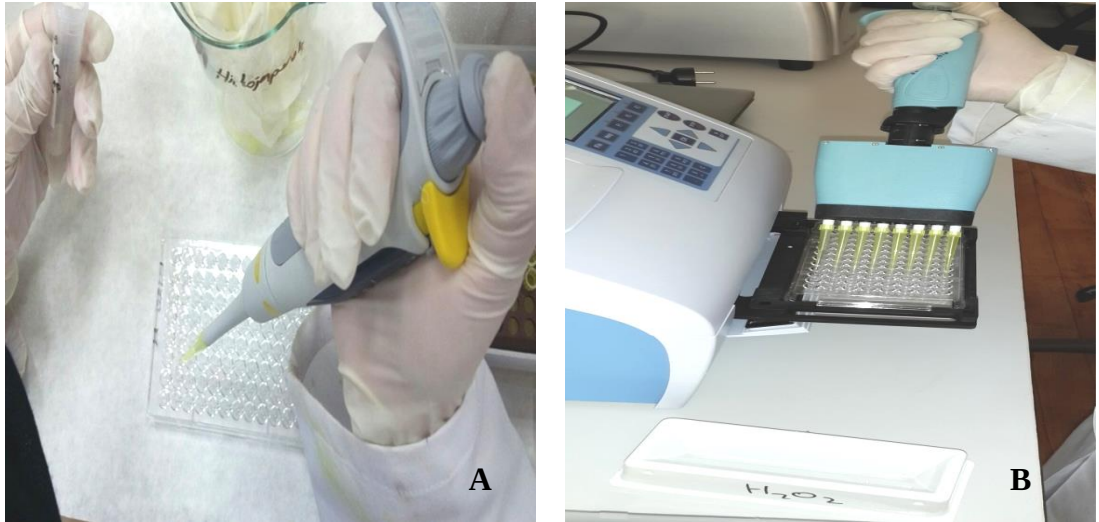
hücrelerinin bir süspansiyonu az miktarda HK üst fazı ile karıştırıldı. Hk üst fazında mevcut bulunan lizozim, hücre duvarlarını aşındırır. Enzim süspansiyonda rol aldığı için, süspansiyonun türbiditesi ve dolayısıyla numunenin Emilimi azalacaktır. Turbiditedeki düşüş oranı numunede mevcut olan lizozim miktarının nispi ölçütü olacaktır. Ne kadar çok lizozom bulunursa tepkime o kadar hızlı gerçekleşecek ve emilim o kadar hızlı düşecektir. Numunedeki lizozom aktivitesi spektrometre kullanılarak ölçülmüştür. Kısaca, 200 μ L bakteriyel süspansiyona 100 μ L HK üst faz pipet düz tabanlı 96-hazne mikrotitre plakada eklenmiştir. Sonrasında, emilim düşüşü spektrometrede 540 nm’de 0, 15, 30, 45 ve 60 dakikalık aralarla kaydedilmiştir (Multiskan GO, Thermo Scientific) (Fotoğraf 3.32). Bakteriyel süspansiyon ve 200 μ L PBS ve 100 μ L bakteriyel süspansiyonu boş kullanmak, bir birim lizozom aktivitesi 0.001/min’in emiliminde düşüş olarak tanımlanmıştır (Bilen vd, 2014).



Fotoğraf 3.32. Lizozom aktivitesi tahlili. A. Numuneleri düz tabanlı 96-hazneli mikrotitre plakara eklemek. B. Lizozom tahlil solüsyonlarını düz tabanlı 96 – hazneli mikrotitre plakalarına eklemek. C. Lizozom aktivitesi deneyinin son bölümü. 200 μ L bakteriyel süspansiyonu düz tabanlı 96 – hazneli mikrotitre plakasına eklemek.

3.7.3. Miyeloperoksidaz Aktivite Ölçümü

Genel Protokol: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB), peroksidaz enzimler tarafından hidrojen peroksidin suya indirgenmesi için bir hidrojen donör olarak rol oynayan peroksidaz alt tabakadır. Alt tabaka, soluk mavi renkte ve 370 veya 620-650 nm'de spektrometrik olarak okunabilen çözünür bir ürün üretir (Sokolov vd, 2015). TMB tepkimesi 2 M H₂SO₄ ile belki durdurulabilir (sarı renkle sonuçlanarak), ve 450 nm'de okunabilir. Numunede mevcut bulunan toplam miyeloperoksidaz miktarı, çok az bir değişikliklerle, Sahoo, Kumari, ve Mishra (2005)'a göre ölçülmüştür. Bunun için, 10 µl lökosit üst faz 90 µl Ca²⁺ and Mg²⁺ free Hanks' Balanced Salt Solution ile düz tabanlı 96-hazneli mikrotitre plakasında seyreltilmiştir. Sonra, 35 µl of 20 mM 3,3',5,5'- tetrametilbenzidin hidroklorür and 35 µl of 5 mM H₂O₂ eklenmiştir (her iki peroksidaz üst fazı). Renk tepkimeyi değiştirmiş, ve tepkime emilimdeki artışı ölçme yoluyla kinetik olarak takip edilmiştir (Multiskan GO, Thermo Scientific). Tepkime hızı UI olarak belirlenmiş, 0.5 ml tepkime karışımı için emilimde dakikada 0.001 artış üretmek için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (ΔA 450/min /ml) (Fotoğraf 3.33). 35 µl of 5 mM H₂O₂ ve 90 µl of HBSS, 35 µl of 20 mM 3,3',5,5'- tetrametilbenzidin hidroklorür boş kullanılır.



Fotoğraf 3.33. Miyeloperoksidaz aktivite tahlili. A. Numunelerin düz tabanlı 96 – hazneli mikrotitre plakalara eklenmesi B. Miyeloperoksidaz aktivite tahlilinin son bölümü, 5 mM H₂O₂'nun eklenmesi.

4. BULGULAR

4.1. Deney –I

Bu deneyin balıkları birinci, üçüncü ve yedinci günde enfeksiyonu takip eden 8 saatte feda edildiler.

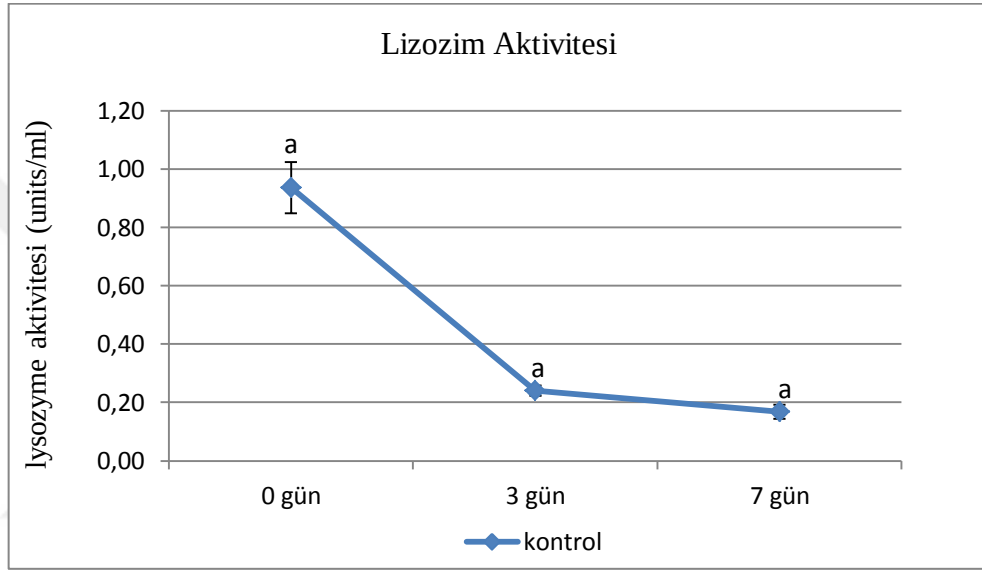
4.1.1. Lizozim Aktivitesi

Bu çalışmada lizozim aktivitesi (LA) Tablo 4.1.'de özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre, çalışmanın ilk örnekleme zamanı olan 0. günün sonunda 24 mg *E. purpurea* ile beslenen gruptaki balıkların lizozim aktivitesi önemli bir düşüş gösterirken, 36 mg *E. purpurea* ile beslenen gruptaki balıklar kontrol grubu balıkları ile kıyaslandığında kayda değer bir değişiklik göstermemişlerdir. Diğer taraftan, çalışmanın üçüncü gününde iki rakip gruptaki LA aktivitesi kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli ölçüde artmıştır ($P < 0.05$). 24 mg *E. purpurea* ile beslenen enfeksiyonlu grubun LA değerleri 36 mg *E. purpurea* ile beslenen grubunkinden daha yüksektir. Aynı şekilde 7. günün sonunda kontrol grubu ile kıyaslandığında iki rakip grupta da sazan balıklarının LA'nde büyük bir artış ($P < 0.05$ fark edilmiştir. Diğer taraftan, kontrollerde en yüksek LA değerleri 0. günde kaydedilmiş (0.94 ± 0.09), bunu 3 günlük veriler takip etmiştir (0.24 ± 0.02). En düşük değerler ise 7 gün sonunda kaydedilmiştir (0.17 ± 0.02) (Grafik 4.1). Ancak, en yüksek LA değeri 24 mg *E. purpurea*'nın kullanımını takip eden 3. günde ortaya çıkmış (0.86 ± 0.07), bunu pek önemli değişiklik olmadan 0. gün takip etmiştir (0.83 ± 0.05). En düşük değerler ise, 0 ve 3 gün ile kıyaslandığında önemli değişiklik göstererek, 7. gün sonunda kaydedilmiştir (0.43 ± 0.02) (Grafik 4.2). Ayrıca, 36 mg *E. purpurea*'nın kullanımını takip eden en yüksek LA değeri 0. günde ortaya çıkmış (0.88 ± 0.05), bunu önemli değişiklik olmaksızın 3. gün takip etmiştir (0.84 ± 0.05). En düşük değerler ise önemli düşüşle birlikte 7. günün sonunda kaydedilmiştir (Grafik 4.3).

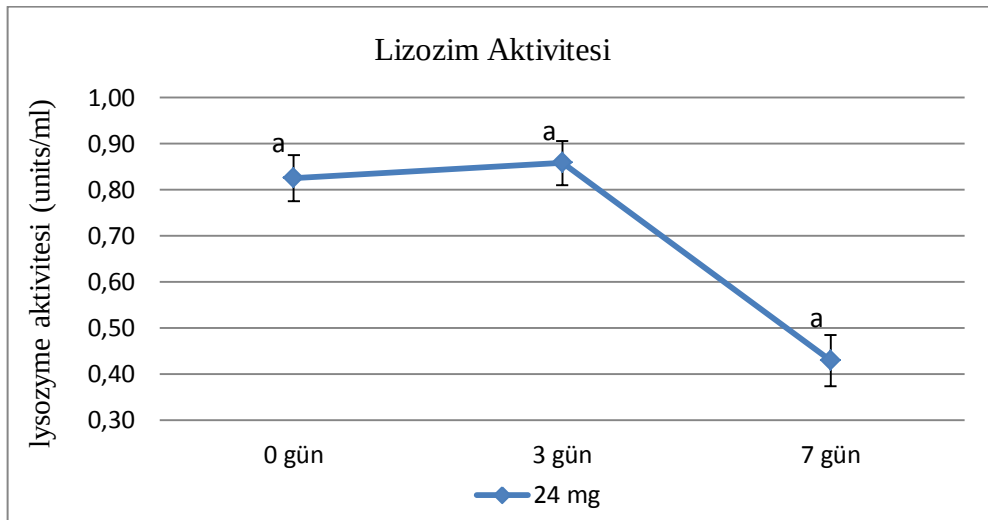
Tablo 4.1. *A.hydrophila* ile immune edilmiş Sazan balığının baş böbrek lökositlerince üretilen LA.

Gruplar	Çalışma günleri		
	0 gün	3 gün	7 gün
Kontrol	0.94±0.09 ^{aA}	0.24±0.02 ^{aB}	0.17±0.02 ^{aC}
24 mg	0.83±0.05 ^{bA}	0.86±0.07 ^{bA}	0.43±0.02 ^{bB}
36 mg	0.88±0.05 ^{aA}	0.84±0.05 ^{bA}	0.43±0.06 ^{bB}

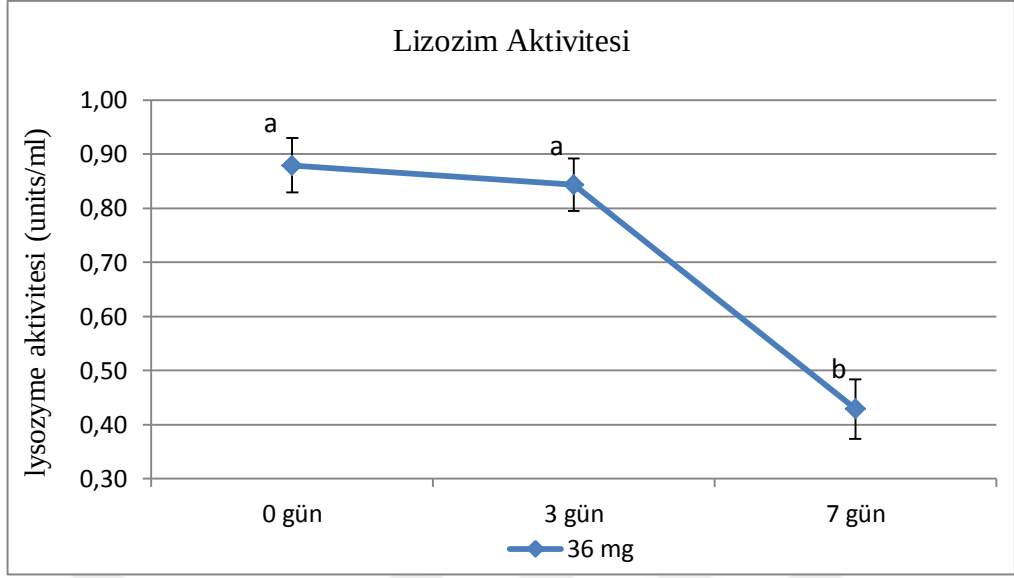
Deney 1'deki değişik grupların lizozim aktivitesi. Küçük harf gruplar arası farklılıkları, büyük harf ise aynı grubun çalışma günleri arasındaki farklılıkları göstermektedir.



Grafik 4.1. Gün süreyle Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi ile beslenen Sazan Balıklarının Lizozim Aktivitesi.



Grafik 4.2. Gün süreyle 24 mg *E. purpurea* ile beslenen Sazan Balıklarının Lizozim Aktivitesi.



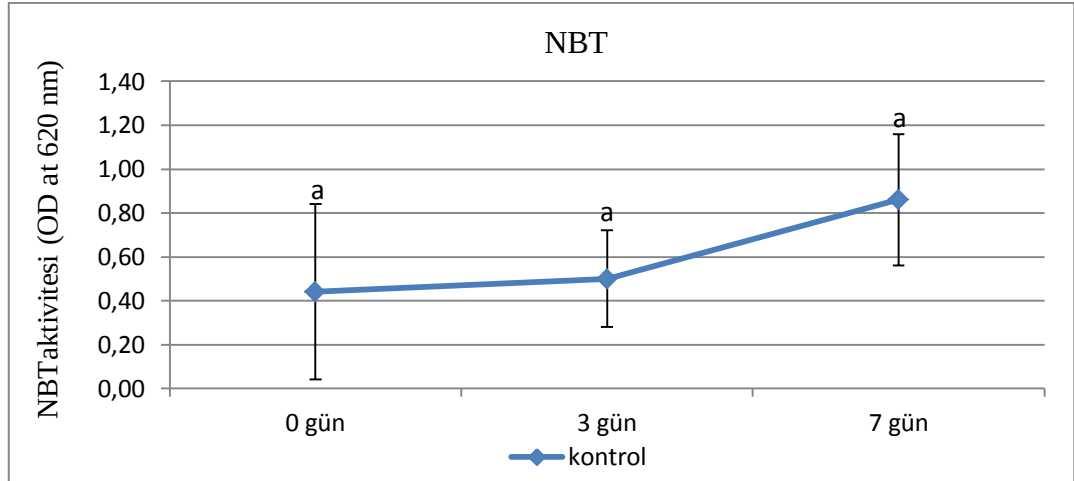
Grafik 4.3. Gün süreyle 36 mg *E. purpurea* ile beslenen Sazan Balıklarının Lizozim Aktivitesi.

4.1.2. Solunumsal Patlama Aktivitesi

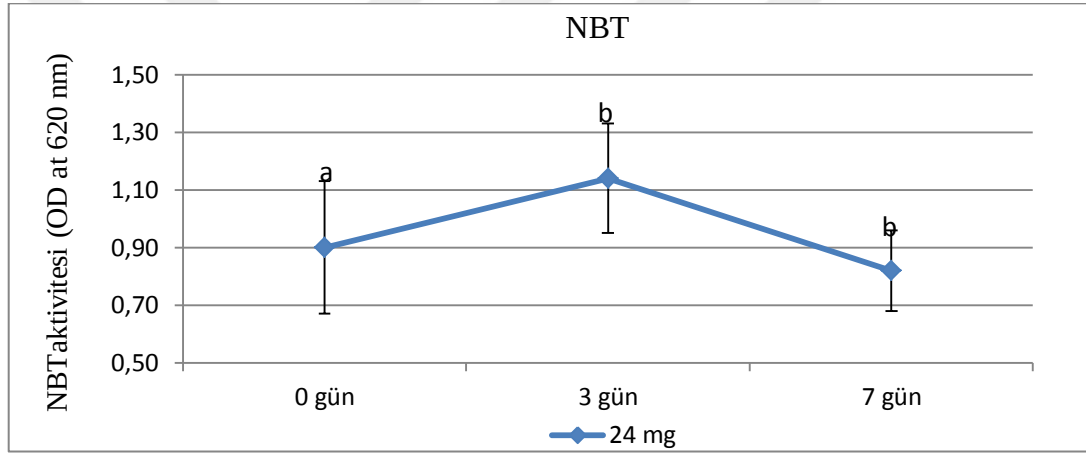
Solunumsal Patlama aktivite sonuçları Tablo (4.2)'de gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre, 0 günün sonunda 24 mg *E. purpurea* ile beslenen balık grubunda balıkların NBT aktivitesi önemli bir artış gösterirken, 36 mg *E. purpurea* ile tedavi edilen balık grubunun NBT aktivitesi 24 mg *E. purpurea* ile beslenen balık grubundan daha düşüktür ancak kontrol grubundaki balıklarla kıyaslandığında önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca, çalışmanın ikinci numune alma zamanı olan üçüncü gün, NBT değerleri, kontrol grubu balıklarıyla kıyaslandığında tüm karşılaştıran gruplarda önemli ölçüde artmıştır. 24 mg *E. purpurea* ile beslenen enfeksiyonlu grubun NBT değerleri 36 mg *E. purpurea* ile takviye edilen enfeksiyonlu grubun değerlerinden daha yüksektir. Ancak 7 günün sonunda, kontrol grubu balıkları ile kıyaslandığında, 24 mg *E. Purpurea* ile beslenen grubun solunum patlama aktivitesinde önemli olmayan değişiklikler görüldüğü kaydedilmiştir. Bu arada, kontrol grubu balıklarının aynı bilgileri ile kıyaslandığında, 36 mg *E. purpurea* ile beslenen balıkların solunum patlama aktivitesinde önemli bir düşüş gözlemlenmiştir. Diğer taraftan, en yüksek NBT değeri 7 gün sonra kaydedilmiştir (0.86 ± 0.30), bunu da 3 günlük veri (0.50 ± 0.22) takip etmektedir. En düşük değerler ise 0 gün sonra kaydedilmiştir (0.44 ± 0.40) (Grafik 4.4). Benzer şekilde, 24 mg *E. purpurea*'nın kullanımından sonraki en yüksek NBT değeri 3. günde ortaya çıkmıştır (1.14 ± 0.19) ve bu değeri 0. gün takip etmektedir (0.90 ± 0.23). En düşük değerler ise ikisinde de önemli ölçüde düşüşle (0.82 ± 0.14) 7 gün sonra görülmüştür (Grafik 4.5). Ayrıca, 36 mg *E. purpurea*'nın kullanımını takip eden en yüksek NBT değeri 3. günde ortaya çıkmıştır (0.98 ± 0.24), onu 0. günde ortaya çıkan değerler takip etmektedir (0.76 ± 0.16), en düşük değerler ise 7 gün sonra her ikisinde de önemli ölçüde düşüş göstererek (0.67 ± 0.14) ortaya çıkmıştır (Grafik 4.6).

Tablo 4.2. *A. hydrophila* ile immune edilmiş Sazan Balığı'nın baş böbrek lökositleri tarafından solunumsal patlama aktivitesi üretimi.

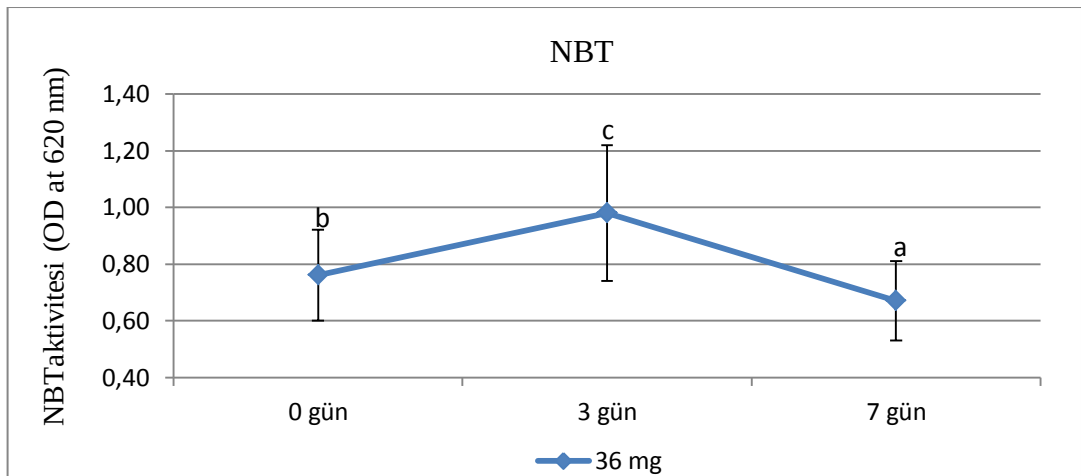
Gruplar	Çalışma Günleri		
	0 gün	3 gün	7 gün
Control	0.44 ± 0.40^{aA}	0.50 ± 0.22^{aA}	0.86 ± 0.30^{aB}
24 mg	0.90 ± 0.23^{bA}	1.14 ± 0.19^{bB}	0.82 ± 0.14^{aA}
36 mg	0.76 ± 0.16^{bA}	0.98 ± 0.24^{cB}	0.67 ± 0.14^{bA}



Grafik 4.4. Gün süreyle Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltilisi ile beslenen Sazan Balıklarının NBT Aktivitesi.



Grafik 4.5. Gün süreyle 24 mg *E. purpurea* ile beslenen Sazan Balıklarının NBT Aktivitesi.



Grafik 4.6. Gün süreyle 36 mg *E. purpurea* ile beslenen Sazan Balıklarının NBT Aktivitesi.

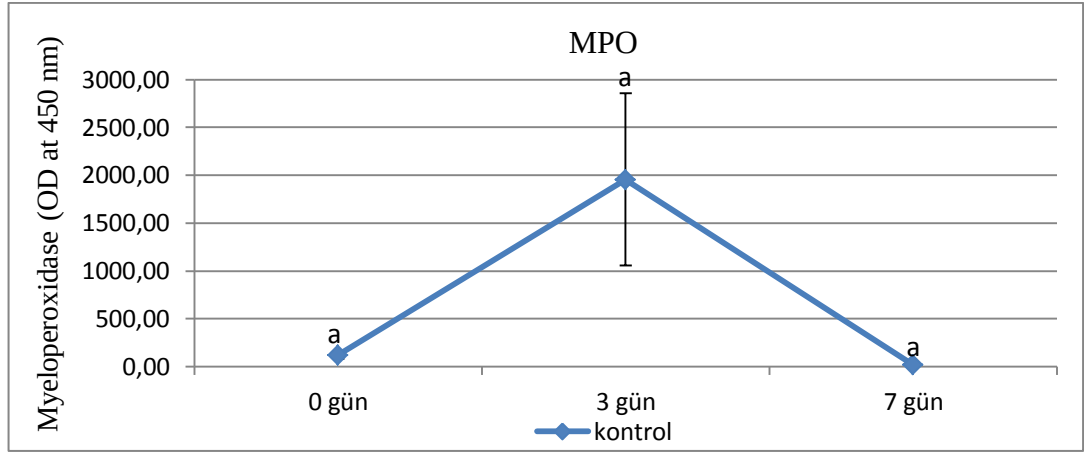
4.1.3. Miyeloperoksidaz Aktivite

Tablo (4.3) Deney 1’deki miyeloperoksidaz aktiviteyi (MPO) göstermektedir. 0. gündeki enfeksiyonu takip eden 7 saatte 24 mg *E. purpurea* verilmiş grupta kontrol grubu ile kıyaslandığında MPO aktivitesi önemli ölçüde artarken ($P < 0.05$), 36 mg *E. purpurea* verilen grubun MPO aktivitelerinde önemli değişiklik kaydedilmemiştir. Diğer taraftan, çalışmanın 3. gününde farklı tedavi grupları arasındaki MPO aktivitesi artmış ve en yüksek değer 36 mg *E. purpurea* ile tedavi edilen grupta bulunmuştur. Ancak kontrol grubu ile kıyaslandığında kayda değer bir artış göstermemişlerdir. Ancak, enfeksiyondan 7 gün sonra, 24 mg *E. purpurea* ile tedavi edilen gruptaki MPO aktivitesinde önemli bir artış ($P < 0.05$) gözlenirken, kontrol grubu ile kıyaslandığında 36 mg *E. purpurea* ile tedavi edilen grupta kayda değer olmayan değişiklikler ($P < 0.05$) gözlenmiştir. Bununla birlikte, kontrollerde en yüksek MPO değerleri 3 gün sonra kaydedilmiş (1954 ± 90.56) ve 7. günde kaydedilen en düşük değerle oldukça yüksek farklılıklar göstermiştir (17.13 ± 4.42) (Grafik 4.7). Benzer şekilde, 24 mg *E. purpurea*’nın kullanımını takip eden en yüksek MPO değeri 3 günde ortaya çıkmış (886.917 ± 30), bunu önemli bir düşüşle 0. gün takip etmiş (462 ± 142), en düşük değerlerse 7 gün sonra kaydedilmiştir (26.79 ± 8.1) (Grafik 4.8). Ayrıca, 36 mg *E. purpurea*’nın kullanımını takiben en yüksek MPO değeri 3. günde ortaya çıkmış (929.18 ± 38), bunu büyük bir düşüşle 0. gün takip etmiş (201.10 ± 11), en düşük değerlerse 7 gün sonra kaydedilmiştir (18.61 ± 5.50) (Grafik 4.8).

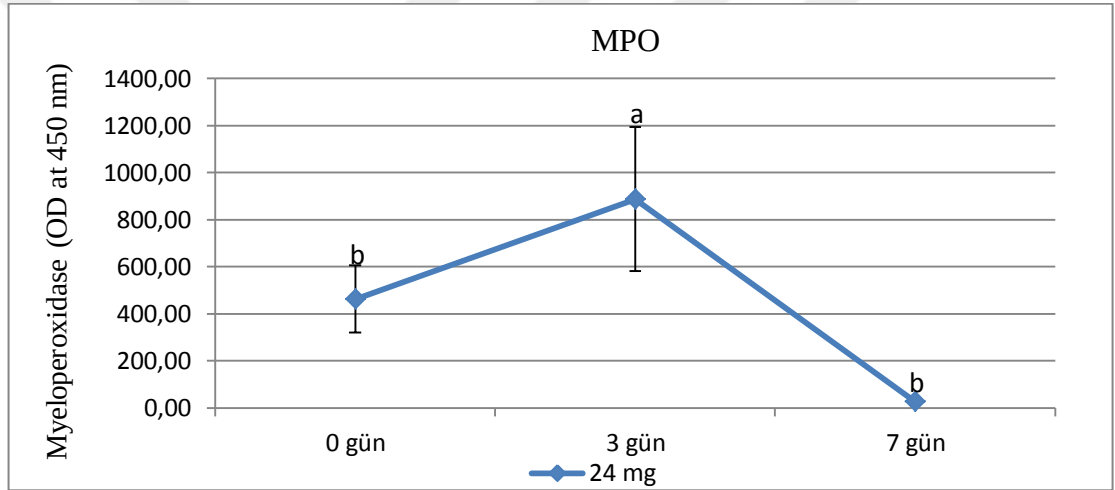
Tablo 4.3. *A. hydrophila* ile immunize edilmiş Sazan balığının baş-böbrek lökositleri tarafından üretilen MPO aktivitesi.

Gruplar	Çalışma günleri		
	0 gün	3 gün	7 gün
Control	119.06 ± 39.6^{aA}	1954 ± 90.56^{aB}	17.13 ± 4.42^{aC}
24 mg	462 ± 142^{bA}	886.91 ± 30^{bB}	26.79 ± 8.1^{bC}
36 mg	201.10 ± 11^{aA}	929.18 ± 38^{bB}	18.61 ± 5.50^{aC}

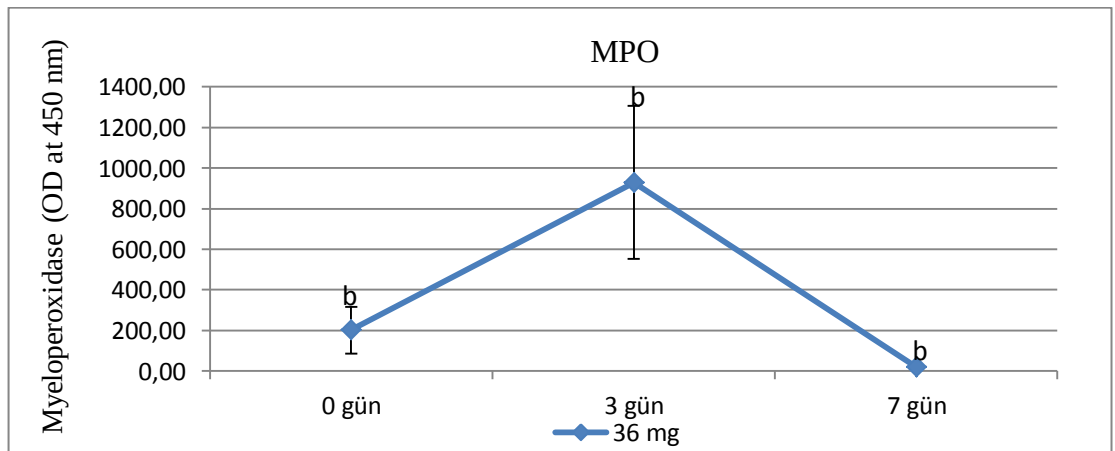
Deney 1’deki değişik grupların MPO aktivitesi. Küçük harf gruplar arası farklılığı, büyük harf aynı grubun çalışma günleri arasındaki farklılığı göstermektedir.



Grafik 4.7. Gün süreyle Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi ile beslenen Sazan Balıklarının Miyeloperoksidaz (MPO) içeriği.



Grafik 4.8. Gün süreyle 24 mg *E. purpurea* ile beslenen Sazan Balıklarının Miyeloperoksidaz (MPO) içeriği.



Grafik 4.9. Gün süreyle 36 mg *E. purpurea* ile beslenen Sazan Balıklarının Miyeloperoksidaz (MPO) içeriği.

4.2. Deney –II

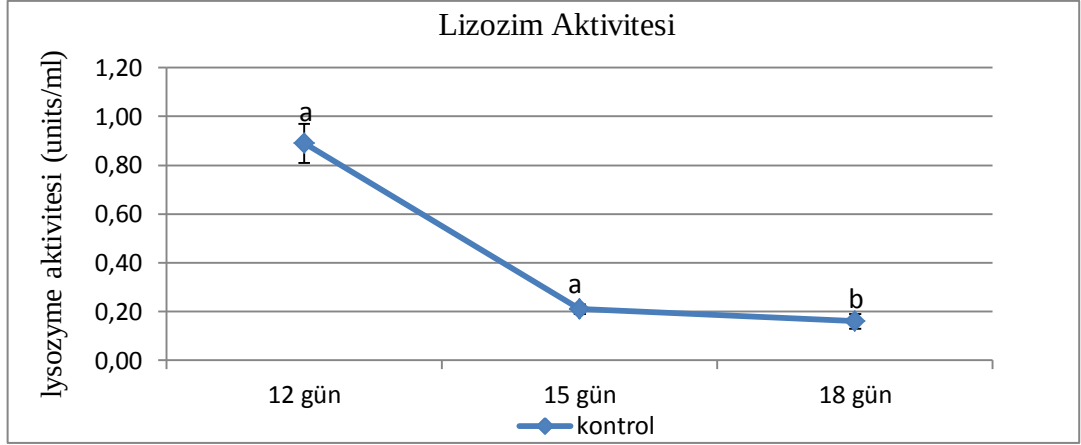
7 günlük besleme denemesinden sonra balıklar *A. hydrophila* ile aşılanır ve beş gün sonra hematolojik parametreler üzerinde çalışılır.

4.2.1. Lizozim Aktivitesi

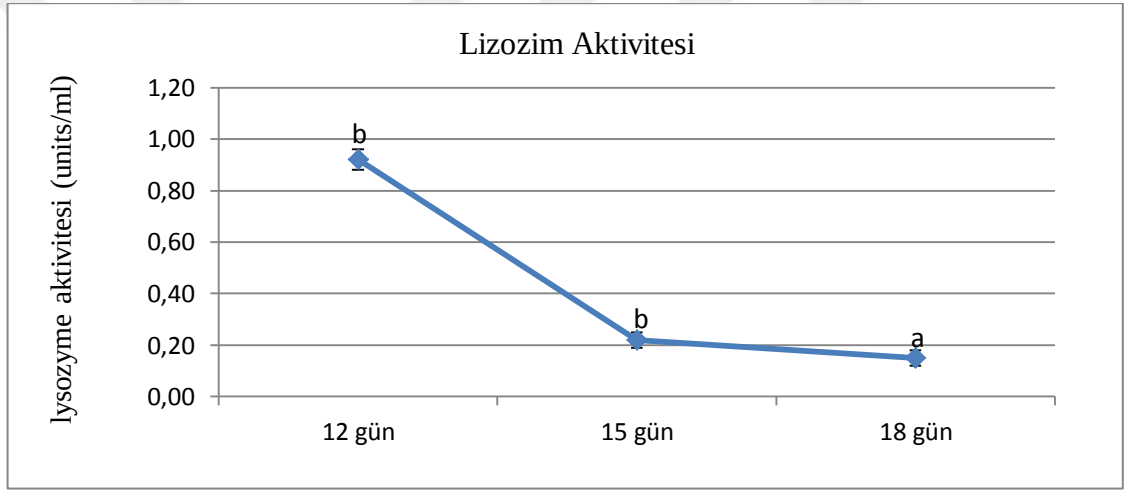
LA aktivitesi sonuçları Tablo (4.4)'de gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre, 12 günün sonunda, 36 mg *E. purpurea* ile tedavi edilen grupta kıyaslandığında, 24 mg *E. purpurea* ile tedavi edilen grupta lizozim aktivitesi artmıştır; ancak kontrol grubu ile kıyaslandığında iki grup da istatistiksel olarak kayda değer bir değişiklik göstermemiştir. Yine 15 günün sonunda, kontrol grubu ile kıyaslandığında, tedavi edilen hiçbir grubun lizozim aktivitesinde istatistiksel bir farklılık bulunmamaktadır ($P < 0.05$). Kontrol grubu ile kıyaslandığında, 18 gün sonunda tedavi edilen tüm gruplardaki lizozim aktivitesinde benzer bir durum kaydedilmiştir. Diğer taraftan, kontrollerde en yüksek LA değeri 12 günde kaydedilmiş (0.89 ± 0.08), bu değeri 15 gün verileri takip etmiş (0.21 ± 0.02), en düşük değerler ise 18 gün sonunda kaydedilmiştir (0.16 ± 0.03) (Grafik 4.10). Benzer şekilde, 24 mg *E. purpurea*'nın kullanımını takip eden en yüksek LA değeri 12 günde açığa çıkmış, (0.92 ± 0.04), bunu 15 gün takip etmiş (0.22 ± 0.03), en yüksek değerler ise 18 gün sonrasında alınmıştır (0.15 ± 0.03). 12 gün grubu ile kıyaslandığında diğer ikisinde de kayda değer düşüş gözlenmiştir (Grafik 4.11). Ayrıca, 36 mg *E. purpurea*'nın kullanımını takip eden en yüksek LA değeri 12. günde açığa çıkmış (0.80 ± 0.09), bunu 15. gün takip etmiş (0.21 ± 0.01), en düşük değerler ise 18. gün sonunda ortaya çıkmıştır (0.15 ± 0.02), 12 gün grubu ile kıyaslandığında diğer ikisinde de kayda değer bir düşüş gözlenmiştir (Grafik 4.12).

Tablo 4.4. *A. hydrophila* ile immunize edilmiş Sazan balığının baş- böbrek lökositlerince üretilen LA.

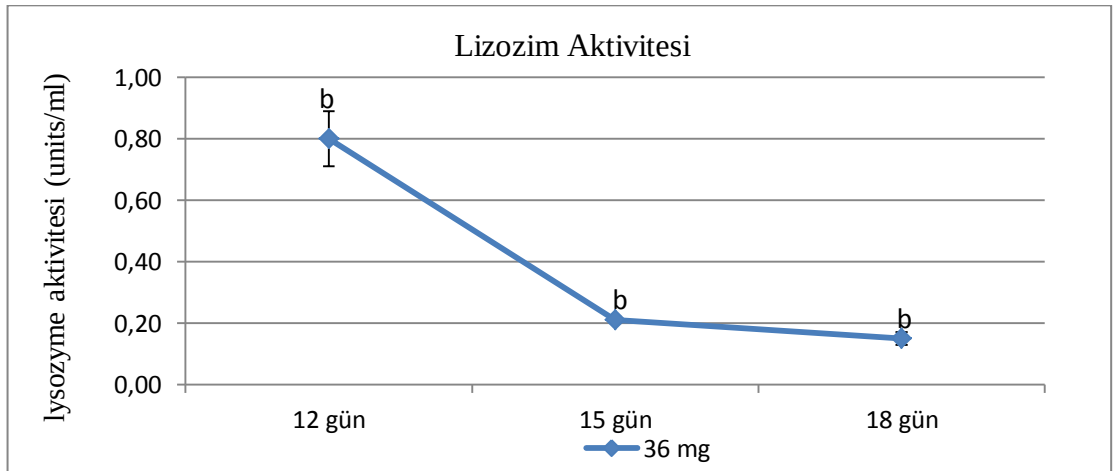
Gruplar	Çalışma günleri		
	12 gün	15 gün	18 gün
Kontrol	0.89 ± 0.08^{aA}	0.21 ± 0.02^{aB}	0.16 ± 0.03^{aB}
24 mg	0.92 ± 0.04^{aA}	0.22 ± 0.03^{aB}	0.15 ± 0.03^{aB}
36 mg	0.80 ± 0.09^{aA}	0.21 ± 0.01^{aB}	0.15 ± 0.02^{aB}



Grafik 4.10. Gün süreyle Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi ile beslenen Sazan Balıklarının Lizozim Aktivitesi.



Grafik 4.11. Gün süreyle 24 mg *E. purpurea* ile beslenen Sazan Balıklarının Lizozim Aktivitesi.



Grafik 4.12. Gün süreyle 36 mg *E. purpurea* ile beslenen Sazan Balıklarının Lizozim Aktivitesi.

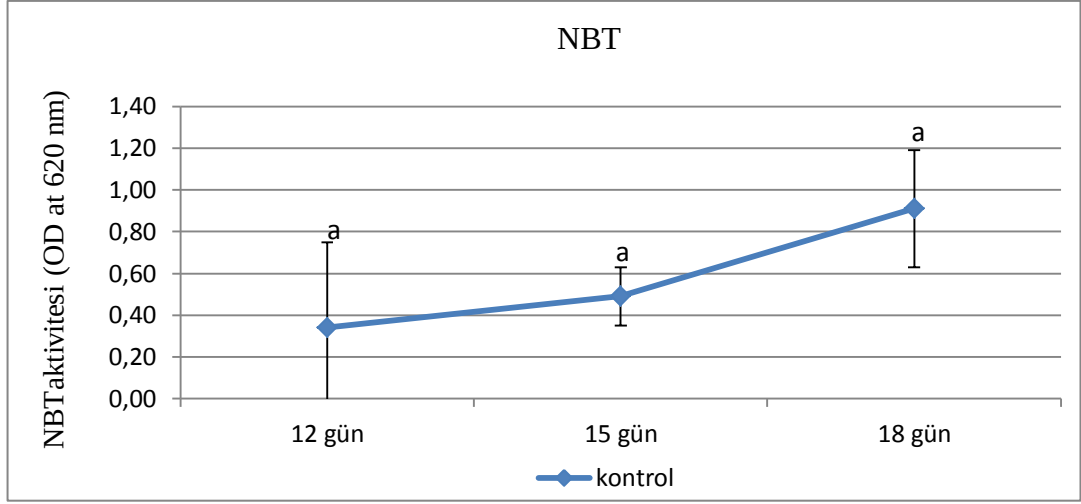
4.2.2. Solunumsal Patlama Deneyi

Bu çalışmadaki NBT aktivitesi Tablo 4.5’de özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre, 12 gün sonunda balıkların NBT değerleri 24 mg *E. purpurea* ile beslenen grupta kayda değer bir artış gösterirken, 36 mg *E. purpurea* ile tedavi edilen balık grubundaki NBT değerleri 24 mg *E. purpurea* ile beslenen grubunkinden daha düşüktür ancak kontrol balıkları ile kıyaslandığında kayda değer bir artış gözlenmiştir ($P < 0.05$). Yine 15. gün sonunda, kontrol balık grubu ile kıyaslandığında, iki rakip grup (24mg and 36 mg)’daki NBT’de kayda değer bir artış söz konusudur. 24 mg *E. purpurea* ile beslenen aşılınmış grubun NBT değerleri 36 mg *E. purpurea* ile beslenen aşılınmış grubun NBT değerlerinden daha yüksektir. Diğer taraftan, kontrol balıkları ile kıyaslandığında, 24 mg *E. purpurea* ile beslenen grubun 18 günün sonunda solunumsal patlama aktivitesinde kayda değer bir artış ($P < 0.05$) kaydedilirken, 36 mg *E. purpurea* ile beslenen balıkların solunumsal patlama aktivitesinde kayda değer bir değişiklik ($P < 0.05$) gözlenmemiştir. Diğer taraftan, kontrollerde en yüksek NBT değeri 18. gün sonunda kaydedilmiş (0.91 ± 0.28), ardından 15. gün verileri gelmiş (0.49 ± 0.14), en düşük değerler ise 12. gün sonunda kaydedilmiştir (0.34 ± 0.41) (Grafik 4.13). Ancak, 24 mg *E. purpurea*’nın kullanımını takiben en yüksek NBT değeri 15. günde açığa çıkmış (1.54 ± 0.32), bunu 18. gün takip etmiş (1.17 ± 0.45), en düşük değerler ise 12. gün sonunda kaydedilmiştir (1.09 ± 0.42), her ikisinin de kayda değer bir farklılığı yoktur (Grafik 4.14). Ayrıca, 36 mg *E. purpurea*’nın kullanımını takip eden en yüksek NBT değeri 15 günde açığa çıkmış (1.35 ± 0.26), bunu 18 gün izlemiş (0.96 ± 0.16), en düşük değerler ise 12 gün sonunda kaydedilmiştir (0.63 ± 0.16) (Grafik 4.15).

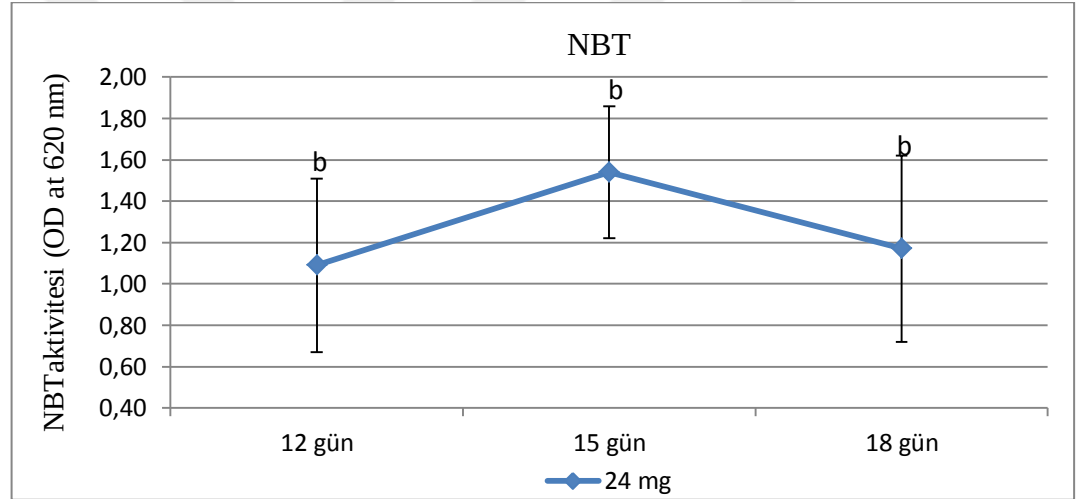
Tablo 4.5. *A. hydrophila* ile aşılınan Sazan balığının baş – böbrek lökositlerinin solunumsal patlama aktivitesi üretimi.

Gruplar	Çalışma günleri		
	12 gün	15 gün	18 gün
Control	0.34 ± 0.41^{aA}	0.49 ± 0.14^{aB}	0.91 ± 0.28^{aC}
24 mg	1.09 ± 0.42^{bA}	1.54 ± 0.32^{bB}	1.17 ± 0.45^{bA}
36 mg	0.63 ± 0.16^{cA}	1.35 ± 0.26^{cB}	0.96 ± 0.16^{aC}

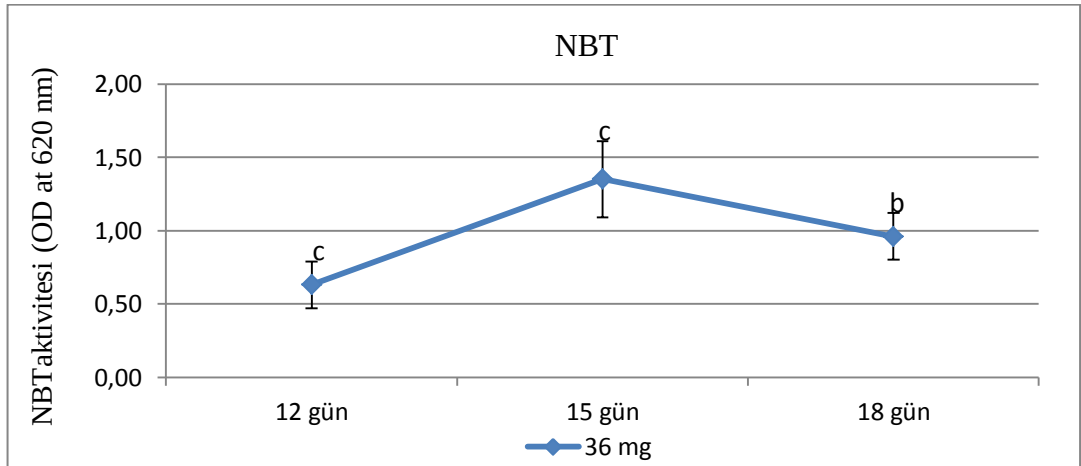
Deney 2’deki farklı grupların NBT aktivitesi. Küçük harf gruplar arası farklılıkları, büyük harf aynı grubun çalışma günleri arasındaki farklılığı göstermektedir.



Grafik 4.13. Gün süreyle Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi ile beslenen Sazan Balıklarının NBT Aktivitesi.



Grafik 4.14. Gün süreyle 24 mg *E. Purpurea* ile beslenen Sazan Balıklarının NBT Aktivitesi.



Grafik 4.15. Gün süreyle 36 mg *E. Purpurea* ile beslenen Sazan Balıklarının NBT Aktivitesi.

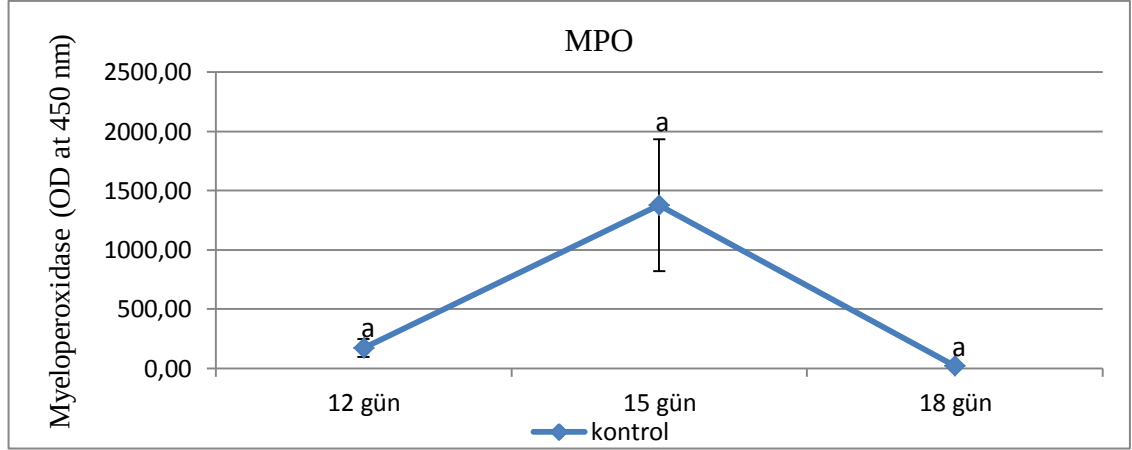
4.2.3. Miyeloperoksidaz Aktivite

MPO aktivitesi sonuçları Tablo (4.6)'da gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre, 12 günlük besleme deneyinin sonunda, kontrol grubu ile kıyaslandığında, 24 mg *E. purpurea* ile tedavi edilen grupların MPO aktivitesinde kayda değer bir artış gösterilirken, 36 mg *E. purpurea* ile tedavi edilen grupta önemli bir düşüş gözlenmiştir. Aşılamadan 15 gün sonra, kontrol grubu ile kıyaslandığında, tedavi edilen tüm grupların MPO aktivitesinde kayda değer bir düşüş gözlenmiştir, ancak deney grupları arasında, en yüksek MPO aktivite seviyesi 24 mg *E. purpurea* ile tedavi edilen grupta kaydedilmiştir. Diğer taraftan, 18 gün besleme deneyinin sonunda, kontrol sazan balıkları ile kıyaslandığında, 24 mg *E. purpurea* ile tedavi edilen grubun MPO seviyelerinde kayda değer bir artış gözlenirken, 36 mg *E. purpurea* ile beslenen grupta önemli ölçüde bir düşüş ($P < 0.05$) gözlenmiştir. Bununla birlikte, kontrollerde en yüksek MPO değeri 15 günün sonunda kaydedilmiş (1377 ± 558) ve 18. günde kaydedilen en düşük değerlerle oldukça yüksek farklılık göstermiştir (18.42 ± 2.9) (Grafik 4.16). Benzer şekilde, 24 mg *E. purpurea*'nın kullanımını takip eden en yüksek MPO değeri 15. günde ortaya çıkmıştır (1044 ± 231), bunu kayda değer bir düşüşle 12. gün izlemiş (275.51 ± 184), en düşük değerler ise 18. gün sonunda kaydedilmiştir (87.82 ± 9.6) (Grafik 4.17). Ayrıca, 36 mg *E. purpurea*'nın kullanımını takiben en yüksek MPO 15. günde ortaya çıkmış (95.37 ± 32), bunu 18. gün takip etmiş (33.95 ± 16), en düşük değerler ise 12. günün sonunda kaydedilmiştir (32.27 ± 16). 15 gün ile kıyaslandığında her ikisinde de kayda değer bir düşüş vardır (Grafik 4.18). En yüksek MPO aktivitesi değerlerinin 24 mg *E. purpurea* ile beslenen grupta olduğu farkedilmektedir.

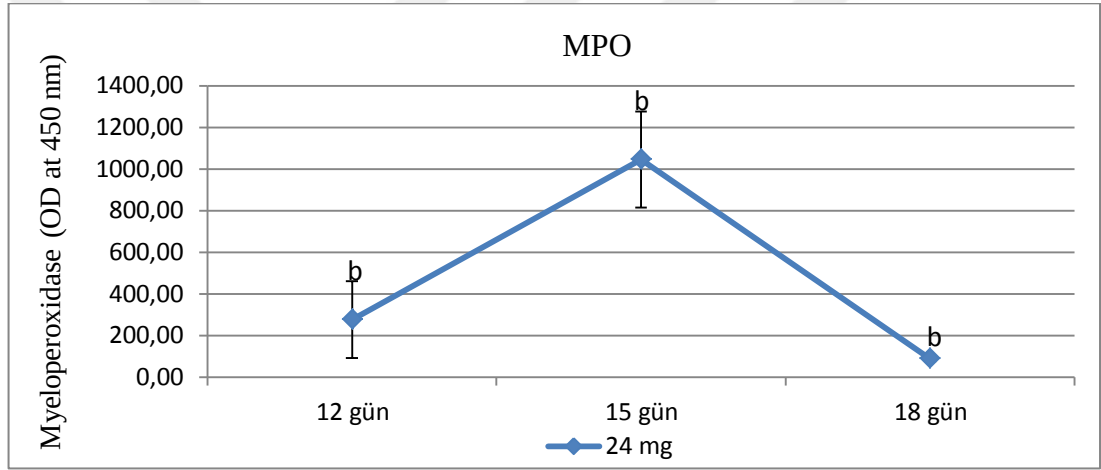
Tablo 4.6. *A. hydrophila* ile aşılanan Sazan balıklarının baş-böbrek lökositlerinin MPO aktivitesi üretimi.

Gruplar	Çalışma günleri		
	12 gün	15 gün	18 gün
Kontrol	171.62 ± 73^{aA}	1377 ± 558^{aB}	18.42 ± 2.9^{aC}
24 mg	275.51 ± 184^{bA}	1044 ± 231^{bB}	87.82 ± 9.6^{bC}
36 mg	32.27 ± 16^{aA}	95.37 ± 32^{cB}	33.95 ± 16^{cA}

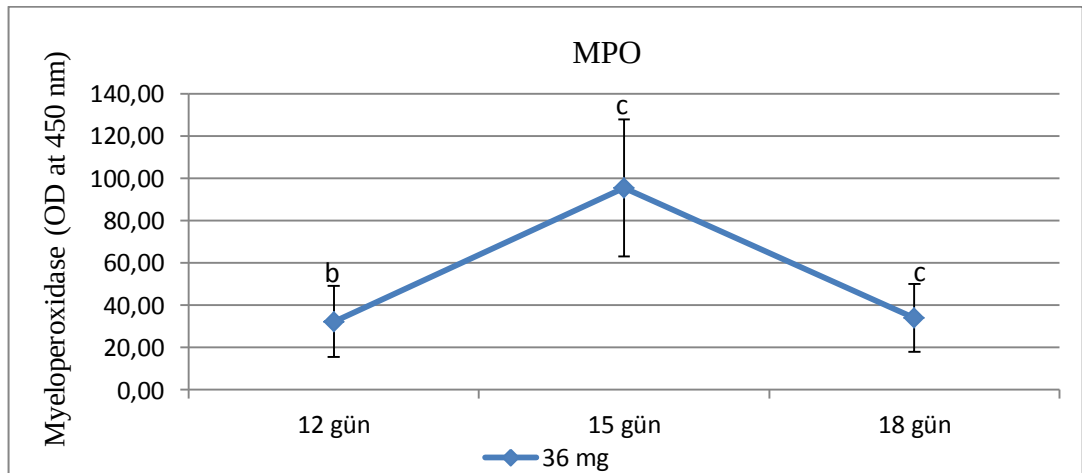
Deney 2'deki değişik grupların MPO aktivitesi. Küçük harf gruplar arası farklılığı, büyük harf aynı grubun farklı çalışma günleri arasındaki farklılıklarını göstermektedir.



Grafik 4.16. Gün süreyle Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi ile beslenen Sazan Balıklarının Miyeloperoksidaz (MPO) içeriği.



Grafik 4.17. Gün süreyle 24 mg *E. purpurea* ile beslenen Sazan Balıklarının Miyeloperoksidaz (MPO) içeriği.



Grafik 4.18. Gün süreyle 36 mg *E. purpurea* ile beslenen Sazan Balıklarının Miyeloperoksidaz (MPO) içeriği.

5. TARTIŞMA

Her ne kadar sistemli antibiyotikler, dikkatli izleme ve agresif cerrahi müdahale aracılığıyla septik hastaların idaresinde ilerlemeler kaydedilmiş olsa da, çoklu organ bozulmaları ve septik şoklar cerrahi bakım ünitelerinde hala ölümlerin en geçerli sebebi olmaya devam etmektedir (Jones vd, 2008). Sepsisin patajenez ve teşhisinde büyük ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen, tatmin edici bir tedavi ortaya çıkmamıştır. Bu yüzden, sepsisin iyileştirilmesi ve hafifletilmesinde etkili bir tedavi yöntemi bulmak acil ve zorunludur. Geleneksel tıpta insanlar ve hayvanlardaki pek çok hastalığı tedavi etmek ve önlemek için bitkiler kullanılmıştır (Hosseinzadeh, Jafarikukhdan, Hosseini ve Armand, 2015). Fitoterapi (bitkisel tedavi), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından ilaç ve ilaç sentezlerinin imal edilmesi amacıyla bitki kökenli ürünler üzerinde çalışan bir bilim olarak tanımlanmıştır (Cristea vd, 2012). Bitkiler, farmakolojik özelliklere sahip olan ikincil metabolitler (Salim, Chin, ve Kinghorn, 2008) ve fitoöstrojen, flavanoid, polyphenols, isoprenoids, sulfur bileşikler, carotenoids, glycosides, saponins, monoterpenes, phenols, vitamins, fibers ve minerals içeren aktif bileşenler üretmelerinden dolayı biyolojik olarak paha biçilmez bir aktif molekül kaynağıdır (Huicab-Pech vd, 2016). *E. purpurea*'nın küresel olarak popüler olan bitkisel bir bağışıklık düzenleyici ve bağışıklık ayarlayıcı olduğu, insanlar, balıklar ve diğer hayvanlarda yapılan pek çok araştırma ile gösterilmiştir (Aly ve Mohamed, 2010; Hudson, 2012).

Lizozom, balıkları da içeren geniş bir omurgalı grubunda bulunur ve mikrobik saldırılara karşı savunucu faktörlerden biridir (Evelyn, 2002). Lizozim, enfeksiyon ve hastalıkları önlemek için fagosit ve kompleman sistemi aktive eden hem bakterisit hem de opsonin etkileri olan (Alexander ve Ingram, 1992), spesifik olmayan savunma mekanizmalarının hümmoral bir bileşenidir (Beutler, 2004). Bu enzimin bakterisit etkisi, hücre lizisine yol açan bakteriyel hücre duvarlarının peptidoglikanının hidrolizasyonunu kapsamaktadır. Lizozim öncelikli olarak gram-pozitif bakteriye karşı savunma ile ilişkilendirilmiştir, ancak gram-negatif bakteriye karşı da etkili bir şekilde savunma yaptığı görülmüştür (Magnadottir, 2006). Bu çalışma, işlem görmüş tüm gruplarda ilk deneyde 3. ve 7. günlerde lizozim

aktivitesinin arttığını göstermiştir. *Nile Tilapia*, diyetel *Echinacea purpurea* ekstraktı ile işlem gördüğünde, El-Sayed, El-Galil, ve Rashied (2014) tarafından da benzer sonuçlar gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, *Oreochromis niloticus* içindeki suda eriyen *Echinacea* ekstraktı da lizozim aktivitesinde artış göstermiştir (Aly, Mohamed ve George, 2008). Ancak, lizozim aktivitesindeki kayda değer artış *Echinacea*'nın spesifik ve spesifik olmayan immunostimulan rolünü gösterebilir. Bauer (1996), *E. purpurea* 'nın anten bölümlerinden ekstraktlar ve *E. pallida*, *E. angustifolia* ve *E. purpurea* 'nın köklerindeki alkollü ekstraktlar ile ilişkili farmolojik etkilerin *in vitro* ve *in vivo*'suna kanıt sağlamıştır. Etkiler daha çok glikoproteinler, polisakkaritler ve kafeik asit türevleri tarafından non-spesifik hücrel bağışıklık sisteminin değiştirilmesiyle bağlantılıdır. Bununla birlikte, çeşitli bağışıklık hücreleri (monositler, makrofajlar ve doğal öldürücü hücreler) *Echinacea* ekstraktı tarafından *in vitro*'da uyarılmıştır (Bauer, 1999; Rininger, Kickner, Chigurupati, McLean ve Franck, 2000). Buna karşılık, bu çalışmanın ikinci deneyinde *E. purpurea* 'nın aköz (sulu) ekstraktı ile beslemenin balığın lizozom aktivitesinde bütün deney aşamalarında herhangi bir kayda değer değişikliğe sebep olmadığı görülmüştür. Benzer şekilde, Mesbah ve Mohammadian (2015), *Echinacea* ekstraktı ile beslenen shirbottaki lizozom aktivitesinde de kayda değer bir değişiklik rapor etmemişlerdir. (Matthias, 2007; Cech, 2010) izole edilmiş *Echinacea* alkilamitlerinin bireysel olarak veya grup içinde değişmeden çeşitli kültürlenmiş hücrelerde bağışıklık süpresyonu gösterdiğini ve bunun bu çalışmanın ikinci deneyindeki lizozom aktivitesi üzerindeki belirgin süpresif etkiyi açıklayabileceğini rapor etmiştir.

Memelilerde bir doğuştan bağışıklık göstergesi olan lökosit solunumsal patlama aktivitesinin ilk gözlemleri, 1930'larda bazı araştırmacılar fagosit sürecin yükseltilmiş oksijen tüketimi ile ilişkilendirildiğini kavradığında ortaya çıkmıştır (Baldridge ve Gerard, 1933). Patojenlerin fagositozu boyunca lökositler NADPH oksidozu aracılığıyla oksijen tüketimini artırır ve çok çeşitli türlerde reaktif oksijen ara ürünler üretilir (Robinson, 2008). Bunlar, solunumsal patlama adı verilen süreç içinde hidroksit kökü ($\cdot\text{OH}$), süperoksit anyon kökü ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve single oksijen ($^1\text{O}_2$)'den oluşmaktadırlar (Munoz vd, 2000). Hidrojen peroksit ve süperoksit anyon oldukça zehirli ROS'dir ve etkili bir antibakteriyel sistemin zeminini oluştururlar (Klebanoff, 1999). Solunumsal patlamadan salınacak

olan ilk ürün süperoksit anyondur; bu yüzden bu aktiviteyi ölçerken kullanılan $O_2^{\bullet-}$ ölçęęi doğru bir metod olarak kabul edilmektedir (Secombes, 1990; Roch, 1999). $O_2^{\bullet-}$ 'yi ölçmek için kullanılan başlıca iki metod vardır: ilk olarak, ferrositokromun azaltılmasıyla belirlenen ekstraselüler $O_2^{\bullet-}$, ve ikinci olarak, nitrablu tatrazoliumun azaltılmasıyla belirlenen intraselüler $O_2^{\bullet-}$ (Düğenci, Arda ve Candan ,2003). Patojenlerin solunumsal patlama aktivitesi, balıklardaki spesifik olmayan bağışıklık belirtisi olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Anderson ve Siwicki, 1995; Sahoo ve Mukherjee, 2002; Sahoo vd, 2005). Bulgularımız göstermektedir ki, birinci deney süresince 7. gündeki sonuçlar hariç *E. purpurea* ekstraktı ile beslenen tüm rakip gruplarda solunumsal patlama kontrol grubununkinden daha yüksek çıkmıştır. *E. purpurea*'nın 24 mg aköz ekstraktını 0, 3 günde alan grupta daha yüksek solunumsal patlama gözlemlenmiştir. İkinci deneyde, *E. purpurea* ekstraktının en düşük dozu en yüksek solunumsal patlamayı göstermiştir. Aly ve Mohamed. (2010) *Echinacea* ekstraktı ile beslenen *Nile Tilapia*'da, El-Sayed vd, (2014) *Echinacea* ile beslenen *Nile Tilapia*'da ve Mesbah ve Mohammadian (2015) 0.5 % *Echinacea* ile beslenen shirbotda NBT değerlerinin arttığını rapor etmişlerdir.

Miyeloperoksidaz (MPO), H_2O_2 'nin klörür iyonu hipokloröz asite (HOCl) çevirme oksitleyici potansiyelini kullanan, makrofajlar ve nötrofiller tarafından gizlenmiş bir hemoproteindir (Savenkova, Mueller ve Heinecke, 1994). Etkili bir bakterisit ajan olan HOCl, istilacı bakteri, mantar ve virüslere karşı mücadele eden konak savunmalarının önemli bir bileşenidir (Rosen, Crowley ve Heinecke, 2002). Fagosit ve nötrofil aktiviteler spesifik olmayan bağışıklık tepkimelerinin belirtisi olarak rol oynayabilirler ve miyeloperoksidaz aktiviteler tarafından ölçülebilirler. Aslında pek çok yazar immunostimülanların farklı dozlarda uygulanmasından sonra MPO aktivitesinde artış kaydetmişlerdir. Örneğin, kürkümün (15 and 1.5 μ g) ile besledikten sonra *Labeo rohita*'daki MPO içeriği yükselmiştir (Behera, Swain, Sahoo, Mohapatra ve Das, 2011). Levamisol enjekte edilen sazan balıklarında artmış fagositik etki ve MPO etkisi bulan Siwicki de benzer sonuçlar elde etmiştir (1987; 1989). Ayrıca, (Bilen, Yılmaz, Bilen ve Biswas, 2014) tetranın metanolik ekstraktlarıyla beslenen sazan balıklarında artmış düzeyde MPO kaydetmişlerdir. Önceki bahsedilen çalışmalarla aynı fikirdedirler. Şu anki çalışmada, iki deney boyunca *E. purpurea*'nın 24 mg aköz ekstraktlarıyla beslenen gruplarda en yüksek

MPO değerleri kaydedilmiştir. Buna karşılık, siklofosfamid enjekte edilen Asya kedi balığı *Clarias batrachus*'ın MPO ve solunumsal patlamasında kayda değer bir dūřuř gōzlemlenmiřtir (Sahoo vd, 2005). En bol MPO nōtrofillerin ilk granüllerinde bulunduğu için, HK sūpernatant içindeki yūkseltilmiř MPO seviyeleri HK dokularındaki nōtrofil filtrelemelerinin varlığını açığa çıkarmaktadır. Son olarak, bu durumlardaki korumanın *E. purpurea* içeriğinin organizmalarla doğrudan temasından mı yoksa artırılmış fagositik aktivite ve organizmaların klirensinden mi, ya da bu ve diğer etkenlerin bir kombinasyonundan mı kaynaklandığı bu çalışmalarda açık değildir.



6. SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışma *Echinacea purpurea*'nın lizozom, miyeloperoksidaz ve solunum patlamaları gibi bazı spesifik olmayan bağışıklık verilerini uyararak ve düşük dozlarda immunostimülan olarak rol oynayarak mikrobiyal sepsiste etkili tedavi edici etkileri olduğunu temin etmektedir. Bu çalışmadaki bağışıklık verilerindeki artış, test edilmiş bileşiklerin deney balıklarının sağlığı üzerindeki etkililiğini gösterir niteliktedir. Bu çalışma *Echinacea purpurea*'nın septik balıklarda miyeloperoksidazı geliştirme kapasitesinin olduğuna kanıt sağlamaktadır. Böylece, septik hastaların bakımında *Echinacea purpurea*'nın potansiyel bir tedavi edici medikasyonu olduğunu ileri sürmekteyiz. Ancak, en uygun doz ve uygulama metodunu da içeren, ekstraksiyon ve tedavi metodu ile ilgili ileri çalışmalar yapılması gereklidir. *Echinacea purpurea* kullanarak değişik patojenik organizmalarla *Cyprinus carpio*'da yükleme testi yapmak, *E. purpurea* 'nın immunostimülan ürün olarak daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Alexander, J. B., & Ingram, G. A. (1992). Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 249-279.
- Aly, S. M., & Mohamed, M. F. (2010). *Echinacea purpurea* and *Allium sativum* as immunostimulants in fish culture using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94(5), e31-e39.
- Aly, S. M., Mohamed, M. F., & George, J. (2008). *Echinacea* as immunostimulatory agent in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) via earthen pond experiment. In *8th international symposium on Tilapia in aquaculture*.
- Aly, S., John, G., El-Naggar, G., & Mohamed, F. (2007). Effect of *Echinacea* on body gain, survival and some hematological and immunological parameters of *Oreochromis niloticus* and their response to challenge infection. *Egypt J Aquat Biol Fish*, 113, 435-445.
- Anderson, D. P., & Siwicki, A. K. (1995). Basic hematology and serology for fish health programs.
- Awad, E. S. (2010). *Studies on plant based dietary supplements for control of Aeromonas hydrophila infections in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum)* (Doctoral dissertation, Heriot-Watt University).
- Baldrige, C. W., & Gerard, R. W. (1932). The extra respiration of phagocytosis. *American Journal of Physiology--Legacy Content*, 103(1), 235-236.
- Bauer, R. (1996). [Echinacea drugs--effects and active ingredients]. *Zeitschrift für arztliche Fortbildung*, 90(2), 111-115.
- Bauer, R. (1999). Chemistry, analysis and immunological investigations of Echinacea phytopharmaceuticals. In *Immunomodulatory agents from plants*(pp. 41-88). Birkhäuser Basel.
- Behera, T., Swain, P., Sahoo, S. K., Mohapatra, D., & Das, B. K. (2011). Immunostimulatory effects of curcumin in fish, *Labeo rohita* (H.). *Indian J Nat Prod Resour*, 2, 18.
- Binns, S. E., Baum, B. R., & Arnason, J. T. (2002). A taxonomic revision of Echinacea (Asteraceae: Heliantheae). *Systematic Botany*, 27(3), 610-632.

- Bilen, S., Biswas, G., Otsuyama, S., Kono, T., Sakai, M., & Hikima, J. I. (2014). Inflammatory responses in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) head kidney cells stimulated with an inflammasome-inducing agent, nigericin. *Developmental & Comparative Immunology*, 46(2), 222-230.
- Bilen, S., Yilmaz, S., Bilen, A. M., & Biswas, G. (2014). Effects of Dietary Incorporation of Tetra (*Cotinus coggygia*) Extract on Immune Response and Resistance to *Aeromonas hydrophila* in Koi Carp (*Cyprinus carpio*). *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*.
- Biswas, G., Korenaga, H., Nagamine, R., Kawahara, S., Takeda, S., Kikuchi, Y., & Sakai, M. (2013). Cytokine mediated immune responses in the Japanese pufferfish (*Takifugu rubripes*) administered with heat-killed *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* (06TCa22) isolated from the Mongolian dairy product. *International immunopharmacology*, 17(2), 358-365.
- Bongers, A. B. J., Sukkel, M., Gort, G., Komen, J., & Richter, C. J. J. (1998). Development and use of genetically uniform strains of common carp in experimental animal research. *Laboratory Animals*, 32(4), 349-363.
- Braun-Nesje, R., Kaplan, G., & Seljelid, R. (1982). Rainbow trout macrophages in vitro: morphology and phagocytic activity. *Developmental & Comparative Immunology*, 6(2), 281-291.
- Brenden, R. A., & Huizinga, H. W. (1986). Pathophysiology of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in goldfish, *Carassius auratus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 9(2), 163-167.
- Chabot, D. J., & Thune, R. L. (1991). Proteases of the *Aeromonas hydrophila* complex: identification, characterization and relation to virulence in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Diseases*, 14(2), 171-183.
- Cichello, S. A., Yao, Q., & He, X. Q. (2016). Proliferative activity of a blend of *Echinacea angustifolia* and *Echinacea purpurea* root extracts in human vein epithelial, HeLa, and QBC-939 cell lines, but not in Beas-2b cell lines. *Journal of traditional and complementary medicine*, 6(2), 193-197.
- Cihan, B., Yarat, A., Tunalı Akbay, T., & Şener, G. (2015). Investigation of the effect of silymarin on the liver in experimental sepsis.
- Cristea, V., Antache, A., Grecu, I., Docan, A., Dediu, L., & Mocanu, M. C. (2012). The use of phytobiotics in aquaculture. *Lucrări Ştiinţifice–Seria Zootehnie*, 57, 250-255.
- Dügenci, S. K., Arda, N., & Candan, A. (2003). Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(1), 99-106.

- El-Sayed, S. A., El-Galil, S. Y. A., & Rashied, N. A. (2014). Effects Of Some Herbal Plants As Natural Feed Additives In Comparison With Antibiotic On Growth Performance And Immune Status Of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture*, 4(1), 22-30.
- Evelyn, T. P. T. (2002). Finfish immunology and its use in preventing infectious diseases in cultured finfish. *Diseases in Asian Aquaculture IV (Fish Health Section)*, 303-324.
- Feng, C. Y., Johnson, S. C., Hori, T. S., Rise, M., Hall, J. R., Gamperl, A. K., ... & Rise, M. L. (2009). Identification and analysis of differentially expressed genes in immune tissues of Atlantic cod stimulated with formalin-killed, atypical *Aeromonas salmonicida*. *Physiological genomics*, 37(3), 149-163.
- Goey, A. K., Meijerman, I., Rosing, H., Burgers, J. A., Mergui-Roelvink, M., Keessen, M., & Schellens, J. H. (2013). The effect of *Echinacea purpurea* on the pharmacokinetics of docetaxel. *British journal of clinical pharmacology*, 76(3), 467-474.
- Goldhaber-Fiebert, S., & Kemper, K. J. (1999). *Echinacea (E. angustifolia, E. pallida, and E. Purpurea)*. *The Longwood Herbal Task Force and The Center for Holistic Pediatric Education and Research*.
- Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A., & Armand, R. (2015). The Application of Medicinal Plants in Traditional and Modern Medicine: A Review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*, 6(9), 635.
- Hudson, J. B. (2011). Applications of the phytomedicine *Echinacea purpurea* (Purple Coneflower) in infectious diseases. *BioMed Research International*, 2012.
- Huicab-Pech, Z. G., Landeros-Sánchez, C., Castañeda-Chávez, M. R., Lango-Reynoso, F., & López-Collado, C. J. (2016). Current State of Bacteria Pathogenicity and their Relationship with Host and Environment in Tilapia *Oreochromis niloticus*. *J Aquac Res Development*, 7(428), 2.
- Izzo, A. A., & Ernst, E. (2009). Interactions between herbal medicines and prescribed drugs. *Drugs*, 69(13), 1777-1798.
- Jones, A. E., Brown, M. D., Trzeciak, S., Shapiro, N. I., Garrett, J. S., Heffner, A. C., & Kline, J. A. (2008). The effect of a quantitative resuscitation strategy on mortality in patients with sepsis: a meta-analysis. *Critical care medicine*, 36(10), 2734.
- Klebanoff, S. J. (1999). *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlations*.

- Kolkovski, S., & Kolkovski, J. (2011). Herbal medicine in aquaculture. *International aquafeed*, 14(2), 28-31.
- Kumar, K. M., & Ramaiah, S. (2011). Pharmacological importance of *Echinacea purpurea*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(4), 304-314.
- Kumari, J., & Sahoo, P. K. (2005). Effects of cyclophosphamide on the immune system and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus*. *Fish & shellfish immunology*, 19(4), 307-316.
- Lienert, D., Anklam, E., & Panne, U. (1998). Gas chromatography-mass spectral analysis of roots of *Echinacea* species and classification by multivariate data analysis. *Phytochemical Analysis*, 9(2), 88-98.
- Loisa, P. (2008). *Anti Inflammatory Response in Severe Sepsis and Septic Shock* (Doctoral dissertation, Doctoral Dissertation. University of Kuopio).
- Matthias, A., Banbury, L., Bone, K. M., Leach, D. N., & Lehmann, R. P. (2008). *Echinacea* alkylamides modulate induced immune responses in T-cells. *Fitoterapia*, 79(1), 53-58.
- Matthias, A., Banbury, L., Stevenson, L. M., Bone, K. M., Leach, D. N., & Lehmann, R. P. (2007). Alkylamides from *Echinacea* modulate induced immune responses in macrophages. *Immunological Investigations*, 36(2), 117-130.
- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & shellfish immunology*, 20(2), 137-151.
- Mesbah, M., & Mohammadian, T. (2015). Effects of dietary *Aloe vera* and *Echinacea* on some nonspecific immunity in shirbot (*Barbus grypus*). *Iranian Journal of Aquatic Animal Health*, 2(1), 24-36.
- Mishima, S., Saito, K., Maruyama, H., Inoue, M., Yamashita, T., Ishida, T., & Gu, Y. (2004). Antioxidant and immuno-enhancing effects of *Echinacea purpurea*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(7), 1004-1009.
- Mistrikova, I., & Vaverkova, S. (2006). *Echinacea*—chemical composition, immunostimulatory activities and uses. *Thaiszia J Bot*, 16, 11-26.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., van der Knaap, W. P., Mialhe, E., & Bachère, E. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 191(1), 89-107.
- Kanne, P., Lakshmi, V., & Dakshinamurthy, K. (2013). Sepsis due to *Aeromonas hydrophila*: Case report. *International Journal of Infection Control*, 9(4).

- Kumar-Velmurugan, B., Jiang, F., Shih, H. Y., Lee, D. N., & Weng, C. F. (2012). Respiratory burst activity in head kidney and spleen leukocytes of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) under acute osmotic stress. *Zoological Studies*, 51(8), 1290-1297.
- O'Callaghan, D., & Vergunst, A. (2010). Non-mammalian animal models to study infectious disease: worms or fly fishing?. *Current opinion in microbiology*, 13(1), 79-85.
- Oskoi, S. B., Kohyani, A. T., Parseh, A., Salati, A. P., & Sadeghi, E. (2012). Effects of dietary administration of *Echinacea purpurea* on growth indices and biochemical and hematological indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *Fish physiology and biochemistry*, 38(4), 1029-1034.
- Pietta, P., Mauri, P., & Bauer, R. (1998). MEKC analysis of different *Echinacea* species. *Planta medica*, 64(07), 649-652.
- Pilkington, K., Consortium, C., & January, U. (2015). *Echinacea* spp Abstract and key points, 1-10.
- Przybylska, D. A. (2012). Mucosal immune response in common carp (*Cyprinus carpio* L.).
- Pakravan, S., Hajimoradloo, A., & Ghorbani, R. (2012). Effect of dietary willow herb, *Epilobium hirsutum* extract on growth performance, body composition, haematological parameters and *Aeromonas hydrophila* challenge on *Cyprinus carpio*. *Aquaculture research*, 43(6), 861-869.
- Rattmann, Y. D., de Souza, L. M., Malquevicz-Paiva, S. M., Dartora, N., Sasaki, G. L., Gorin, P. A., & Iacomini, M. (2012). Analysis of flavonoids from *Eugenia uniflora* leaves and its protective effect against murine sepsis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., & Sasal, P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. *Aquaculture*, 433, 50-61.
- Rininger, J. A., Kickner, S., Chigurupati, P., McLean, A., & Franck, Z. (2000). Immunopharmacological activity of *Echinacea* preparations following simulated digestion on murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of leukocyte biology*, 68(4), 503-510.
- Robinson, J. M. (2008). Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochemistry and cell biology*, 130(2), 281-297.
- Rosen, H., Crowley, J. R., & Heinecke, J. W. (2002). Human neutrophils use the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to chlorinate but not nitrate bacterial proteins during phagocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 30463-30468.

- Salim, A. A., Chin, Y. W., & Kinghorn, A. D. (2008). Drug discovery from plants In: Bioactive Molecules and Medicinal plants, Ramawat KG, Merillon JM, eds.
- Sahoo, P. K., & Mukherjee, S. C. (2002). The effect of dietary immunomodulation upon *Edwardsiella tarda* vaccination in healthy and immunocompromised Indian major carp (*Labeo rohita*). *Fish & Shellfish Immunology*, 12(1), 1-16.
- Sahoo, P. K., Kumari, J., & Mishra, B. K. (2005). Non-specific immune responses in juveniles of Indian major carps. *Journal of Applied Ichthyology*, 21(2), 151-155.
- Sasagawa, M., Cech, N. B., Gray, D. E., Elmer, G. W., & Wenner, C. A. (2006). Echinacea alkylamides inhibit interleukin-2 production by Jurkat T cells. *International immunopharmacology*, 6(7), 1214-1221.
- Savenkova, M. L., Mueller, D. M., & Heinecke, J. W. (1994). Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase is a physiological catalyst for the initiation of lipid peroxidation in low density lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 269(32), 20394-20400.
- Secombes, C. J. (1990). Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. *Techniques in fish immunology*, 1, 137-15
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., & Hotchkiss, R. S. (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *Jama*, 315(8), 801-810.
- Siwicki, A. (1987). Immunomodulating activity of levamisole in carp spawners, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish biology*, 31(sA), 245-246.
- Siwicki, A. K. (1989). Immunostimulating influence of levamisole on nonspecific immunity in carp (*Cyprinus carpio*). *Developmental & Comparative Immunology*, 13(1), 87-91.
- Skouras, A. (2002). *The use of piscine innate immune responses as indicators for environmental pollution in marine ecosystems* (Doctoral dissertation, PhD Thesis, University of Hannover, Germany).
- Sokolov, A. V., Kostevich, V. A., Zakharova, E. T., Samygina, V. R., Panasenکو, O. M., & Vasilyev, V. B. (2015). Interaction of ceruloplasmin with eosinophil peroxidase as compared to its interplay with myeloperoxidase: Reciprocal effect on enzymatic properties. *Free radical research*, 49(6), 800-811.
- Thomsen, M. O. (2012). The impact of cultivation techniques and induced stress on bioactive compounds in *Echinacea* species.

- Tiwari, U., Rastogi, B., Singh, P., Saraf, D. K., & Vyas, S. P. (2004). Immunomodulatory effects of aqueous extract of *Tridax procumbens* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(1), 113-119.
- Vergunst, A. C., Meijer, A. H., Renshaw, S. A., & O'Callaghan, D. (2010). *Burkholderia cenocepacia* creates an intramacrophage replication niche in zebrafish embryos, followed by bacterial dissemination and establishment of systemic infection. *Infection and immunity*, 78(4), 1495-1508.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Mabrouka Alfazzani Egrabi JIRA
Doğum Tarihi-Yeri : 27. 3. 1986 – Brak-alshati. Libya
Medeni Durumu : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : mabrouka531@gmail.com



Öğrenim Geçmişi

Lise : Fatat AL-Thwora
Lisans : SEBHA Üniversitesi, Mühendislik ve Teknoloji Fakültesi,
Tıbbi Laboratuvar Fen Bölümü

Çalışma Geçmişi

İş Yeri : SEBHA Üniversitesi