

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

**BALIK SEPSİS MODELİNDE KURKUMİN ÖZÜTÜ ETKİSİNİN,
NBT, MPO VE LİZOZOMAL AKTİVİTE TESTLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

Asmahan Ibrahim A. ABUGHDİR

**Danışman
Jüri Üyesi
Jüri Üyesi**

**Doç. Dr. Bayram KIRAN
Yrd. Doç. Dr. Kerim GÜNEY
Yrd. Doç. Dr. Aytaç GÜDER**

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

KASTAMONU – 2017



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BALIK SEPSİS MODELİNDE KURKUMİN ÖZÜTÜ ETKİSİNİN, NBT, MPO VE LİZOZOMAL AKTİVİTE TESTLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

Asmahan Ibrahim A.ABUKHDİR

Kastamonu Üni versitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Genetik ve Biyomühendislik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Bayram KIRAN

Septisemi hastalığı ölümcül bir durumdur ve enfeksiyon yaralanmalarına vücudun tepki vereceği zaman ortaya çıkan yaşamı tehdit eder, çünkü kendisine ait organ ve dokular ölümün en yaygın sebebidir. Geleneksel ilaçlarda sepsis tedavisinde kullanılan birçok bitkinin bağışıklık tepkilerini uyardığı görülmüştür ve bu tür bitkilerden birkaç etkin madde ayırılmış ve izole edilmiştir. Bu çalışma suni enfekte sazan (*Cyprinus Carpio*) balığındaki Kurkumin (*Curcuma longa*) ekstratının, Nitroblue tetrazolyum (NBT), miyeloperoksidaz (MPO) ve lizozim testi dahil olmak üzere spesifik olmayan bağışıklık parametrelerinin immün modülatör özelliklerini değerlendirmek amacıyla yürütüldü. Ortalama 8 ± 2 g ağırlığındaki balık, deney 1'de 7 gün ve deney 2'de 18 gün boyunca 24 mg / kg ve 36 mg / kg'lık iki konsantrasyonda ekstre ile beslendi. Sağlıklı sazan balıklarına, 1×10^8 CFUs / ml) *A. hydrophila*, deney 1 için ilk gün ve deney 2 için yedinci gün sonunda intraperitoneal enjeksiyon yoluyla enjekte edildi. Deney 1'de 1, 3, ve 7. günlerde ve deney 2'de 12, 15 ve 18. günlerde Nitroblübür tetrazolyum (NBT), miyeloperoksidaz üretimi (MPO) ve lizozim aktiviteleri belirlendi. Bulgular, belirgin değişikliklerin ($p < 0.05$) Lizozim aktivitesinin istisnası dışında tüm deney gruplarının tüm örneklem günleri için spesifik olmayan bağışıklık parametrelerinde (NBT, MPO) kontrol gruplarında diyet tedavilerinde önemli bir değişiklik ($P > 0.05$) olmadığına işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Sepsis, *aeromonas hydrophila*, sazan balığı, Kurkumin özü, spesifik olmayan parametreler (NBT, MPO ve Lizozim).

2017, 58 sayfa

Bilim Kodu: 923

ABSTRACT

MSc.Thesis

INVESTIGATION OF EFFECTS OF CURCUMIN EXTRACT ON FISH SEPSIS MODEL USING NBT, MPO AND LYSOZYME ACTIVITY TESTES

Asmahan Ibrahim A. ABUKHDIR
Kastamonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Genetic and Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Bayram KIRAN

Septicemia is a lethal condition which threatens one's life and arises when the body's response to infection damages its own tissues and organs. Immune response modulation to sepsis disease has been of interest for a long time. Many plants used in traditional medicine for the treatment of sepsis have been observed to stimulate responses of immunity, and several active principles have been characterized and isolated from such plants. Thus, this study was undertaken to evaluate the immunomodulatory properties of Kurkumin (*Curcuma longa*) extract in artificial infected common carp (*Cyprinus Carpio*) fish by using non-specific immune parameters, including Nitroblue tetrazolium (NBT), myeloperoxidase (MPO) and lysozyme assay. The fish with a weight average of 8 ± 2 g were fed with the extract at two concentrations, 24 mg/kg ve 36 mg/kg for 7 days in experiment 1, and 18 days in experiment 2. The healthy common carp fish were challenged with (1×10^8 CFUs/ml) *A. hydrophila* by intraperitoneal injection on the first day for experiment 1 and seventh day for experiment 2 post feeding. Nitroblue tetrazolium (NBT), myeloperoxidase production (MPO) ve lysozyme activities were determined on days 1, 3, and 7 in experiment 1, and on days 12, 15 and 18 in experiment 2. The results found that significant changes ($p < 0.05$) in non-specific immune parameters (NBT, MPO) for all sampling days of all experimental groups with exception in results of lysozyme activity were found no significant changes ($P > 0.05$) among dietary treatments when compared to that in the control group.

Key Words: Sepsis, aeromonas hydrophilia, carp fish, Kurkumin extract, non-specific parameters (NBT, MPO and Lysozyme).

2017, 58 pages

Science Code: 923

TEŞEKKÜR

Öncelikli olarak, hayatımdaki herşey için Yüce Rabbime şükürlerimi sunuyorum.

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

Çalışma boyunca sağladıkları destek, teşvik ve gösterdikleri sabır için anne ve babama, eşime ve ailemin tüm bireylerine ayrı ayrı teşekkürlerimi sunuyorum.

Projeyi tamamlama sürecinde yaptığı değerli katkıları ve sağladığı önemli bilgiler için Yrd. Doç. Dr. Soner Bilen'e saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Arkadaşlarıma, özellikle Mabruka, Aisha ve Hana'ya en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Asmahan Ibrahim A. ABUKHDİR
Kastamonu, Ocak, 2017

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TAAHHÜTNAME.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
GRAFİKLER DİZİNİ	x
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Sazan Balığı (<i>Cyprinus carpio</i>).....	3
1.2. Zerdeçal Bitkisi (<i>curcuma longa linn</i>)	6
1.2.1. Kurkumin'in Yapısal Özellikleri	7
1.2.2. Kurkumin Reaktivitesi.....	8
1.2.3. Yiyecek Kategorileri ve Kullanım Düzeyleri.	8
1.2.4. Gıdalardaki Reaksiyonlar	8
1.2.5. Farmakokinetik.....	9
1.2.6. Aksiyon Mekanizması.	9
2. TEORİK ÇERÇE VE.....	11
3. MATERYAL VE METOD.....	13
3.1. Materyaller	13
3.1.1. Kurkumin ekstratı.	13
3.1.2. Bakteri patojenlerinin izolasyonu (<i>Aeromonas hydrophilia</i>)	16
3.1.2.1. <i>Triptik soya Buyyon (TSB) Hazırlanması</i>	16
3.1.2.2. <i>Triptik Soya Agar (TSA) Hazırlanması</i>	18
3.1.2.3. <i>Bakteri Kültürü ve Bakteri Uyarım Deneyleri</i>	19
3.1.3. Deney Balıkları (model).	21
3.1.4. Ayıraçların Hazırlanması.....	22

3.1.4.1. Lizozim Stok Solüsyonunun Hazırlanması.....	22
3.1.4.2. Fosfat Tamponlu Tuzlu Suyun Hazırlanması (PBS)	23
3.1.4.3. Miyeloperoksidaz Stok Solüsyonunun (MPO) Hazırlanması.....	23
3.1.4.4. Nitro blue tetrazolyum (NBT) Stok Solüsyonunun Hazırlanması.....	23
3.2. Metod ve Yöntem.....	24
3.2.1. Deney Tasarımı.	24
3.2.1.1. Deney 1.	24
3.2.1.2. Deney 2.	26
3.2.2. Numune Toplama ve Analitik Yöntemler	28
3.2.2.1. Numune Toplama.	28
3.2.2.2. Spesifik olmayan Bağışıklık Parametreleri.	31
4. BULGULAR.....	35
4.1. Spesifik olmayan Bağışıklık Parametreleri	35
4.1.1. Deney 1.....	35
4.1.1.1. Nitroblue Tetrazolyum Aktivitesi (NBT)	35
4.1.1.2. Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi.....	37
4.1.1.3. Lizozim aktivitesi	39
4.1.2. Deney 2.....	41
4.1.2.1. Nitroblue Tetrazolyum Aktivitesi (NBT)	41
4.1.2.2. Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi.....	43
4.1.2.3. Lizozim aktivitesi	45
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ	50
KAYNAKLAR	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

EXP	Deney
IL-I	İnterlökin-I
dH ₂ O	Deiyonize su
BW	Vücut Ağırlığı
LPS	Lipopolisakkarid
UI	Kullanıcı arayüzü
MPO	Miyeloperoksidaz
DMSO	Dimethylsulfoxide
DMC	DemetoksiKurkumin
TSB	Triptik soya buyyon
ROS	Reaktif oksijen türleri
BDMC	BisdemetoksiKurkumin
CFU	Koloni oluşturan birim
PBS	Fosfat-tamponlu tuzlu su
TNF-ALPHA	Tümör Nekroz Faktör Alfa
HBSS	Hank'in dengeli tuz çözeltisi
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
SIRS	Sistemik İnflamatuar Yanıt Sendromunu
RPMI	Roswell Park Memorial Enstitüsü Besiyeri

GRAFİKLER DİZİNİ

	Sayfa
Grafik 4.1. 7 gün boyunca BPS ile beslenen enfekte pullu sazanların NBT aktiviteleri.	36
Grafik 4.2. 7 gün boyunca 24 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların NBT aktiviteleri.	37
Grafik 4.3. 7 gün boyunca 36 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların NBT aktiviteleri.	37
Grafik 4.4. 7 gün boyunca BPS ile beslenen enfekte pullu sazanların MPO aktiviteleri.	38
Grafik 4.5. 7 gün boyunca 24 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların MPO aktiviteleri.	38
Grafik 4.6. 7 gün boyunca 36 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların MPO aktiviteleri.	39
Grafik 4.7. 7 gün boyunca BPS ile beslenen enfekte pullu sazanların Lizozim aktiviteleri.	40
Grafik 4.8. 7 gün boyunca 24 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların lizozim aktiviteleri.	40
Grafik 4.9. 7 gün boyunca 36 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların lizozim aktiviteleri.	41
Grafik 4.10. 18 gün boyunca BPS ile beslenen enfekte pullu sazanların NBT aktiviteleri.	42
Grafik 4.11. 18 gün boyunca 24 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların NBT aktiviteleri.	42
Grafik 4.12. 18 gün boyunca 36 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların NBT aktiviteleri.	43
Grafik 4.13. 18 gün boyunca PBS ile beslenen enfekte pullu sazanların MPO aktiviteleri.	44
Grafik 4.14. 18 gün boyunca 24 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların MPO aktiviteleri.	44
Grafik 4.15. 18 gün boyunca 36 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların MPO aktiviteleri.	44
Grafik 4.16. 18 gün boyunca 24 mg PBS ile beslenen enfekte pullu sazanların Lizozim aktiviteleri.	46
Grafik 4.17. 18 gün boyunca 24 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların lizozim aktiviteleri.	46
Grafik 4.18. 18 gün boyunca 24 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların lizozim aktiviteleri.	46

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

	Sayfa
Fotoğraf 1.1. Pullu Sazan (<i>Cyprinus carpio</i>).....	4
Fotoğraf 1.2. Zerdeçal bitkisinin (<i>curcuma longa linn</i>) iki formu (tüm kökler ve köksapları) ve elde edilen zerdeçal tozu.....	6
Fotoğraf 1.3. Zerdeçal ve diğer kurkuminoidlerin yapısı.	7
Fotoğraf 3.1. Kurkumin tozunun tartılması.	13
Fotoğraf 3.2. 1 L Methanol (40%) ile karıştırılması.....	14
Fotoğraf 3.3. Filtre kağıdıyla filtreleme.....	14
Fotoğraf 3.4. Vakum birimleri kullanarak filtreleme.....	15
Fotoğraf 3.5. Döner buharlaştırıcı.....	15
Fotoğraf 3.6. Ham ekstrat kontantresi.....	16
Fotoğraf 3.7. 50 ml deiyonize suda çözündürme.....	16
Fotoğraf 3.8. Triptik soya buyyon (TSB tozunun istenen ağırlıklarda Hazırlanması).	17
Fotoğraf 3.9. Solubilized of tryptic soy agar by hot plate.....	17
Fotoğraf 3.10. TSA Hazırlanması. (a). Triptik soya agarın tartılması (TSA). (b). Otoklav kullanarak sterilize edilmesi.....	18
Fotoğraf 3.11. Triptik Soya Agar'ın petri kutularına boşaltılması.	18
Fotoğraf 3.12. Tripton Soya Agar içerisindeki <i>A. hydrophila</i> kolonileri.....	19
Fotoğraf 3.13. Bakterinin izolasyonu ve reaktivasyonu. (a). Bakterinin steril koşullarda inokülasyonu. (b). Bakterinin izolasyonu. (c). Santrifüj kullanarak bakterinin çökeltmesi. (d). Bakteri pelletleri.....	20
Fotoğraf 3.14. Bakteri Uyarım Deneyleri. (a). Mcferl ve densitometre kullanarak (108 cfu/ml) bakteri hazırlanması. (b). <i>Aeromonas hydrophila</i> 'nın Stok Kültürü.....	21
Fotoğraf 3.15. Kuluçka uygulaması.....	22
Fotoğraf 3.16. Deney akvaryumu.....	22
Fotoğraf 3.17. Tetra-metilbenzidin dihidroklorür (TMB) tableti.....	23
Fotoğraf 3.18. NBT stok solüsyonunun hazırlanması. (a). NBT tableti. (b). Mikrofiltre kullanarak filtreleme.....	24
Fotoğraf 3.19. Balıkların ağızdan beslenmesi. (a). İğne kullanarak ağızdan besleme. (b). Esnek PTFE tek kullanımlık iğne.....	25
Fotoğraf 3.20. Tricaine Methanesulfonate (MS-222) ile anestezi.	26
Fotoğraf 3.21. <i>A. Hydrophila</i> 'nın balıklara intraperitoneal olarak enjekte edilmesi.....	26
Fotoğraf 3.22. Balıklardaki yapay sepsis semptomları.	27
Fotoğraf 3.23. Numune toplama. (a). Balıkları içinde su olan behere aktarma. (b). balıkların tartılması. (c). ventral kesik işlemi. (d). Baş böbrek çıkartılması. (e). Baş böbreğin RPMI solüsyonuna koyulması.	29
Fotoğraf 3.24. Baş böbreklerin naylon ağa sıkıştırılıp toplanması.	30
Fotoğraf 3.25. Baş böbrek hücrelerinin santrifüjle çökeltmesi.....	30
Fotoğraf 3.26. Nitroblue tetrezolium (NBT) azaltılma analizi. (a). NBT solüsyonları düz tabanlı 96-hazne plağa eklenmesi. (b). NBT	

	numunesinin inkübasyonu (c). NBT tahlilinde kullanılan 96- hazne plakalar. (d). Mikro plaka okuyucu Spektrometre.....	32
Fotoğraf 3.27.	Lizozim aktivitesi tahlil tekniği.....	33
Fotoğraf 3.28.	Miyeloperoksidaz aktivite tahlili tekniği (MPO).	34



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. <i>Kurumin</i> 'in sağlığa faydaları	10



TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 4.1. Çeşitli düzeylerde metanolik Kurkumin ekstratı ile enfekte edilmiş pullu sazanların farklı numune toplama günlerindeki 7 günlük MPO aktivitesi. Sonuçlar ortalama $\pm$ st veart sapma şeklinde ifade edilmiştir (S.E).	36
Tablo 4.2. Çeşitli düzeylerde metanolik Kurkumin ekstratı enfekte edilmiş pullu sazanların farklı numune toplama günlerindeki 7 günlük MPO aktivitesi. Sonuçlar ortalama $\pm$ st veart sapma şeklinde ifade edilmiştir (S.E).	38
Tablo 4.3. Çeşitli düzeylerde metanolik Kurkumin ekstratı enfekte edilmiş pullu sazanların farklı numune toplama günlerindeki 7 günlük Lizozim aktivitesi. Sonuçlar ortalama $\pm$ st veart sapma şeklinde ifade edilmiştir (S.E).	40
Tablo 4.4. Çeşitli düzeylerde metanolik Kurkumin ekstratı enfekte edilmiş pullu sazanların farklı numune toplama günlerindeki 18 günlük NBT aktivitesi. Sonuçlar ortalama $\pm$ st veart sapma şeklinde ifade edilmiştir.....	42
Tablo 4.5 Çeşitli düzeylerde metanolik Kurkumin ekstratı enfekte edilmiş pullu sazanların farklı numune toplama günlerindeki 18 günlük MPO aktivitesi. Sonuçlar ortalama $\pm$ st veart sapma şeklinde ifade edilmiştir.....	43
Tablo 4.6. Çeşitli düzeylerde metanolik Kurkumin ekstratı enfekte edilmiş pullu sazanların farklı numune toplama günlerindeki 18 günlük Lizozim aktivitesi. Sonuçlar ortalama $\pm$ st veart sapma şeklinde ifade edilmiştir.....	45

1. GİRİŞ

Septisemi, kan dolaşımında bakteri toksinleri veya bakterilerin varlığı anlamına gelir ve en yaygın ölüm nedenidir (Wilson, 2010). Septisemi hastalığı ölümcül bir durumdur ve vücudun yaralanmalara karşı kendi organları ve dokularının enfeksiyon kapmasına yanıt verdiğinde yaşamı tehdit eder (Singer vd, 2016). Ayrıca karmaşık bir enfeksiyondur, yaralıların yaşamlarını tehlikeye atar ve k ve a bulunan kimyasal salgı maddeleri bakteriyel patojenlere saldırdığında (kan dolaşımında, kemiklerde, bağırsaklarda, böbreklerde, menenjelerde, akciğerlerde, cilt, karaciğer ve safra kesesinde enfeksiyona neden olur) ve çeşitli vücut organlarına zarar vererek iflasına yol açan birçok değişikliği uyaran vücutta enflamatuvar yanıt vermeyi tetiklediğinde ortaya çıkar. Sersemlik, artan solunum hızı, artan kalp atış hızı ve ateş yaygın belirtiler ve işaretlerdir (Jamieson, Uyeki, Callaghan, Meaney-Delman ve Rasmussen, 2014). Şiddetli sepsis yetersiz kan dolaşımına veya organ işlevinin zayıflamasına neden olur. Yetersiz kan akışı, düşük idrar çıkışı, düşük kan basıncı (90 mmHg'den (hipotansiyon) daha düşük) veya kan laktatının 4 mmol / L'den yüksek olması açıkça işaretleridir. Septik şok, makul miktarda intra venöz sıvı verildikten sonra düzelen sepsis sonucu düşük kan basıncına sahip sepsisdir. Septik şok, kalıcı hipotansiyon ile septikin son aşamasıdır (Dellinger vd, 2013). Son beş yılda, sepsis tedavisi gelişme gösterdi. Organ iflasına ve işlev bozukluğuna neden olabilecek ciddi bir durum olan sistemik inflamatuvar tepki sendromu (SIRS), bulaşıcı olmayan veya olan nedenlerden kaynaklanabilmektedir.

SIRS Belirtileri ve Bulguları: Lökosit sayısı mikrolitre başına $> 12,000$ veya $< 4,000$ ve / veya $> \% 10$ b ve indasya, PaCO_2 32mmHg, kalp hızı $> \text{dakika}/90$, solunum hızı $> \text{dakika}/20$, sıcaklık > 38 derece veya, zayıf beslenen, küçük çocuklar ve zayıf (letarjik) bebeklerde < 36 santigrat derece (Solà, Gluud, Lathyrus, Martí-Carvajal ve Cardona, 2012). Pediatrik hastalarda ve yetişkinlerde septik şok ve şiddetli sepsis için rekombinant protein C gereklidir.

SIRS ayrıca konuşma bozukluğu, zayıflık, sersemlik, nefes artması, kalp hızı artması, yetersiz idrar çıkışı, ateş, titreme, şiddetli titreme, ciltte renk değişimine sebep olur. Herkes sepsis oluşum riskine sahiptir fakat muhtemel hastalar şunlardır;

- Damar yolu açık (damla damla damardan verilen gibi) veya idrar kataterine (idrar geçişi için mesaneye bağlı) bağlı hastalar;
- Kemoterapi (kanser) veya steroid tedavisi gibi bağışıklık sistemini zayıflatan tedavileri alan kişiler.
- Kaza veya yaralanmalardan yaralanan ya da kısa bir süre önce ameliyat olmuş olan kişiler;
- Yaşlı ve zayıf kişiler;
- Bebekler, özellikle prematüre bebekler (Casey ve Conrad, 2016).

Sepsis patofizyolojisi hem gram pozitif organizmaların (lipoteikoik asit, peptidoglikan) hem de gram negatif organizmaların (endotoksin, lipid A, lipopolisakkarid [LPS]) dış zar bileşenleri tarafından başlatılır. Dış membranın bu bileşenleri, monosit yüzeyleri üzerinde CD14 reseptörüne eşlenebilmektedir. Son zamanlarda tanımlanan toll benzeri reseptörler sayesinde bir sinyal hücrelere iletilir, böylece proinflatuvar sitokinler interlökin-1 (IL-1) ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-alfa) nihai üretimi sağlanır. Bu sitokinler dokular üzerinde doğrudan toksik etkiye sahiptir (Cihan, Yarat, Tunalı Akbay ve Şener, 2015).

Aeromonadlardan kaynaklanan insanlardaki septik enfeksiyonlar önleyici toplum hizmetlerinde sıklıkla görülür. Arıtılmamış pis su ve işlenmiş içme sularındaki aeromonadlar (LeChevallier, Seidler ve Evans, 1980) sebebiyle sağlık tesislerinde (Cookson, Houang ve Lee, 1984; Mellersh, Norman ve Lee 1984), hastanelerin su sistemlerinde (Picard ve Goullet, 1987), evcil hayvanlarda (inek, domuz ve atlar gibi), taze sebzeler, süt ürünleri, et, kabuklu deniz hayvanları ve et ürünlerinde, görülmektedir (Igbinosa, Igmubor, Ağdaç, Tom ve Okoh, 2012).

Birkaç hayvanın da normal bakteri florasının içinde de bulunur. A. hydrophilia, Aeromonadaceae ailesinin bir üyesidir ve sudaki çevre koşullarında ve balıkların sağlıklı GIT'lerinde yaşayan Gram negatif fakültatif anaerobik ve aerobik, çubuk

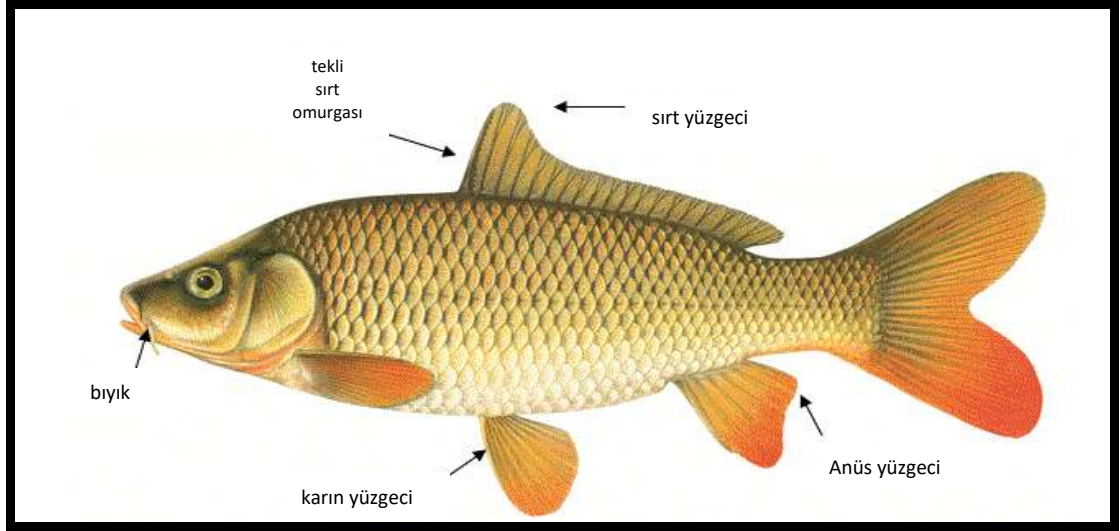
şeklindeki oksidaz pozitif hareketli bakteridir (Rey vd, 2009). Oportunistik bir mikroorganizma olarak balıklarda hastalığın oluşmasına ve kötüleşmesine katkıda bulunan sekonder bir biyolojik etkindir (Yu vd, 2004). Güneydoğu ve Güney Asya balık çiftliklerinde *A. hydrophilia* enfeksiyonlarına bağlı önemli ölüm oranları kaydedilmiştir (Roberts, 1986). Musa vd, çoğunlukla *A. hydrophilia* (% 60) içeren (Musa, Wei ve Shaharm, 2008) Terengganu-Malezya'daki akvaryum dükkânlarından hasta tatlısu süs balıklarından izole edilmiş bakterilerin bulunduğunu belirtmişlerdir. Bakteri özellikle skala çıkıntısı, eritrodermatit, ekzoftalmi, kırmızı yaralar, sepsisemi, kanamalı hemorajik, kuyrukların çürümesi ve özellikle (*Cyprinus Carpio*) sazan için dermal ülserasyon gibi çeşitli patolojik vakalara neden olmaktadır (Austin ve Austin, 2007).

1.1. Sazan Balığı (*Cyprinus carpio*)

Sepsis en zor klinik koşul modellerinden birine sahiptir. Bu nedenle, insanlardaki sepsisin çok karmaşık resmini yeniden üretmek için hayvan modelleri kullanılması gerekmiştir. Hayvan modelleri, sepsis ile ilgili sistematik çalışmada kesinlikle önemli bir rol oynamaya devam edecektir, çünkü genellikle klinik sepsis için deney verileri ile korelasyon terimlerinin yorumlanmasına tabi tutulmaktadırlar. (Popov ve Pavlov, 2013). Bu nedenle bu çalışmada sazan balığı sepsis enfeksiyonu için deneysel bir model olarak kullanılmıştır.

“Sazan” terimi bir takson değil bir sınıf ismidir. Sazan, Sazangiller familyasına ait olup şu sınıflı vermada yer alır: Hayvanlar Alemi, Sırtiplikliler şubesi, Omurgalılar altşubesi, Işınılyüzgeçliler sınıfı, Sazangiller ailesi, *Cyprinus* cinsi ve *Cyprinus carpio* türü (Billard, 1999).

Dünyada pullu sazan, *Cyprinus carpio* L'nin üretimi 2000 yılında 2.41 milyon tondan 2013 yılında 4.08 milyon tona kademeli olarak artmıştır. Bu nedenle pullu sazan dünya genelindeki en önemli tatlısu balıklarından biridir. *Aeromonas hydrophila* enfeksiyonundan kaynaklanan kitlesel balık ölüm hızı, pullu sazan üretimini sınırlayan bir faktördür. Bu şekilde yaygın olarak kullanılan sazan türü pullu saz veir (*Cyprinus carpio*) (Foto 1.1).



Fotoğraf 1.1. Pullu Sazan (Cyprinus carpio).

Sazanlar, bir sezon boyunca subtropikal / tropik çoklu kültürde 0.6 ila 1.0 kg vücut ağırlığına ulaşabilir. Ilıman iklimde büyüme daha yavaştır, 3 balık yetiştirme mevsiminden sonra 1.5 kg vücut ağırlığına ulaşırlar. Sazanlar soğuk kış dönemlerinde hayatta kalabilirler. Yaklaşık %5'e kadar olan tuzluluk tolere edilir, ve optimal pH değeri sazanlar için 6.5-9.0'dir. Pullu sazanlar, düşük oksijen konsantrasyonun (0.3-0.5 mg.l-1) yanı sıra aşırı doyumlukta da hayatta kalabilirler. Sazanın çiftlikte yetiştiriciliği doğal gıdanın tahıl ile takviye edilerek beslenmesine dayanmaktadır. Günlük büyüme vücut ağırlığının % 2 ila % 4'ü olabilir. Pullu sazan nehir ve sığ suların orta ve alt katlarında bulunur. En iyi büyüme, 23-30 ° C su sıcaklığında elde edilir (Peteri, 2006). Sazan (Cyprinus carpio Linnaeus, 1758), yiyecek için en eski evcilleştirilmiş balık türlerinden biridir. Çin'de sazan kültürü en azından M.Ö. 5. yüzyıla kadar uzanmaktadır (Balon, 2006).

Balık, bağışıklık sisteminin her iki kolunu geliştiren, doğuştan gelen ve uyarlanabilir bağışıklık tepkisini yansıtan en eski omurgalılarıdır. Balıklarda birincil bağışıklık organı olan kemik iliği bulunmaz ve bunların hematopoietik hücreleri, beyin ve lenfoid bağışıklık hücrelerinin yükseldiği baş böbrekte (HK) üretilir (van der Marel vd, 2012). Antikor üreten ve antijenleri tutan baş böbrek kapasitesi birçok çalışmada gösterilmiştir (Ellis, 1989; Zapata ve Cooper, 1990). Ayrıca baş böbrek, bağışıklık fonksiyonlarını kortikosteroid üretimi ile birleştirir ve endokrin ve bağışıklık sistemi arasında ilginç bir bağlantı oluşturur. HK, T-lenfositlerinin olgunlaşmasının merkezi olan timüs ile birlikte bağışıklık sisteminin antijenlerle etkileşime girdiği

yerlerdir (Tort, Balasch ve Mackenzie, 2003). Balıklarda ikincil bağışıklık organları olarak lenf nodları bulunmaz (Tort vd, 2003). Eritrositik ve kan filtrasyonunun yok edilmesi elipsoid kılcal damarlardan kaynaklanan makrofaj birikimiyle oluşan melanomakrfogik merkezler tarafından gerçekleştirilir. Bu merkezler, uzun süreliğine bağışıklık kompleksleri olarak antijenlere sahip olabilirler (Espenes, Press, Dannevig ve L ves verk, 1995). Teleost balıklarının bağışıklık sistemi memelilerin bağışıklık sisteminden farklı olmakla birlikte bazı ortak özellikler bulunmaktadır. Bağışıklık hücreleri, patojenlere hızlı ve etkili bir saldırı için önemli olan sitokinler ve ilişkili reseptörler aracılığıyla iletişim kurar (Bird ve Secombes, 2006). Omurgalılarda sitokinler, doğuştan gelen ve adaptif bağışıklığın kilit regülatörüdür ve hücre çoğalması ve farklılaşması üzerine geniş etki yelpazesine sahiptir (Bird ve Secombes, 2006). Balıklarda hem fizyoloji hem de bağışıklık, abiyotik faktörlerin (başta su sıcaklığı gibi) ve patojenlerle olan etkileşimlerin değişimiyle ilişkili mevsimsel değişikliklerden (ör. Zamansal değişim) etkilenir. Stres de, fagositik, dalak leucosit aktivitelerini, baş böbrekleri (HK) ve plazmayı etkiler. Temel bağışıklık sistemi işlevi, bir virütik enfeksiyona karşı korumak ve virüs enfeksiyonunun zararını en aza indirmektir. (Koskivaara, Valtonen ve Pros, 1991).

Su ürünleri yetiştiriciliği, gelişmekte olan ülkeler için iyi bir fırsattır (Manoj ve Vasudevan, 2009) ve dünyada en hızlı gelişen sektördür (Harikrishnan, Balasundaram ve Heo, 2011). Patojenlere bağlı hastalıklar, su ürünleri yetiştiriciliğindeki en büyük problemlerden biridir (Rahman, Ak vea, Rahman ve Chowdhury, 2009). Bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanılan seçeneklerin bazıları, mantarlarda ve bakterilerde ilaç direncine bağlı olarak pahalılaşmakta, azalmakta ve giderek sınırlı hale gelmektedir. Bu nedenle, ilaçların alternatifi olarak bitki özleri gibi bir takım biyolojik bileşikler, balıkların durumunun iyileştirilmesi için hastalık riskini ve spesifik olmayan savunma sisteminin geliştirilmesini en aza indirmek için kullanılmaktadır. (Przybylska, 2012).

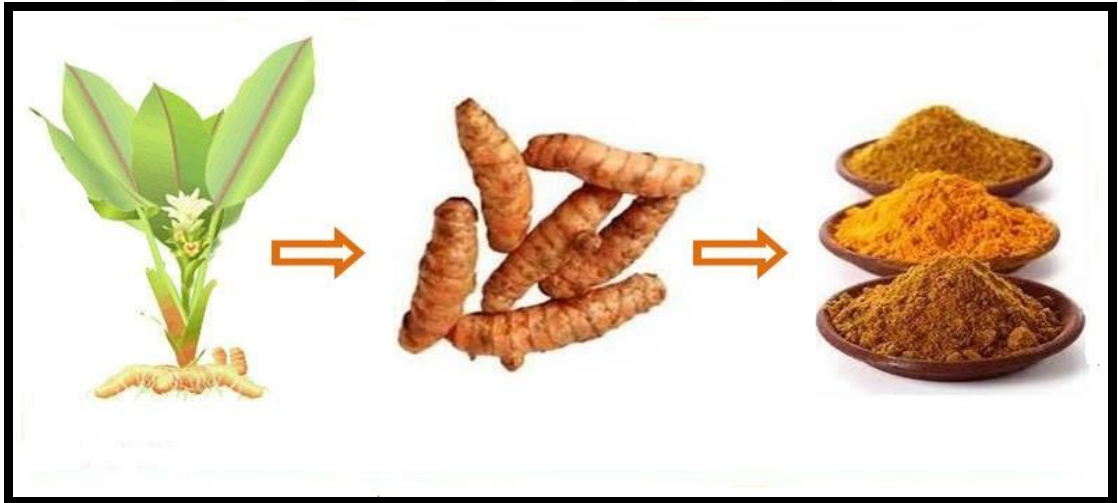
Hindistan zengin bitki çeşitliliğine sahiptir ve bitki temelli su ürünleri yetiştiriciliği uygulamaları için iyi bir platform oluşturmaktadır. Hindistan'da yerli veya ekili çeşitli tıbbi bitkiler dünya çapında su ürünleri yetiştiriciliğinde yaygın bir şekilde

kullanılmaktadır. Bu çalışmada bu bitkilerden *Curcuma longa* (C.L-zerdeçal) üzerinde durulmaktadır.

1.2. Zerdeçal Bitkisi (*curcuma longa linn*)

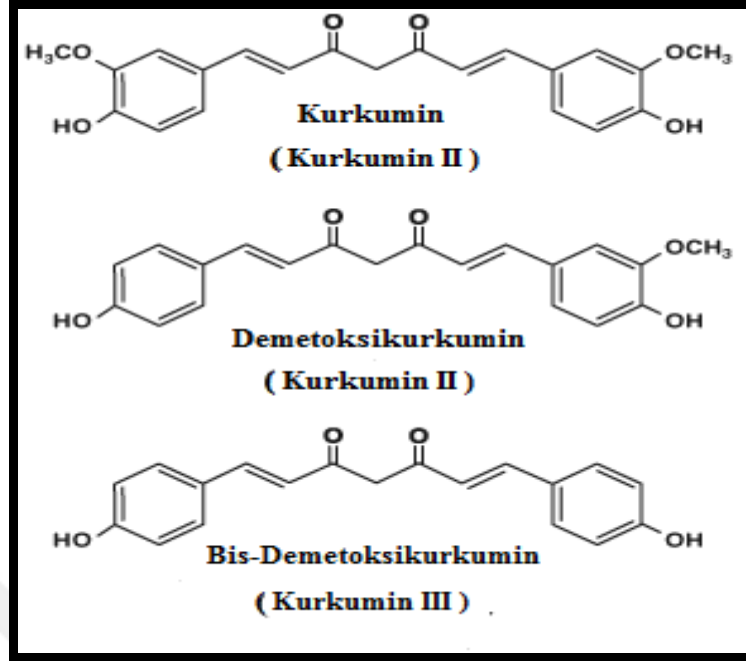
Zencefil ailesinin (Zingiberaceae) bir üyesi olan Zerdeçal, Güneydoğu Asya'ya özgü uzun ömürlü bir bitkidir. Köksapları ve köklerin yanı sıra filizler gönderen yatay yer altı kökleri vardır (Fotoğraf 1.2). Ayrıca, (*Curcuma longa* Lnn) yer üstü köksaplarından bir baharattır türü de üretilmektedir (Akram vd, 2010).

Zerdeçalın taksonomik durumu şu şekildedir: Sınıf Liliopsida, aile Zingiberaceae, alt sınıf Commelinids cins *Curcuma*, takım Zingiberales, tür *Curcuma longa*. Eşanlamlılar: Haladi, zerdeçal sarı, kurkum, C.aromatic ve yerli tür olarak C. Longa. Linnaeus tarafından C. Longa olarak tanımlanmıştır. (Chattopadhyay, Biswas, B veyopadhyay ve Banerjee, 2004).



Fotoğraf 1.2. Zerdeçal bitkisinin iki formu (tüm kökler ve köksapları) ve elde edilen zerdeçal tozu.

Zerdeçalın parlak sarı rengi, Kurkumin (bileşik A), demetoksikürkümin (DMC) (bileşik B), bisdemetoksikürkümin (BDMC) (bileşik C) (Akram vd, 2010) içeren Kurkuminoid olarak bilinen yağda çözünür polifenol pigmentlerinden ve suda çözünen protein turmerinden gelir (Fotoğraf 1.3). (Irving, Karmokar, Berry, Brown ve Steward, 2011).



Fotoğraf 1.3. Zerdeçal ve diğer kurkuminoidlerin yapısı.

Kurkumin (diferuloylmethane) zerdeçalda ana Kurkuminoid bileşiktir ve genellikle biyolojik etkilerden sorumlu olabilir, çünkü genel olarak en bunun aktif bileşeni olarak kabul edilir (Akram vd, 2010).

1.2.1. Kurkumin'in Yapısal Özellikleri

Kurkumin aynı zam ve simetrik bir molekül olan diferuloyl metan olarak bilinir. Molekül ağırlığı 368.38, kimyasal formülü $C_{21}H_{20}O_6$ 'dır. Kurkumin'in taban durumundaki hesaplanmış dipol momentı 10.77 D'dir ve Kurkumin'in IUPAC ismi (1E, 6E) -1,7-bis (4-hidroksi-3 -metoksifenil) -1,6-heptadien-3,5-dion'dır. Metanolde Kurkumin'in molar sönme katsayısı 425 nm'de 55.000 $dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ dir. Alkali pH'da (> pH 10) tam olarak protonsız (kırmızı renkte) Kurkumin'in absorpsiyon maksimumu 467 nm ve molar sönme katsayısı 53,000 $dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ 'dir. Kurkumin'in absorpsiyon spektrumu, bir tanesi görünür bölgede maksimum 410 ila 430 nm arasında değişen ve bir başka bant da UV bölgesinden maksimum 265 nm bölgede olmak üzere iki güçlü emme b veına sahiptir. LogP değeri ~ 3.0 olan hidrofob bir moleküldür. Suda hemen hemen çözünmez ve DMSO, metanol, etanol, asetonitril, kloroform, etil asetat gibi polar sol ventlerde kolayca çözünür. Sikloheksan ve hekzan gibi hidrokarbon çözücülerde az çözünürdür. Yapısında üç

kimyasal varlığa sahiptir: o-metoksi fenolik gruplar içeren iki aromatik halka sistemi, bir α , β -doymamış β -diketon parçasından oluşan yedi karbon bağlayıcı tarafından bağlanır (Borsari, Ferrari, Gr ve ve Saladini, 2002; Gupta vd, 2011; Esatbeyoğlu vd, 2012; Priyadarsini, 2014).

1.2.2. Kurkumin Reaktivitesi

Kurkumin'in üç reaktif fonksiyonel grubu vardır: iki fenolik grup ve bir diketon parçası (Indira Priyadarsini, 2013). Kurkumin biyolojik aktivitesi ile ilgili önemli kimyasal reaksiyonlar, Kurkumin oksidasyonu, geri dönüşümsüz ve geri dönüşümlü nükleofilik katılma (Michael reaksiyonu) reaksiyonları, enzimatik reaksiyonlar, bozunmaya ve hidrolize yol açan hidrojen bağış reaksiyonlarıdır. Bunların hepsi farklı Kurkumin biyolojik faaliyetlerinde önemli rol oynamaktadır. (Priyadarsini, 2009; Priyadarsini, 1997).

1.2.3. Yiyecek Kategorileri ve Kullanım Düzeyleri

Kurkumin birçok gıdayı renklendirmek için yaygın olarak kullanılır. Gıda Katkı Maddeleri Taslak Codex Genel St veardı, bu gıdaların kapsamlı bir listesini sunmaktadır. Kurkumin'in kullanıldığı gıdalar şöyle sıralanmıştır: kompoze gıdalar, hazır yemekler, içecekler, özel beslenme amaçlı gıdalar, protein ürünleri, soslar, çorbalar, baharatlar, yumurta ve yumurta ürünleri, balık ve balık ürünleri, et ve et ürünleri, unlu mamüller, tahıl ürünleri, şekerleme, sebze ve meyve ürünleri, yenilebilir buz, yağ ve yağ emülsiyonları, katı yağlar ve süt ürünleri. Besin kategorisine bağlı olarak Kurkumin seviyeleri 5 ila 500 mg kg-1 aralığındadır. (Tonnesen ve Karlsen, 1985).

1.2.4. Gıdalardaki Reaksiyonlar

Kurkumin'in ana boyama bileşenleri bikarbonatlardaki fosfatlara ve klorürlere açıkça etkisizdir. Kurkumin'in besin unsurlarıyla reaksiyona girmiş reaksiyonları, 100 ppm'yi aşan seviyelerde sülfür dioksit ve bazı tuzlarla (sitrata, ftalat) kompleks oluşumu ile renklerin ağırtılmasıdır. Kurkumin ısınmaya nispeten kararlı

olduğundan, termal olarak işlenmiş gıdalarda kullanılabilir. Kuru yiyeceklerde de kararlıdır. (Tonnesen ve Karlsen, 1985).

1.2.5. Farmakokinetik

Emiliminin düşük olması nedeniyle, Kurkumin, antienflamatuar etkiyi ve absorpsiyonu arttırmak için genellikle bromelain ile formüle edilir. Hayvanlardaki farmakokinetik çalışmalar, Kurkumin oral dozunun % 40-85'inin değişmeden, sindirim sisteminden geçtiğini, emilen flavonoidlerin çoğunun karaciğer ve bağırsak mukozasında metabolize olduğunu göstermiştir. (Akram vd, 2010).

1.2.6. Aksiyon Mekanizması

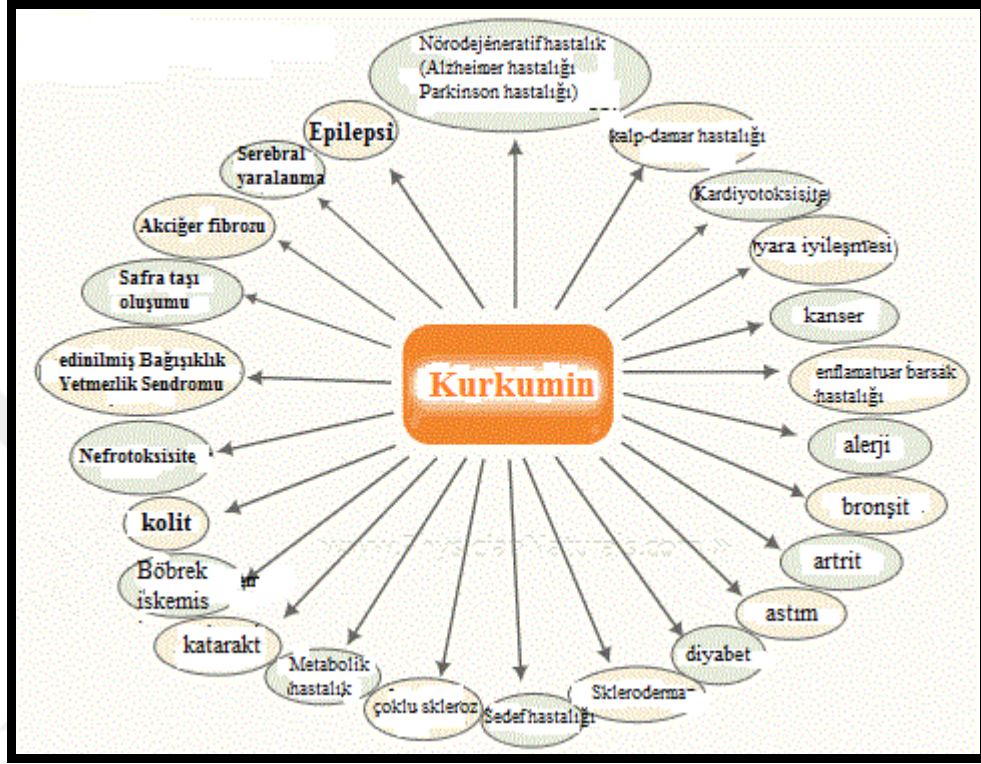
Antimikrobiyal Etkiler

Curcuma longa'nın esansiyel yağı ve Kurkumin özütü, çeşitli patojen fungus, parazitler ve bakterilerin çoğalmasını engeller. Kurkumin'nin ayrıca Leishmania büyük organizmalara ve Plasmodium falciparum'a karşı orta düzeyde etkili olduğu bulunmuştur. Dermatofitler, patojenik kalıplar ve maya ile enfekte olmuş kobaylar üzerinde yapılan bir araştırmada topikal olarak uygulanan zerdeçal yağının dermatofitleri ve patojenik mantarları inhibe ettiği ancak Kurkumin ve zerdeçal yağların maya izolatlarını etkilemediği bulunmuştur. Dermatofit ve mantar ile enfekte kobaylardaki lezyonlardaki gelişmeler gözlemlenmiş ve yedi günlük zerdeçal uygulamasının lezyonları ortadan kaldırdığı görülmüştür. Çekal parazit Eimera maxima ile enfekte olan civcivlerin kullanıldığı araştırmada ise % 1 zerdeçal ile desteklenmiş diyetin ince bağırsak lezyonlarında azalmaya ve kilo artışına neden olduğunu gösterilmiştir.

Kurkumin ile Bağışıklığın Geliştirilmesi

Hindistan'daki araştırmacılar, Kurkumin verilen farelerde artan antikor ve daha fazla bağışıklık etkisi olduğunu belgelemişlerdir. Kurkumin genel olarak da bağışıklığı geliştirir (Fotoğraf 1.4). Kurkumin, bu lokalize bağışıklık uyarılmasına ila veten, bazı hücrelerin apoptozdan kaçması durumunda vücudun

kanserle savaşmasına yardımcı olabilir. Araştırmacılar Kurkumin alınımlı sonrası bağırsakların içine baktıklarında, CD4 + T yardımcı ve B tipi bağışıklık hücrelerinin sayısının fazla olduğunu tespit etmişlerdir (Akram vd, 2010).



Şekil 1.1. Kurkumin'in sağlığa faydaları.

2. TEORİK ÇERÇE VE

Sepsis, çoğunlukla birden fazla organ işlev bozukluğunun ortaya çıkmasına neden olan ve çeşitli enfeksiyonlara karşı yaygın bir inflamatuvar yanıt olarak geliştiği için milyonlarca insanın ölümüne neden olan karmaşık heterojen bir sendrom olarak ortaya çıkar. Çeşitli nedenlerden ötürü, insanlarda sepsisin ayrıntılı araştırılması zordur. Bu nedenle, sepsisi modellemek için birçok çaba ortaya konmuştur. Dezavantajların detaylı bir şekilde gözden geçirilme fırsatı ve deney hayvanının her modelinin avantajının ortaya konabilmesi nedeniyle bilimsel araştırmalarda hayvan modellerinin kullanılmasının arttırılması, araştırmacının soruşturmanın özel amacına uygun bir seçim yapmasına yardımcı olmaktadır. Çiftlik balıkçılığı endüstrisinin hızla genişlemesi ve temel araştırmalarda memeli modellerinin insancıl kullanımı ile ilgili soruların farkındalığının artması nedeniyle, balık modellerinin bilimsel araştırmalarda kullanılması dünya çapında artmaktadır. (Popov ve Pavlov, 2013). Bu amaçla kullanılan bir sürü balık türü vardır ve sazan balığı en yaygın kullanılan türlerden biridir. Örneğin Soltanian ve Fereidouni (2016) *Cyprinus Carpio* balıklarına intraperitoneal olarak (IP) Kına (*Lawsonia inermis*) enjekte etmişlerdir. Öte y vean, Wijendra ve Pathinratne (2011); Siwicki, (1987), Levamisol ile besledikleri *Cyprinus Carpio* balıklarını çalışmalarında kullanmışlardır. Buna karşılık, Behera vd (2011), *Cyprinus carpio*'ya Kurkumin özü enjekte etmişler ve Alishahi vd ise (2010) *cyprinus carpio* türünü Aleo vera ile beslemişlerdir.

Bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanılan seçeneklerin bazıları, mantarlarda ve bakterilerde ilaç direncine bağlı olarak pahalılaşmakta, azalmakta ve giderek sınırlı hale gelmektedir. Bu nedenle, ilaçların alternatifi olarak bitki özleri gibi bir takım biyolojik bileşikler, balıkların durumunun iyileştirilmesi için hastalık riskini ve spesifik olmayan savunma sisteminin geliştirilmesini en aza indirmek için kullanılmaktadır. (Przybylska, 2012).

İmmünodülatör, balıkların kültüründe yaygın olarak kullanılır. Önceki çalışmalar, Kurkumin'in bir takım balık türleri üzerindeki immün modülatör etkilerini göstermiştir. Behera vd (2011), doğal antikor titreleri, lizozim seviyeleri, miyeloperoksidaz aktivitesi, lökosit migrasyonu, fagositik aktivite, lökosit ve

nötrofil sayıları ve fagositik aktivite gibi bazı spesifik olmayan bağışıklık parametrelerini modüle eden sazan balıklarında Kurkumin'in immüno-modülatör aktivitesini ortaya koymuşlardır. Divyagnaneswari vd (2008), *Solanum trilobatum* yapraklarından elde edilen su özütü ile intraperitoneal enjekte edilen *Oreochromis mossambicus*'daki sonuçlarını bildirmişlerdir. Behera vd (2011), sazan balıklarında Kurkumin'in bağışıklık uyarıcı aktivitesini bulmuşlardır. Öte y vean, Tuorkey ve Karolin, (2009) oral gavaj ile Kurkumin ile beslenen sıçanlardaki sonuçları çalışmışlardır.

Araştırmacıların farklı metodolojiler kull veıkları yukarıdaki çalışmalar, Soltanian ve Fereidouni, 2016, Wijendra ve Pathinratne, 2011, Siwicki, 1987, Alishahi vd, 2010, Divyagnaneswari vd, 2008'e benzer immünolojik parametreleri içermektedir. Öte y vean Wijendra ve Pathinratne (2011), Soltanian ve Fereidouni (2016) tarafından biyokimyasal ve hematolojik parametreler kullanılmıştır. Bazı araştırmacılar Alishahi vd (2010), Soltanian ve Fereidouni (2016) gibi bakterisit aktivite üzerinde çalışmışlardır. Behera ve arkadaşları ise (2011) büyüme performansı denemeleri ve histopatolojik inceleme üzerine çalışmışlardır. Bunun aksine, Tuorkey ve Karolin, (2009) çalışmalarında antioksidan Marker ve oksidatif stres markları kullanmışlardır. (Alishahi vd, 2010) ayrıca araştırmalarında bakteriyel mikroglütinasyon titresi (MAT), alternatif tamamlayıcı yol (ACP) aktivitesi üzerinde çalışmışlardır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyaller

3.1.1. Kurkumin ekstratı:

Kurkumin ekstraktı, antifungal, antibakteriyel, antiviral ve antioksidan, anti-inflamatuvar ve kanser kemoterapi eylemleri gibi tıbbi özelliklere sahiptir (Wichitnithad vd, 2009).

Kurkumin ekstraksiyon süreci: Zerdeçal (*curcuma longa* lnn) tozu, insanların yemeklerinde kullanmaları için satın aldıkları Kastamonu'daki yerel pazardan satın alındı. 50 gm Kurkumin tozu tartıldı (Fotoğraf 3.1). Ardından 1 L Metanol (% 40) ile karıştırıldı (Fotoğraf 3.2.), sürekli çalkalama ile 3 gün macerasyona bırakıldı.



Fotoğraf 3.1. Kurkumin tozunun tartılması.



Fotoğraf 3.2. 1 L Methanol (40%) ile karıştırılması

Maserasyonun tamamlanmasından sonra, koyu kah verengi çözelti, hafif değişikliklere (Cohly vd, 2003) göre filtre kağıdıyla (Fotoğraf 3.3) filtrelendi.



Fotoğraf 3.3. Filtre kağıdıyla filtreleme.

Süzülen çözelti, Whatman No.1 filtre kağıdına sahip olan Buchner hunisine aktarıldı, burada filtrasyon, vakum birimleri (Fotoğraf 3.4) kullanılarak yapıldı.



Fotoğraf 3.4. Vakum birimleri kullanarak filtreleme.

Homojen çözelti, siyah, turuncu renkli (Fotoğraf 3.6) ham konsantre ekstrat elde etmek için bir döner buharlaştırıcı (50°C) (Fotoğraf 3.5) kullanılarak konsantre edildi ve daha sonra ekstrat 50 ml deiyonize suda çözündürüldü, daha sonra buzdolabında -20°C 'de, sıkı sıkıya kapatılmış kavanozlarda, besleme deneylerinde kullanılıncaya kadar saklı ve (Fotoğraf 3.7).



Fotoğraf 3.5. Döner buharlaştırıcı.



Fotoğraf 3.6. Ham ekstrat kontantresi.



Fotoğraf 3.7. 50 ml deiyonize suda çözündürme.

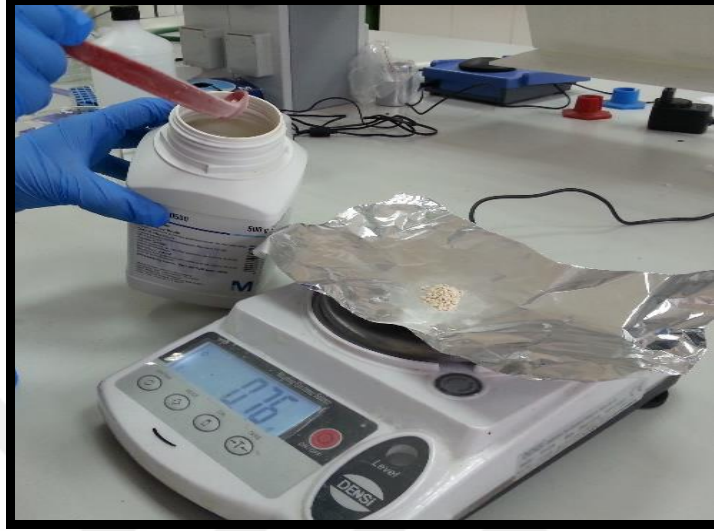
Ürün dozlara göre hesapları ve deneysel dozlar olarak kullanılmak üzere Fosfatla tamponlanmış salin (PBS) ile seyreltilmiştir.

3.1.2. Bakteri patojenlerinin izolasyonu (*Aeromonas hydrophilia*)

3.1.2.1. Triptik soya Buyyon (TSB) Hazırlanması

Genel Süreç: Triptik soya buyyon, 7.5 gram triptik soya buyyon tozunun iyonşuılaştırılmış H_2O ile 250 ml'nin son hacminde karışdırılmasıyla hazırlanır ve (Fotoğraf 3.8) Karışım kaşıyla karışdırıldı ve otoklavlama öncesi toz tamamen çözülene kadar kaynatıldı (Fotoğraf 3.9). Ardından, 15 dakika boyunca $121^{\circ}C$ 'de

otoklavlayarak sterilize edildi. Kullanımdan önce buyyonun oda sıcaklığına gelene kadar soğuması sağl veı.



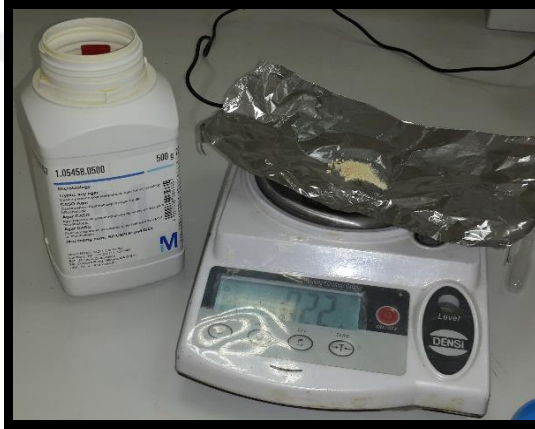
Fotoğraf 3.8. Triptik soya buyyon tozunun istenen ağırlıklarda Hazırlanması



Fotoğraf 3.9. Triptik soya buyyonun hazırlanması

3.1.2.2. *Triptik Soya Agar Hazırlanması*

Süreç: 10 gram TSA tozu tartıldı (Fotoğraf 3.10.a) ve 250 ml deiyonize suda çözündürüldü (dH₂O). Karışım karıştırıldı ve otoklavlama öncesi toz tamamen çözülene kadar kaynatıldı. Sonra 15 dakika boyunca 121 °C’de otoklavlayarak sterilize edildi (Fotoğraf 3.10.b). Otoklavlamanın hemen sonrasında 45 ila 50 °C su banyosunda soğuması sağl veı. Yeni hazırlanan madde, plastik düztabanlı petri kutularına aynı hızda ve yatay yüzeyde, kutu yarısına kadar agarla doldurulacak şekilde döküldü. Agar mddesinin oda sıcaklığında soğuması sağl veı (Fotoğraf 3.11).

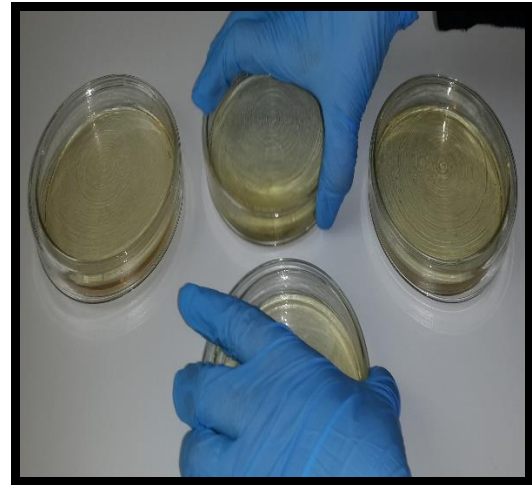


(a)



(b)

Fotoğraf 3.10. TSA Hazırlanması. (a). Triptik soya agarın tartılması (TSA). (b). Otoklav kullanarak sterilize edilmesi



Fotoğraf 3.11. Triptik Soya Agar’ın petri kutularına boşaltılması.

3.1.2.3. Bakteri Kùltürü ve Bakteri Uyarım Deneyleri

A. hydrophila triptik soya agar üzerinde kùltürlenmiş ve tripton soya buyyon içinde hasat edilmiştir (Fotoğraf 3.12).



Fotoğraf 3.12. Tripton Soya Agar içerisindeki *A. Hydrophila* kolonileri.

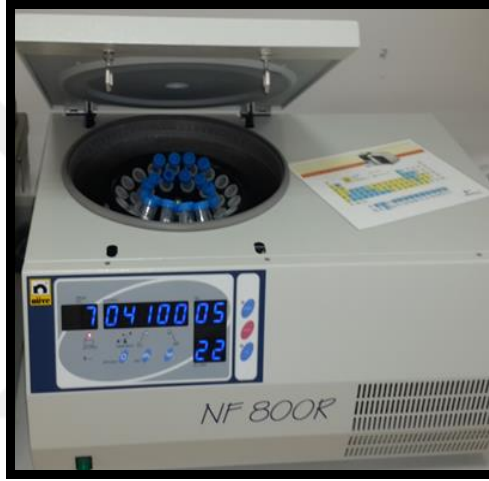
Buyyon, bir gece boyunca 20 °C’de bir çalkalayıcı içinde 12 saatliğine kuluçkaya yatırıldı ve 4 °C’de 5 dakikalığına 1800 rpm’de santrifüjlendi; üst faz atıldı ve bakteriyel pellet PBS (pH 7.2) ile homojenize edilmiş ve santrifüjlenmiş üç döngü ile yık ve (Sigma D8662) (Fotoğraf 3.13).



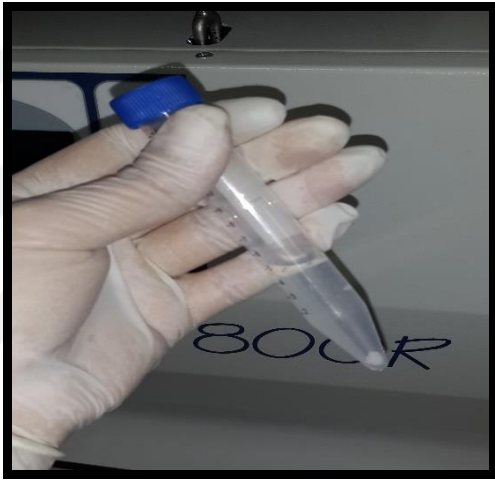
(a)



(b)



(c)



(d)

Fotoğraf 3.13. Bakterinin izolasyonu ve reaktivasyonu. (a). Bakterinin steril koşullarda inokülasyonu. (b). Bakterinin izolasyonu. (c). Santrifüj kullanarak bakterinin çökeltilmesi. (d). Bakteri pelletleri.

Pellet steril PBS içinde tekrar bekletildi ve sonra süspansiyonu McFarl ve No -0.5 turbiditeyle eşleşmesi için ayarlayarak sepsisi tetiklemek için sazan balığına enjekte edilecek 10^8 CFU/ml içeren aşı maddesi hazırlandı ve (Fotoğraf 3.14). Çalışma boyunca sabit bir inokulum sağlamak için, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ '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 3.14. Bakteri Uyarım Deneyleri. (a). Mcferl ve densitometre kullanarak (10^8 cfu/ml) bakteri hazırlanması. (b). *Aeromonas hydrophila*'nın Stok Kültürü.

3.1.3. Deney Balıkları (model)

Sazan (*Cyprinus Carpio*), Kastamonu ilindeki ticari bir firmadan satın alındı. Ortalama ağırlığı 8 ± 2 g, toplam uzunluğu 9 ± 2 cm olan balıklar, Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesine taşındı ve deneyden önce kuluçkahane laboratuvarında 10 gün ortam koşullarına adapte olması sağlandı (Fotoğraf 3.16). Bu süre zarfında balıklar günde üç kez ticari gıda pelletleri ile beslendi. Sazan balık akvaryumunun suyu her gün değiştirildi. Çalışma sırasındaki koşullar şu şekildedir (fotoğrafperiodyod: 14: 10 saatlik açık-karanlık döngü, çözünmüş oksijen 6.1 ± 0.4 mg / L, sıcaklık 24 ± 2 ° C, pH 8 ± 0.5 ve tuzluluk 0.25 ± 0.5 ppt) Harikrishnan vd 2009, Sam Cookiyaei. Adaptasyon süreci sonrasında, balıklar eşit miktarda 200 L su barındıran deney akvaryularına taşınmıştır ($n = 20$ balık / akvaryum). Çalışma sırasında her akvaryumda 11.1 L / dk su akışı ile havalandırma sağlandı ve günlük olarak akvaryumların üçte bir oranında suları değiştirildi (Fotoğraf 3.16).



Fotoğraf 3.15. Kuluçka uygulaması.



Fotoğraf 3.16. Deney akvaryumu.

3.1.4. Ayıraçların Hazırlanması

3.1.4.1. Lizozim Stok Solüsyonunun Hazırlanması

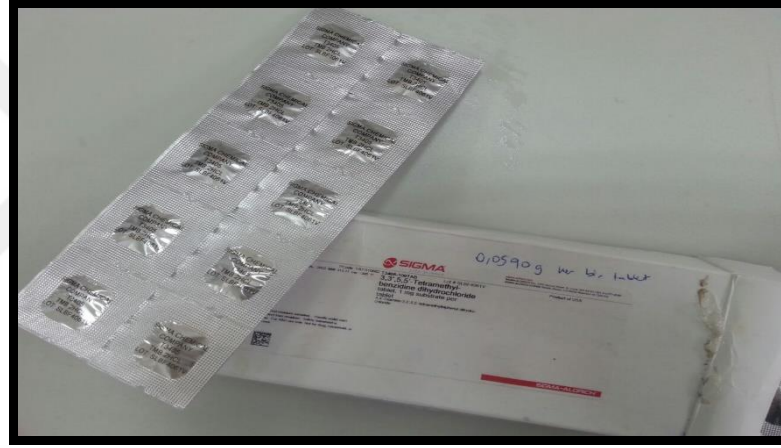
Stok solüsyonları yeterli miktarda toz *Micrococcus lysodeikticus* bakteriyel hücreleri (0.02 g) 100 ml PBS(Sigma D8662) ile çözülerek hazırlı veı. Daha sonra stok solüsyonu 15 dakika süresince 121 °C’de otoklavlanarak siterilize edildi ve 4 °C’de saklı veı.

3.1.4.2. Fosfat Tamponlu Tuzlu Suyun Hazırlanması (PBS)

200 ml'lik iyonsuzlaştırılmış suda bir tablet eritilerek PBS hazırl ve 25°C'de 0.01 M fosfat tampon, 0.0027 M potasyum klorür ve 0.137 M sodyum klorür, pH 7.4 hazırl ve.

3.1.4.3. Miyeloperoksidaz Stok Solüsyonunun Hazırlanması.

100 ml distile suyun içinde bir tablet fosfat sitrat eritildi (Fotoğraf 3.18). TMB substrat solüsyon – Dissol ve one 3,3',5,5'-Tetra-methylbenzidine dihydrochloride tablet in 10 ml of 0.05 M Phosphate-Citrate Buffer, pH 5.0..



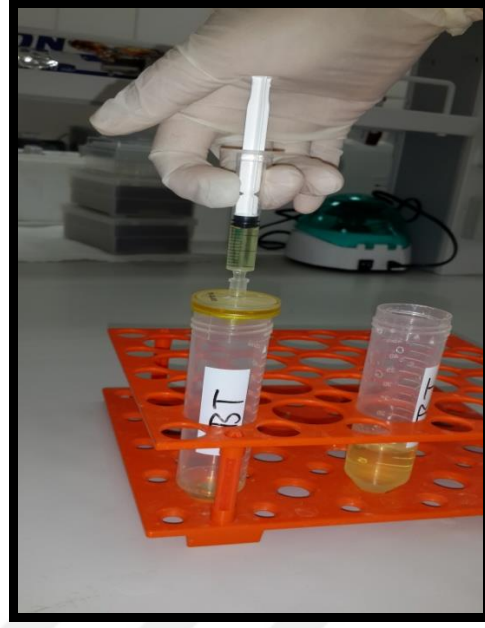
Fotoğraf 3.17. Tetra-metilbenzidin dihidroklorür (TMB) tableti.

3.1.4.4. Nitro blue tetrazolyum (NBT) Stok Solüsyonunun Hazırlanması

10 ml'lik iyonsuzlaştırılmış suda 1 NBT tabletu çözülerek NBT stok solüsyonu hazırl ve (Sigma N5514-25TAB) ve sonra çözelti mikrofilter ile filtreleme yapıldı (Fotoğraf 3.18).



(a)



(b)

Fotoğraf 3.18. NBT stok solüsyonunun hazırlanması. (a). NBT tableti. (b). Mikrofiltre kullanarak filtreleme.

3.2. Metod ve Yöntem

3.2.1. Deney Tasarımı

Bu çalışmada deney zamanlarına göre iki farklı deney (deney 1 ve deney 2) gerçekleştirilmiştir. Her bir deneyin 3 grubu vardır ve bu gruplar kullanılan balıklarda kullanılan ekstratların dozlarına göre ve her bir grupta rastgele dağıtılmış 10 balık olacak şekilde ikişer adet alt gruplara bölünmüştür : kontrol, EXPI 24, EXPI 36, EXP II 24 ve EXP II 36.

3.2.1.1. Deney 1:

Bu deneyde üç grup bulunmaktadır

- *Kontrol Grubu:*

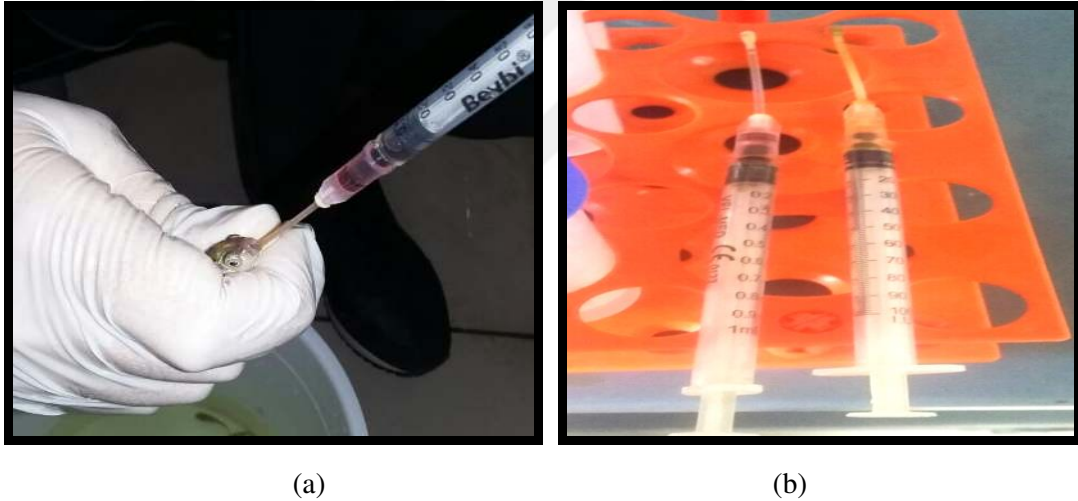
Bazal diyetle (ticari balık gıdası pelletleri) 100 µl BPS ile sadece bir hafta kaldılar.

- *EXP I 24 Grubu:*

Balıklara 1 hafta boyunca günde iki kez esnek PTFE tek kullanımlık iğne (Fotoğraf 3.20) kullanılarak oral uygulama ile 0.1 ml PBS'de (Sigma D8662) 24 mg metanolik Kurkumin özütü uygul veı.

- *EXP I 36 Grubu:*

Balıklara 1 hafta boyunca günde iki kez esnek PTFE tek kullanımlık iğne (Fotoğraf 3.19) kullanılarak oral uygulama ile 0.1 ml PBS'de (Sigma D8662) 36 mg metanolik Kurkumin özütü uygul veı.



Fotoğraf 3.19. Balıkların ağızdan beslenmesi. (a). İğne kullanarak ağızdan besleme. (b). Esnek PTFE tek kullanımlık iğne

İlk gün grupteki bütün balıklara *hydrophila* (ATCC 20662) süspansiyonu (100 μ L PBS içinde 1×10^8 CFUs karıştırılmış) intraperitoneal olarak 0.1 ml. enjekte edilmiştir (Fotoğraf 3.22) (Tricaine Methanesulfonate MS-222) ile (5-7 damla / 1 galon su) anestezi yapıldıktan sonra, (Fotoğraf 3.21) diğer y vea ise kontrol grubuna sadece 0.1 ml PBS(Sigma D8662) enjekte edilmiştir. Bu deneyde balıklar, ertesi günlerde (Sahu vd, 2008) hafif, değişikliklerle birinci, üçüncü ve yedinci günlerde kurban edildi.



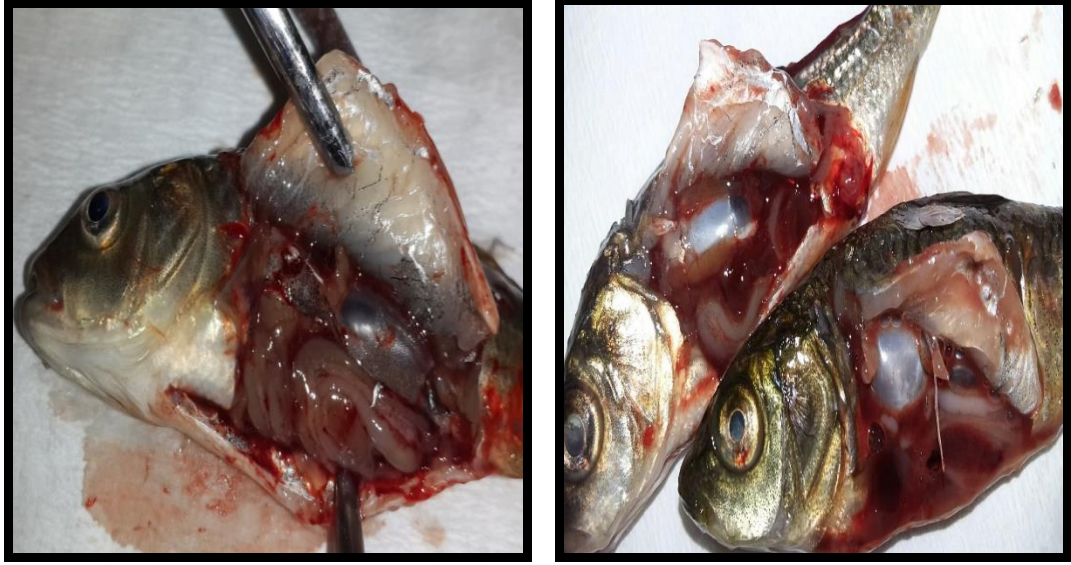
Fotoğraf 3.20. Tricaine Methanesulfonate (MS-222) ile anestezi.



Fotoğraf 3.21. *A. Hydrophila*'nın balıklara intraperitoneal olarak enjekte edilmesi.

3.2.1.2. Deney 2

Balıklar 18 gün boyunca yapay sazan yemi ile beslendi ve yedinci günde balıklara *A. hydrophila* (ATCC 20662) (1×10^8 CFUs/ml) PBS (Sigma D8662) 0.1 ml oranında intraperitoneal olarak enjekte edildi. Kontrol grubuna ise sadece 0.1ml PBS enjekte edildi ve takip eden 5 gün boyunca karın şişliği (karın şişmesi), cilt lezyonları ve küçük kanamalar şeklinde başlayıp hızla büyük alanlara ve soluk solungaçlara genişleyebilen (Fotoğraf 3.22) semptomlar gözlemlendi (Camus *et al*, 1998).



Fotoğraf 3.22. Balıklardaki yapay sepsis semptomları

Semptomların görülmeye başl veği beşinci günde balıklar 0.1 ml PBS Kurkumin ekstratı ile tedavi edilmeye başl veı. Balıklar takip eden 12., 15. ve 18.günde sakrifiye edildi. Bu deneyin protokolü aynı zam vea şu 3 grubu içermektedir:

- Kontrol Grubu:

Bazal diyetle (ticari balık gıdası pelletleri) 100 µl BPS ile sadece 18 gün kaldılar.

- EXP II 24 Grubu:

Balıklara 10 gün boyunca günde iki kez esnek PTFE tek kullanımlık iğne kullanılarak oral uygulama ile 0.1 ml PBS'de (Sigma D8662) 24 mg metanolik Kurkumin özütü uygul veı.

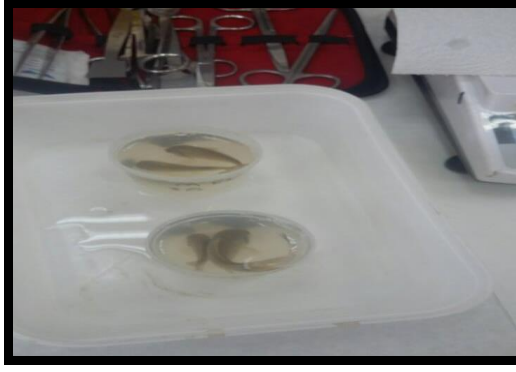
- EXP II 36 Grubu:

Balıklara 10 gün boyunca günde iki kez esnek PTFE tek kullanımlık iğne kullanılarak oral uygulama ile 0.1 ml PBS'de (Sigma D8662) 36 mg metanolik Kurkumin özütü uygul veı.

3.2.2. Numune Toplama ve Analitik Yöntemler

3.2.2.1. Numune Toplama

Yemleme işlemi bittikten sonra, tüm deneyler 2 tekrarla (her tekrarda 8) gerçekleştirildi. Balıklar rasgele içinde su olan beherlere alındı, tartıldı ve baş ve böbrek balıktan ayrılacak şekilde öldürüldü. Baş-böbrek ventral bir kesikle parçalara ayrıldı (Braun *et al*, 1982; Secombes, 1990; Biswas *et al*, 2013). Baş-böbrekler düzgünce çıkartıldı ve 4 ml RPMI-1640(Sigma R8758) ortama aktarıldı (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Kafa böbrek hücre süspansiyonları 4 ° C'de 3 dakika 1800 rpm'de santrifüje tabi tutuldu (Fotoğraf 3.23).



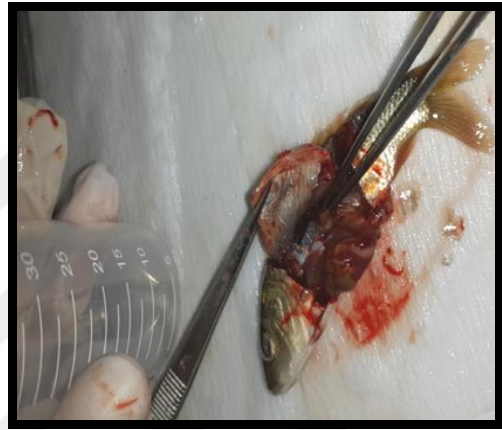
(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

Fotoğraf 3.23. Numune toplama. (a). Balıkları içinde su olan behere aktarma. (b). balıkların tartılması. (c). ventral kesik işlemi. (d). Baş böbrek çıkartılması. (e). Baş böbreğin RPMI solüsyonuna koyulması.

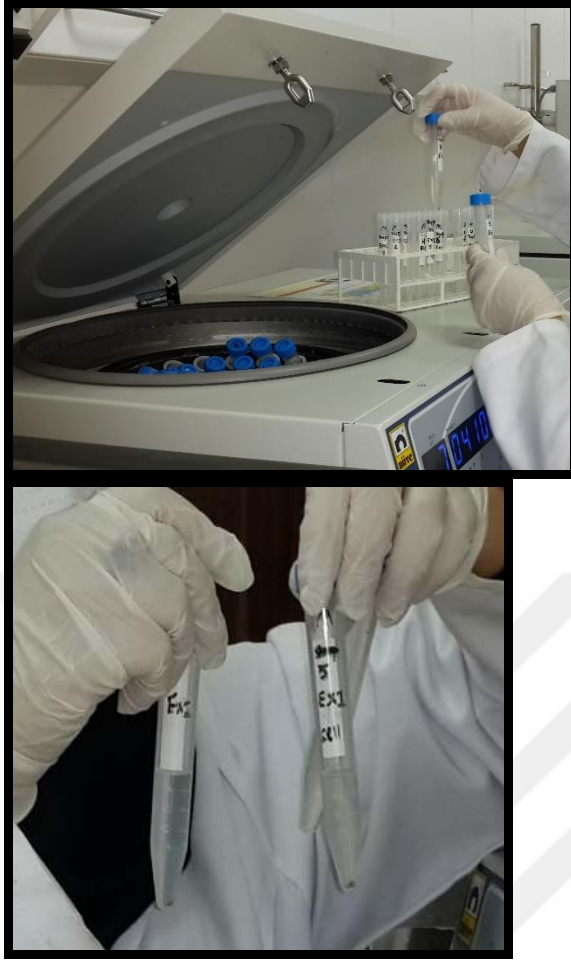
Baş - böbrekler topl ve ve naylon ağ aracılığıyla sıkıştırıldı ($\Phi 100 \mu\text{m}$; Becton, Dickinson ve Company, NJ, USA), Hank's Balanced Salt Solüsyon ile iyice yık ve (HBSS) (Sigma H6648) ve 1% solution of 10,000 g ml⁻¹ streptomycin 10,000 U

ml-1 penicillin ve 5% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen) (Sigma F2442) ile takviye edildi. Solüsyonun son hacmi falkon tüp içinde 3 ml'dir. (Fotoğraf 3.24).



Fotoğraf 3.24. Baş böbreklerin naylon ağı sıkıştırılıp toplanması.

Santrifüj yapıldıktan sonra Pasteur pipeti kullanılarak üst faz topl 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).



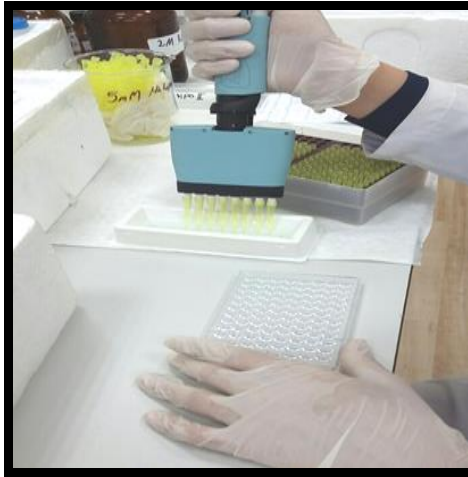
Fotoğraf 3.25. Baş böbrek hücrelerinin santrifüjle çöktürülmesi.

3.2.2.2. Spesifik Olmayan Bağışıklık Parametreleri

Nitroblue tetrazolium (NBT) İndirgeme Ölçümü

Genel Protokol: Reaksiyon, NBT'nin indirgenmesi ile üretilen çözünmeyen mavi formazanın üretimi ile oluşur. Her ne kadar tamamen $O_2^{\cdot-}$ 'ye özgü olmasa da, NBT'nin çözülmez mavi formazana azaltılması süperoksit üretimi için bir araştırma olarak kullanılmıştır (Munoz *et al*, 2000). Biswas *et al*. (2013)'a göre, çok az bir değişiklikte, her numunedan ayrılan HK hücreleri (1×10^8 cells ml⁻¹) 96-hazne

plakasında haznelerde 100 μ L'de tohuml ve1 (Nunc A/S, Roskilde, Denmark). Canlı fagositik hücreler 50 μ L NBT solüsyonuyla uyarıldı ve 1 saat süresince 25 °C'de kuluçkal ve1 (CO₂ Incubator Nu ve 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. Ardından, solüsyonun optikal yoğunluğu mikroplaka fotoğrağraf makinası kullanılarak 620 nm'de ölçülür (Multiskan GO, Thermo Scientific). KOH ve DMSO boş kullanılır (Fotoğraf 2.26).



(a)



(b)



(c)

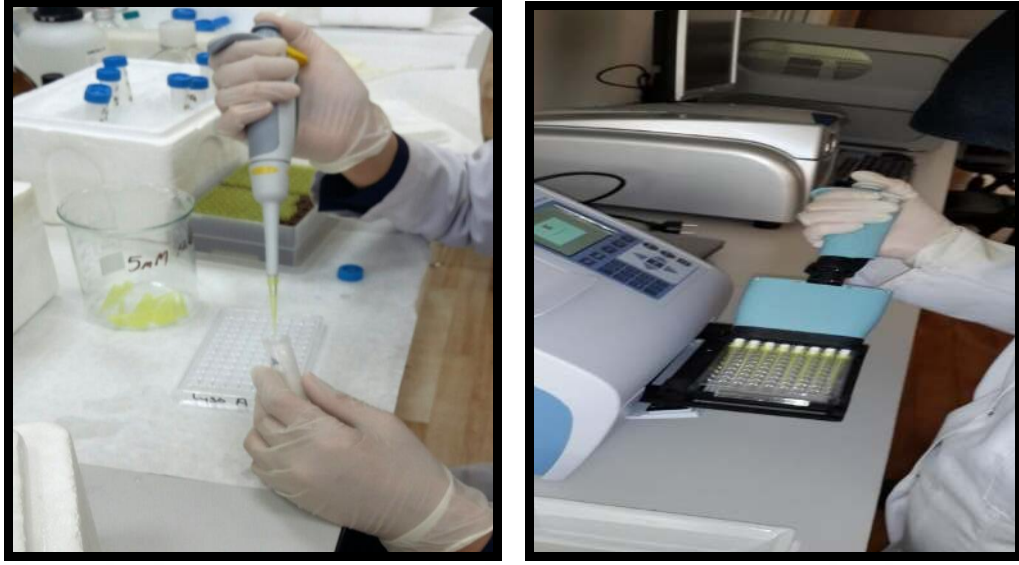


(d)

Fotoğraf 3.26. Nitroblue tetrezolium (NBT) azaltılma analizi. (a). NBT solüsyonları düz tabanlı 96-hazne plağa eklenmesi. (b). NBT numunesinin inkübasyonu (c). NBT tahlilinde kullanılan 96-hazne plakalar. (d). Mikro plaka okuyucu Spektrometre.

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 düztabanlı 96-hazne mikrotitte 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 2.27).



Fotoğraf 3.27. Lizozim aktivitesi tahlil tekniği.

Miyeloperoksidaz Aktivite Ölçümü (MPO)

Genel Protokol: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB), peroksidaz enzimler tarafından hidrojen peroksitin 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 H_2SO_4 ile belki durdurulabilir (sarı renkle sonuçlanarak), ve 450 nm'de okunabilir. Numunede mevcut bulunan toplam miyeloperoksidaz miktarı, çok az bir değişiklikte, Sahoo, Kumari ve Mishra (2005)'a göre ölçülmüştür. Bunun için, 10 μ l lökosit üst faz 90 μ l Ca^{+2} ve Mg^{+2} free Hanks' Balanced Salt Solution ile düztabanlı 96-hazneli mikrotitre plakasında seyreltilmiştir. Sonra, 35 μ l of 20 mM 3,3',5,5'- tetrametilbenzidin hidroklorür ve 35 μ l of 5 mM H_2O_2 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 ($\Delta A_{450}/min/ml$) (Fotoğraf 2.28). 35 μ l of 5 mM H_2O_2 ve 90 μ l of HBSS, 35 μ l of 20 mM 3,3',5,5'- tetrametilbenzidin hidroklorür boş kullanılır.



Fotoğraf 3.28. Miyeloperoksidaz aktivite tahlili tekniği (MPO).

4. BULGULAR

4.1. Spesifik Olmayan Bağışıklık Parametreleri

Deney 1’de 0, 3. ve 7. günlerde, Deney 2’de 12.,15. ve 18. günlerde toplanan numunlerde çeşitli dozlarda (24mg kg-1 ve 36mg kg-1) metanolik *Kurkumin* ekstraktı ile ağızdan beslenerek takviye edilen balıklar spesifik olmayan bağışıklık parametreleri açısından anlamlı farklılık ($P < 0.05$) göstermiştir

4.1.1. Deney 1

4.1.1.1 Nitroblue Tetrazolyum Aktivitesi (NBT)

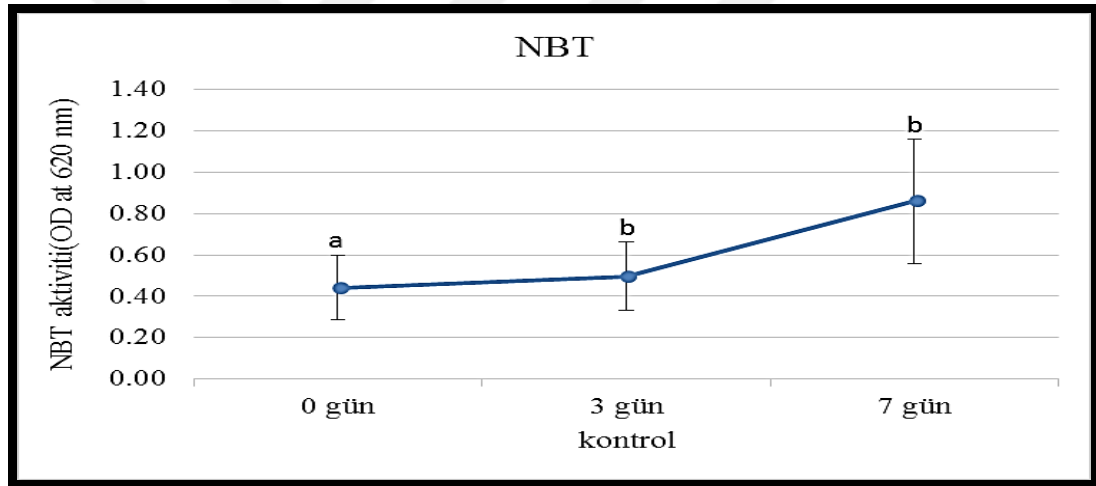
Kurkumin uygulanmış balık grubunun ve kontrol grubunun solunumsal patlama sonuçları (NBT) (OB 620nm)Tablo 4.1’de verilmiştir. Enjeksiyon sonrası 3.günde elde edilen tüm NBT sonuçları anlamsal olarak düşük ($P < 0.05$) çıkmıştır ve deney sonuna kadar o şekilde kalmıştır. Fakat deney grubunun değerleri kontrol grubuyla kıyası verğinde daha yüksektir ($P < 0.05$). En yüksek solunumsal patlama değeri (NBT) ($P < 0.05$) ExpI 24 grubunda 0. enjeksiyon sonrası günde ve uygulama sonrası ($1,25 \pm 0,74$) gözlemlenmiştir. 0. günün sonunda 24 mg Kurkumin verilen balıklarda NBT aktivitesi gösteren balık sayısında anlamlı artış gözlemlenmiştir ($P < 0.05$) öte y vean 36 mg verilen balık grubu 24 mg verilen balık grubuna göre daha düşük, kontrol grubuna göre daha yüksek değere sahiptir. Ayrıca, ikinci numune toplanmasının 3.gününde tüm deney gruplarının NBT değerlerinin kontrol grubundan daha yüksek olduğu ortaya konmuştur ($P < 0.05$). 24 mg Kurkumin verilen grup ile 36 mg Kurkumin verilen grup arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. Öte y vean,7. günün sonunda 24 mg ve 36 mg Kurkumin verilen grupların solunumsal patlama aktivitelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş gözlenmiş ($P < 0.05$). Kontrol grubunda en yüksek değerler 7.günde (0.86 ± 0.30) ve 3. günde (0.50 ± 0.22) kaydedilirken, en düşük değerler 0.günde (0.44 ± 0.40) (Grafik 4.1.) kaydedilmiştir. Bu durumun aksine, 24 mg verilen grup için en yüksek NBT değerleri 0.günde ($1,25 \pm 0,74$) ve 3.günde ($0,99 \pm 0,46$) kaydedilirken, en düşük

değerler 7. günde ($0,67 \pm 0,12$) kaydedilmiştir (Grafik 4.2.). Aynı zam ve 36 mg Kurkumin verilen grup için en yüksek değerler 0.gün ($1,01 \pm 0,25$) ve 3.gün ($0,99 \pm 0,46$) gözlemlenirken, en düşük değer 7. gün ($0,71 \pm 0,27$) gözlemlenmiştir (Grafik 4.3).

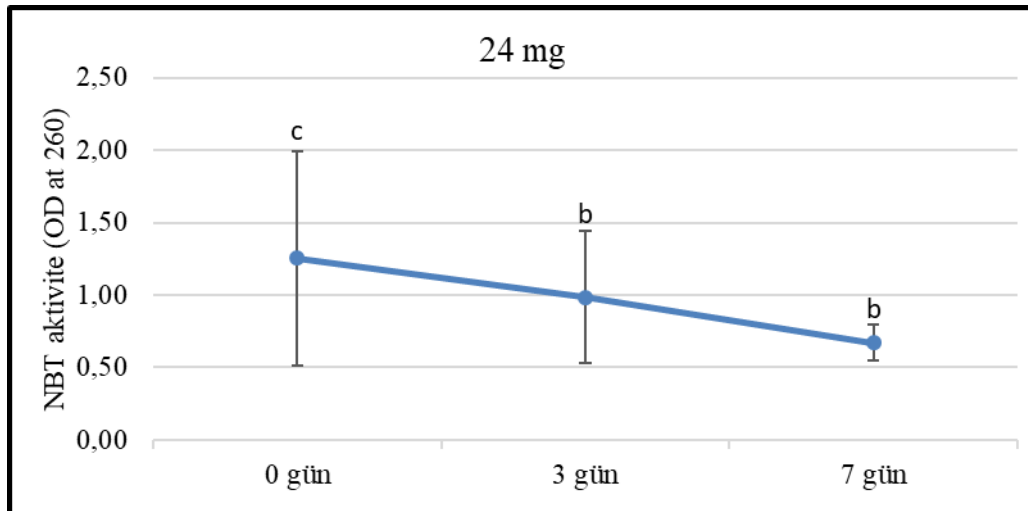
Tablo 4.1. *Çeşitli düzeylerde metanolik Kurkumin ekstratı enfekte edilmiş pullu sazanların farklı numune toplama günlerindeki 7 günlük NBT aktivitesi. Sonuçlar ortalama $\pm$ st ve art sapma şeklinde ifade edilmiştir (S.E).*

Gruplar	Deney günleri		
	0 gün	3 gün	7 gün
Kontrol	$0,44 \pm 0,40^{aA}$	$0,50 \pm 0,22^{bA}$	$0,86 \pm 0,30^{bB}$
24 mg	$1,25 \pm 0,74^{cA}$	$0,99 \pm 0,46^{bB}$	$0,67 \pm 0,12^{bC}$
36 mg	$1,01 \pm 0,25^{cA}$	$0,99 \pm 0,43^{bB}$	$0,71 \pm 0,27^{bC}$

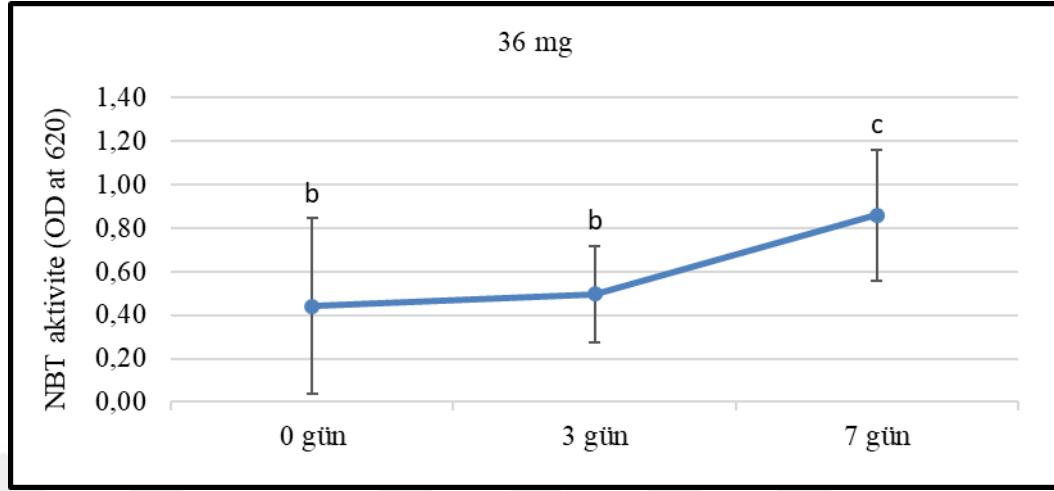
Küçük harfler gruplar arasındaki farklılıkları gösterirken, büyük harfler aynı grubun farklı günler arasındaki farklılığı göstermektedir.



Grafik 4.1.7 gün boyunca BPS ile beslenen enfekte pullu sazanların NBT aktiviteleri.



Grafik 4.2. 7 gün boyunca 24 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların NBT aktiviteleri.



Grafik 4.3. 7 gün boyunca 36 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların NBT aktiviteleri.

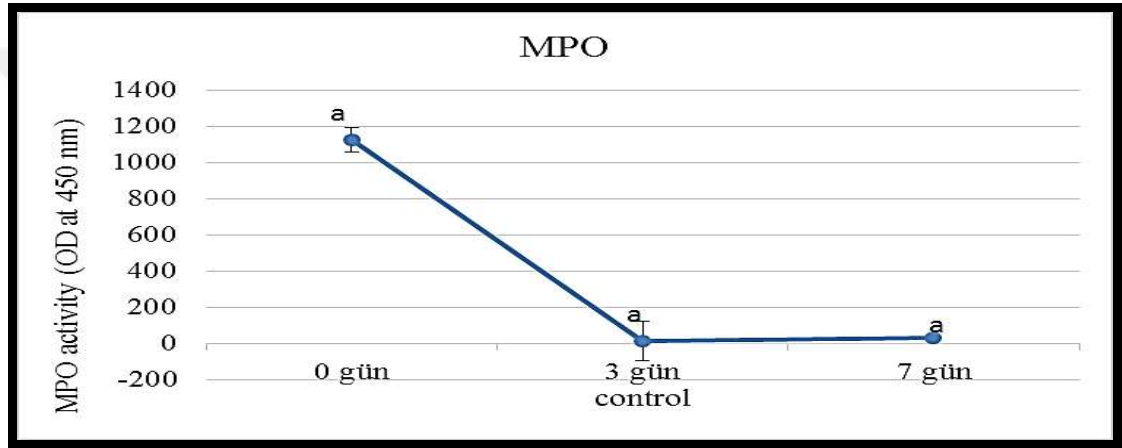
4.1.1.2. Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi

Deney gruplarının Miyeloperoksidaz aktiviteleri (OD 450 nm) Tablo 4.2.'de görüldüğü gibi önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Tüm sonuçlar 3. günde anlamlı bir artış ($P < 0.05$) gösterirken, 7.günde anlamlı bir düşüş göstermiştir ($P < 0.05$). 0. günü takiben 7. saatte 24 mg Kurkumin verilen grubun MPO aktivitesi anlamlı ölçüde kontrol grubundan daha düşük çıkmış ($P < 0.05$) aynı durum 36 mg verilen grup içinde gözlemlenmiştir. Fakat bu gruplar kontrol grubuyla kıyasla veğinde anlamlı bir artış göstermemiştir. Öte y vean hem 24 mg hem de 36 mg Kurkumin verilen gruplar kontrol grubuyla kıyasla veğinde 7.gün anlamlı bir düşüş ($P < 0.05$) göstermiştir. Ayrıca, kontrol grupları için en yüksek MPO değeri 0.gün ($1124,962 \pm 270,148$) ve en düşük değer 3.gün ($10,71 \pm 1,61$) kaydedilmiştir (Grafik 4.4.). Diğer taraftan, 36 mg Kurkumin verilen grubu için en yüksek MPO değeri 3.gün ($432,44 \pm 165,21$) ve 0. gün ($108,353 \pm 40,869$) kaydedilirken, en düşük değer 7.gün ($5,56 \pm 1,64$) kaydedilmiştir (Grafik 4.5.). Ayrıca, 24 mg Kurkumin verilen grubu için en yüksek MPO değeri 3.gün ($506,09 \pm 109,22$) ve 0. gün ($158,988 \pm 66,113$) kaydedilirken, en düşük değer 7.gün ($18,42 \pm 2,90$) kaydedilmiştir (Grafik 4.6.).

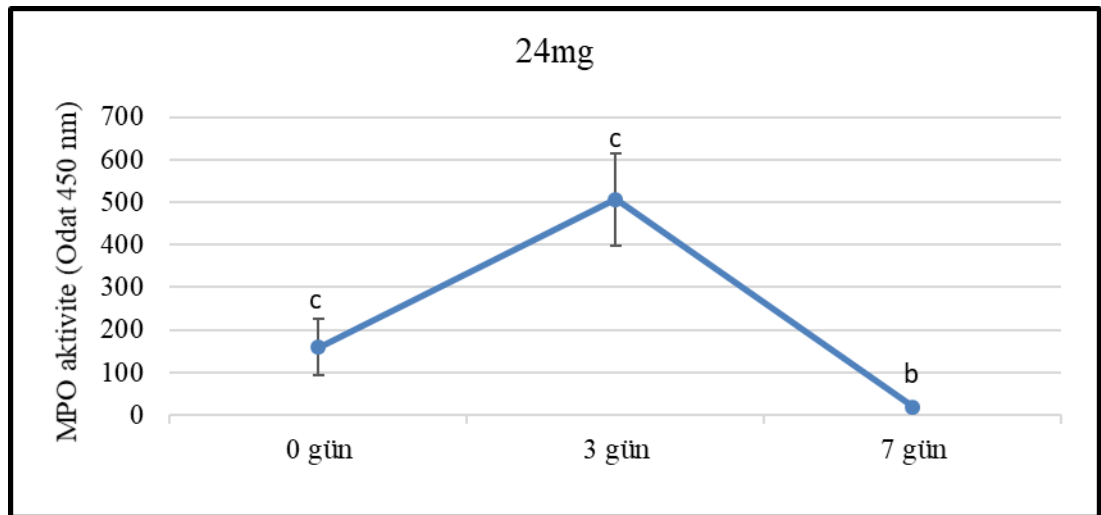
Tablo 4.2. *Çeşitli düzeylerde metanolik Kurkumin ekstratı enfekte edilmiş pullu sazanların farklı numune toplama günlerindeki 7 günlük MPO aktivitesi. Sonuçlar ortalama $\pm$ st veart sapma şeklinde ifade edilmiştir (S.E).*

Gruplar	Deney günleri		
	0 gün	3 gün	7 gün
kontrol	1124,962 $\pm$ 270,148 ^{aA}	10,71 $\pm$ 1,61 ^{aC}	28,83 $\pm$ 14,55 ^{aC}
24 mg	158,988 $\pm$ 66,113 ^{cA}	506,09 $\pm$ 109,22 ^{cC}	18,42 $\pm$ 2,90 ^{bC}
36 mg	108,353 $\pm$ 40,869 ^{cA}	432,44 $\pm$ 165,21 ^{cB}	5,56 $\pm$ 1,64 ^{cC}

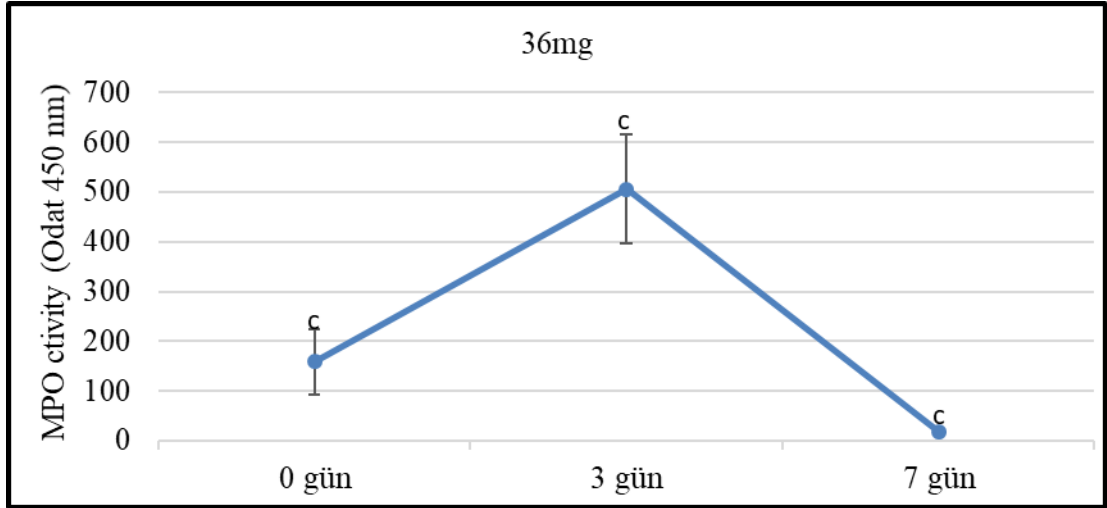
Küçük harfler gruplar arasındaki farklılıkları gösterirken, büyük harfler aynı grubun farklı günler arasındaki farklılığı göstermektedir.



Grafik 4.4. 7 gün boyunca BPS ile beslenen enfekte pullu sazanların MPO aktiviteleri.



Grafik 4.5. 7 gün boyunca 24 mg metanolik Kurkumin ekstratı ile beslenen enfekte pullu sazanların MPO aktiviteleri.



Grafik 4.6. 7 gün boyunca 36 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların MPO aktiviteleri.

4.1.1.3. Lizozim aktivitesi

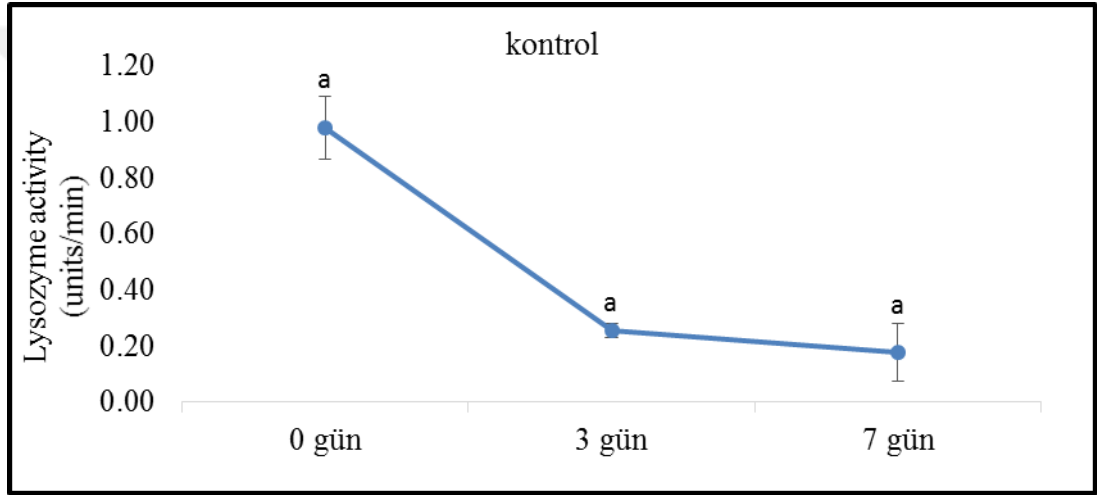
Lizozim aktiviteleri analizi (U/dak) Tablo 4.3.'de açıklanmıştır. Lizozim aktivitesi ekstras ile beslenen gruplarda 0.günden 7.güne düşüş trendi göstermiştir. Bu demek oluyor ki *Kurkumin* takviyesi lizozim aktivitesini anlamlı ölçüde etkileyememiştir. 3.günden itibaren hem deney hem de kontrol gruplarının (Grafik 4.7.,4.8 ve 4.9) lizozim aktivitelerinde 7.gün en düşük noktaya (0.13 ± 0.01) varacak şekilde bir düşüş trendi gözlemlenmiştir. Deney grupları ile kontrol grubu arasında bu değer açısından anlamlı bir farklılık kaydedilmemiştir ($P > 0.05$). 0.günde 36. mg Kurkumin verilen grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık kaydedilirken ($P < 0.05$), 24 mg verilen grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık kaydedilmemiştir ($P > 0.05$). Ayrıca kontrol grubu için en yüksek lizozim değeri 0. günde gözlemlenmiştir (0.98 ± 0.11).

Tablo 4.3. *Çeşitli düzeylerde metanolik Kurkumin ekstratı enfekte edilmiş pullu sazanların farklı numune toplama günlerindeki 7 günlük Lizozim aktivitesi. Sonuçlar*

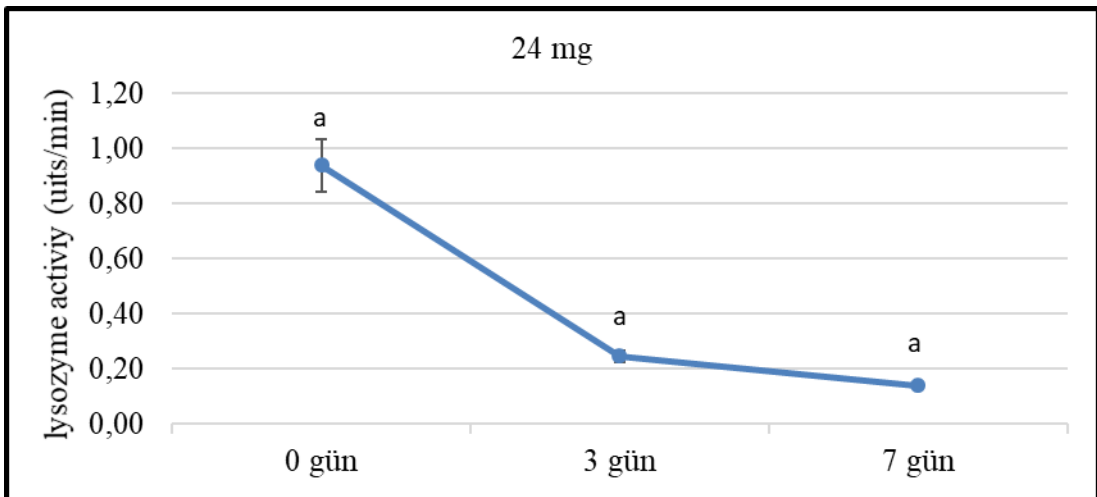
Gruplar	Deney günleri		
	0 gün	3 gün	7 gün
Kontrol	0.98±0.11 ^{aA}	0.26±0.03 ^{aB}	0.18±0.10 ^{aC}
24 mg	0.94±0.09 ^{aA}	0.25±0.02 ^{aB}	0.14±0.01 ^{aC}
36 mg	0.81±0.08 ^{bA}	0.26±0.02 ^{aB}	0.13±0.01 ^{aC}

ortalama ± st veart sapma şeklinde ifade edilmiştir (S.E).

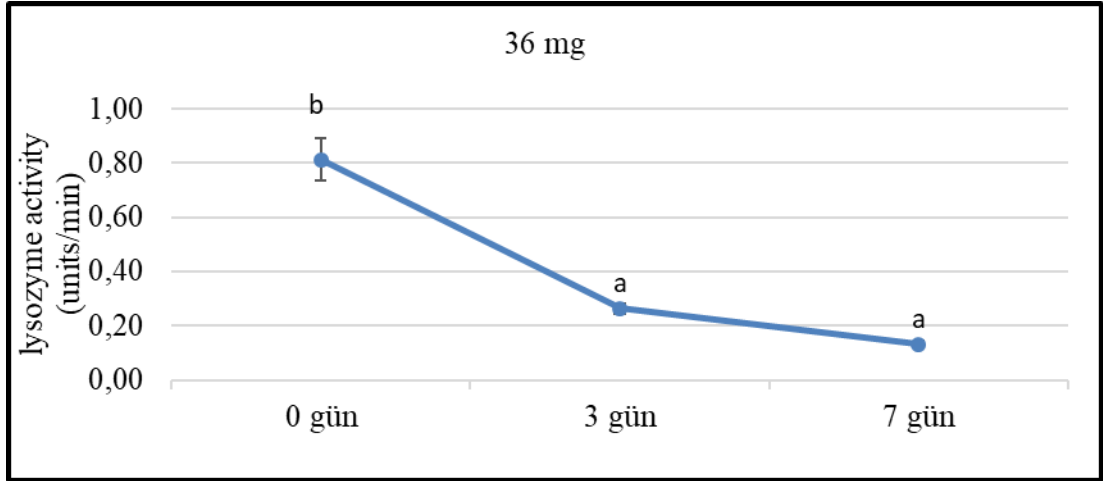
Küçük harfler gruplar arasındaki farklılıkları gösterirken, büyük harfler aynı grubun farklı günler arasındaki farklılığı göstermektedir .



Grafik 4.7. 7 gün boyunca BPS ile beslenen enfekte pullu sazanların Lizozim aktiviteleri.



Grafik 4.8. 7 gün boyunca 24 mg metanolik Kurkumin ekstratı ile beslenen enfekte pullu sazanların lizozim aktiviteleri..



Grafik 4.9. 7 gün boyunca 36 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların lizozim aktiviteleri.

4.1.2. Deney 2

Bu deneyde spesifik olmayan bağışıklık savunma parametreleri 12., 15. ve 18.günlerde ölçülmüştür.

4.1.2.1. Nitroblue Tetrazolyum Aktivitesi (NBT)

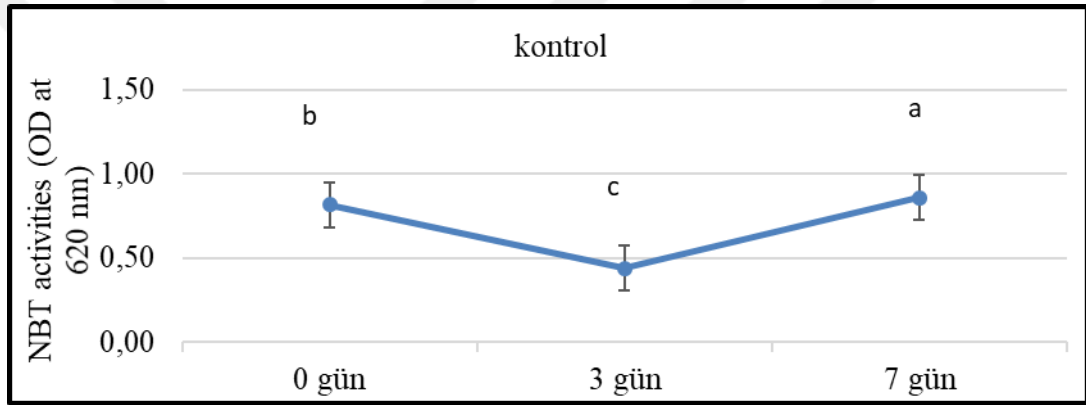
Deney gruplarının NBT (OD 620 nm) aktiviteleri birbirlerinden anlamlı olarak ($P < 0.05$) farklı olduğu gözlemlenmiştir. 24 mg Kurkumin verilen grubun en yüksek NBT değeri 12.günde kaydedilmiştir. Tüm sonuçlar Tablo 4.4.'te verilmiştir. Bu sonuçlara göre hem 24 mg hem de 36 mg verilen deney gruplarının NBT değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($P < 0.05$) yüksektir ayrıca bu iki grup kendi aralarında kıyasla veğinde ise 36 mg verilen grubun değerleri daha yüksektir. 15.günde de aynı şekilde hem 24 mg hem de 36 mg verilen deney gruplarının NBT değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($P < 0.05$) yüksektir. Ayrıca 18. gündeki solunumsal patlama aktivite sonuçları (NBT) 24 mg verilen grubun değerlerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde arttığını ($P < 0.05$) göstermiştir, aynı anlamlı artış farklılığı 36 mg verilen grup için de kaydedilmiştir. Ayrıca, kontrol grubu için en yüksek NBT değeri 18. günde ($0,86 \pm 0,30$) ve 12. günde ($0,82 \pm 0,16$) kaydedilmiştir, aynı grubun en düşük değeri ise 15. günde kaydedilmiştir ($0,44 \pm 0,17$) (Grafik 4.10). Öte y vean, 24 mg Kurkumin verilen

grubun en yüksek NBT değeri 15. günde ($1,47 \pm 0,36$) ve 12. günde ($1,23 \pm 0,22$) kaydedilirken, en düşük değeri 18. günde kaydedilmiştir ($1,04 \pm 0,15$) (Grafik 4.11).

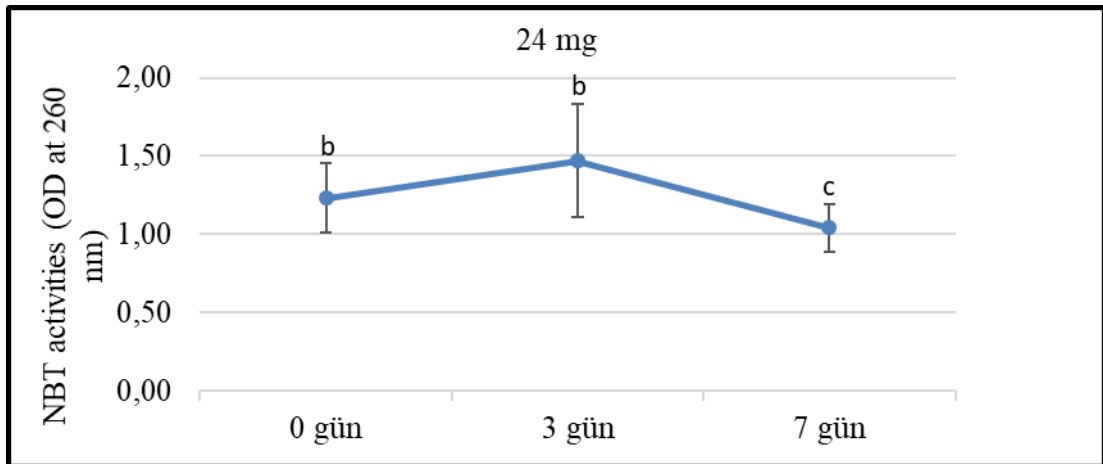
Tablo 4.4. Çeşitli düzeylerde metanolik Kurkumin ekstratı enfekte edilmiş pullu sazanların farklı numune toplama günlerindeki 18 günlük NBT aktivitesi. Sonuçlar ortalama $\pm$ st ve art sapma şeklinde ifade edilmiştir.

Gruplar	Deney günleri		
	12 gün	15 gün	18 gün
Kontrol	$0,82 \pm 0,16^{bA}$	$0,44 \pm 0,17^{cB}$	$0,86 \pm 0,30^{aA}$
24 mg	$1,23 \pm 0,22^{bA}$	$1,47 \pm 0,36^{bB}$	$1,04 \pm 0,15^{cB}$
36 mg	$1,33 \pm 0,64^{cA}$	$1,17 \pm 0,33^{cB}$	$1,19 \pm 0,28^{bC}$

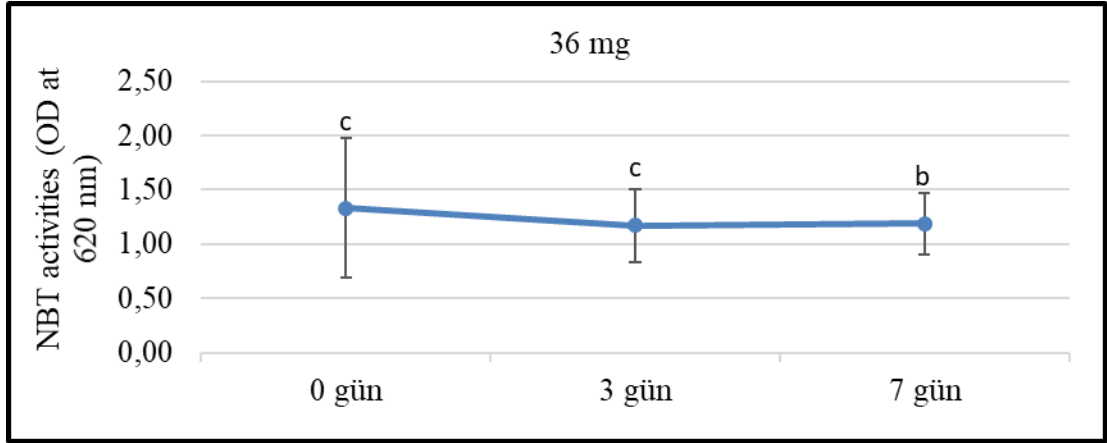
Küçük harfler gruplar arasındaki farklılıkları gösterirken, büyük harfler aynı grubun farklı günler arasındaki farklılığı göstermektedir.



Grafik 4.10. 18 gün boyunca BPS ile beslenen enfekte pullu sazanların NBT aktiviteleri.



Grafik 4.11. 18 gün boyunca 24 mg metanolik Kurkumin ekstratı ile beslenen enfekte pullu sazanların NBT aktiviteleri.



Grafik 4.12. 18 gün boyunca 36 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların NBT aktiviteleri.

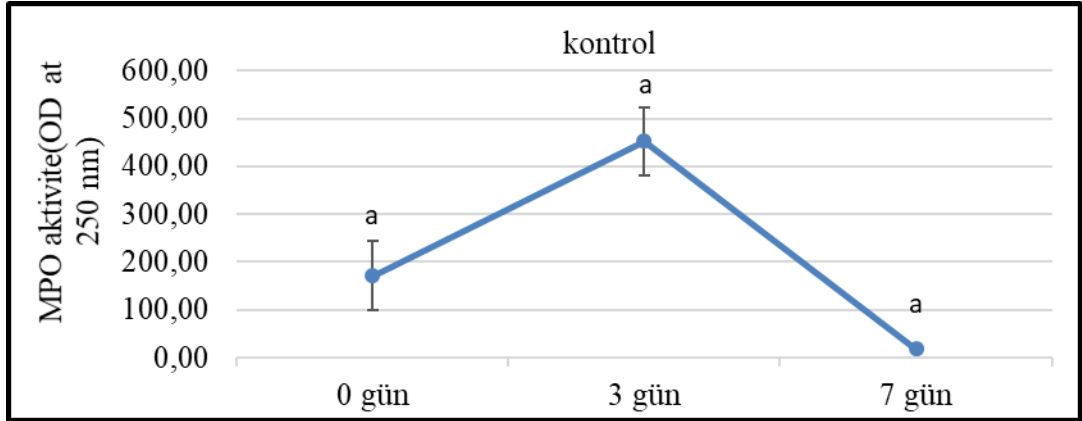
4.1.2.2. Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi

Deney 2 grubunun Miyeloperoksidaz aktiviteleri (OD 450 nm) Tablo 4.5.'te verilmiştir. Sazan balığı MPO içeriği Kurkuminden etkilenmiştir. Bu çalışmada kontrol gruplarının MPO aktivitelerinin deney gruplarınınkinden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. 36 mg Kurkumin verilen grubun MPO değerlerinin 24 mg verilen grubun değerlerinden daha düşük olduğu kaydedilmiştir. 24 mg verilen grubun en yüksek değerleri 15. gün ($451,96 \pm 69,80$) (Grafik 4.15) ve 12.gün ($194 \pm 67,58$) (Grafik 4.13). olarak kaydedilmiştir. 36 mg ekstrakt verilen grubun MPO değerleri 15 ve 18.günler arasında anlamlı bir düşüş göstermiştir ($P < 0.05$) (Grafik 4.13). 24 mg verilen grubun MPO değerleri ise 12. ve 15.günler arasında yükseliş trendi gösterirken 15 ve 18. günler arasında düşüş trendi göstermiştir (Grafik 4.15). En düşük MPO değeri 36 mg Kurkumin verilen grup için 18.günde kaydedilmiştir ($11,29 \pm 2,29$).

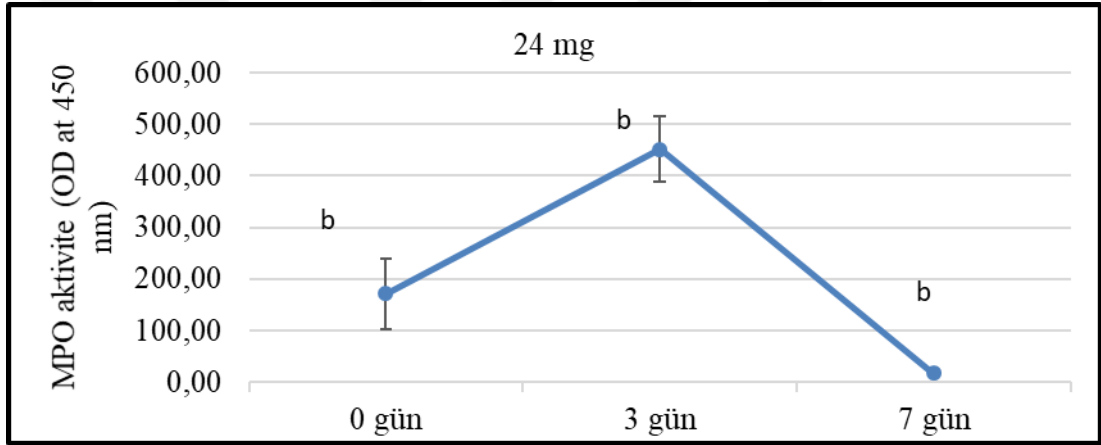
Tablo 4.5. Çeşitli düzeylerde metanolik Kurkumin ekstraktı enfekte edilmiş pullu sazanların farklı numune toplama günlerindeki 18 günlük MPO aktivitesi. Sonuçlar ortalama $\pm$ st ve art sapma şeklinde ifade edilmiştir.

Gruplar	Deney günleri		
	12 gün	15 gün	18 gün
Control	$194 \pm 67,58^{aA}$	$177,13 \pm 62,54^{aB}$	$18,46 \pm 5,80^{aC}$
24 mg	$171,62 \pm 73,59^{bA}$	$451,96 \pm 69,80^{bC}$	$18,42 \pm 2,90^{aC}$
36 mg	$423,93 \pm 99,64^{cA}$	$57,80 \pm 16^{cC}$	$11,29 \pm 2,29^{bC}$

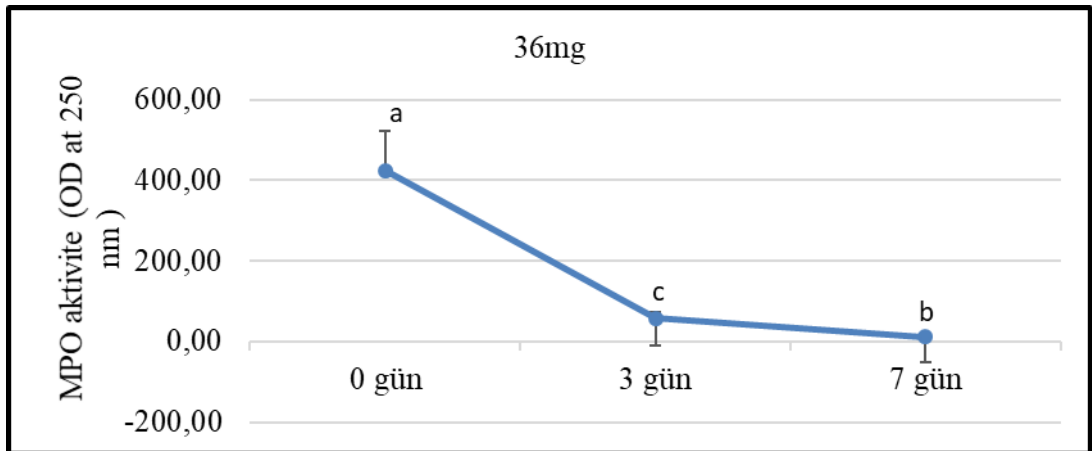
Küçük harfler gruplar arasındaki farklılıkları gösterirken, büyük harfler aynı grubun farklı günler arasındaki farklılığı göstermektedir.



Grafik 4.13. 18 gün boyunca PBS ile beslenen enfekte pullu sazanların MPO aktiviteleri.



Grafik 4.14. 18 gün boyunca 24 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların MPO aktiviteleri.



Grafik 4.15. 18 gün boyunca 36 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların MPO aktiviteleri.

4.1.2.3. Lizozim aktivitesi

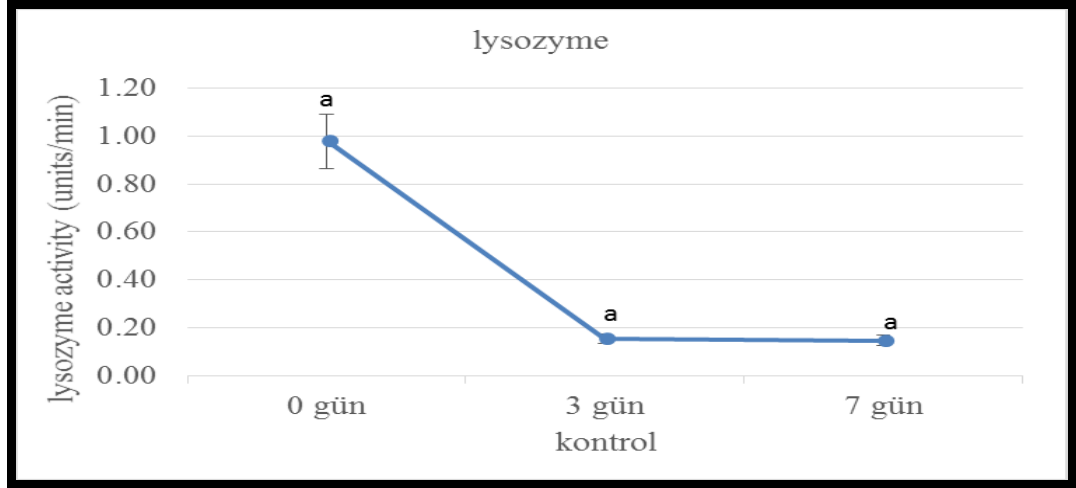
Tüm lizozim aktivite sonuçları (U/dak) Tablo 4.6.'da verilmiştir. Kurkumin verilen grup ve kontrol gruplarının lizozim seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. En düşük değer 36 mg curcuumin verilen grubun 18. gün ölçümünde kaydedilmiştir (Grafik 4.18). 12.gündeki ölçümde 36 mg Kurkumin verilen grubun lizozim değeri 24mg verilen grubun değerine göre daha yüksekken, 18. gündeki sonuçlar bu iki grup ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($P > 0.05$). Kontrol grubu için en yüksek değerler 12. günde (0.96 ± 0.11) ve 15. günde (0.16 ± 0.02) kaydedilmiş, 18. günün sonuçları ise anlamlı bir farklılık göstermemiştir (0.15 ± 0.02) (Grafik 4.16). Aynı şekilde 24 mg Kurkumin verilen deney grubu için en yüksek değerler 12. günde (0.78 ± 0.12) ve 15. günde (0.15 ± 0.02) kaydedilmiş, 18. günün sonuçları ise anlamlı bir farklılık göstermemiştir (0.14 ± 0.01) (Grafik 4.17). Ayrıca, 36 mg Kurkumin verilen grup için en yüksek lizozim değerleri 12. günde gözlemlenmiş (0.86 ± 0.14) bunu 15. gün takip etmiş (0.19 ± 0.02), 18. günde ise bu değer en düşük seviyede gözlemlenmiştir (0.13 ± 0.01) (Grafik 3.19). 15. ve 18.gün değerleri 12 güne kıyasla anlamlı bir düşüş göstermiştir

Gruplar	Deney günleri		
	12 gün	15 gün	18 gün
Kontrol	0.96 ± 0.11^{aA}	0.16 ± 0.02^{aB}	0.15 ± 0.02^{aB}
24 mg	0.78 ± 0.12^{bA}	0.15 ± 0.02^{aB}	0.14 ± 0.01^{aB}
36 mg	0.86 ± 0.14^{bA}	0.19 ± 0.02^{aB}	0.13 ± 0.01^{aB}

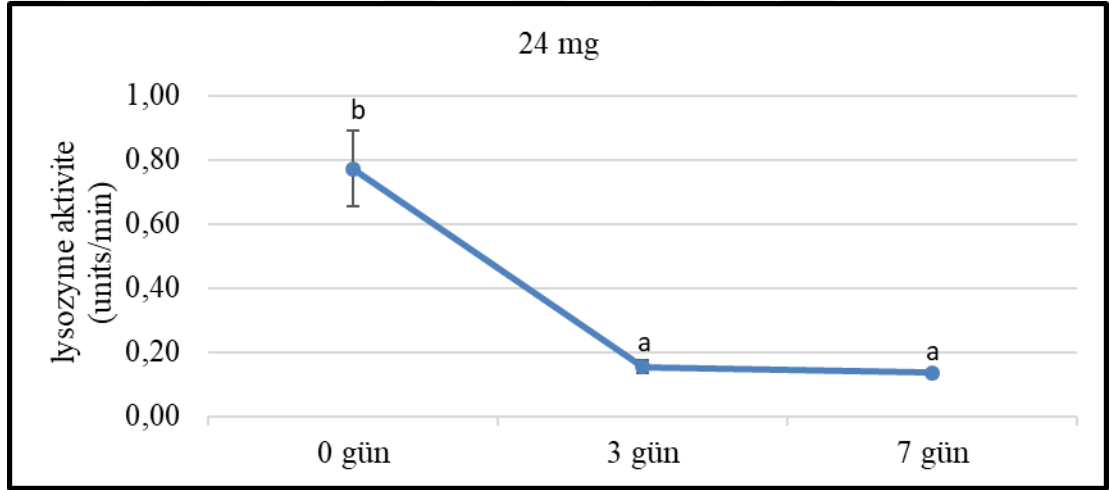
(Grafik 3.19).

Tablo 4.6. Çeşitli düzeylerde metanolik Kurkumin ekstratı enfekte edilmiş pullu sazanların farklı numune toplama günlerindeki 18 günlük Lizozim aktivitesi. Sonuçlar ortalama $\pm$ st veart sapma şeklinde ifade edilmiştir.

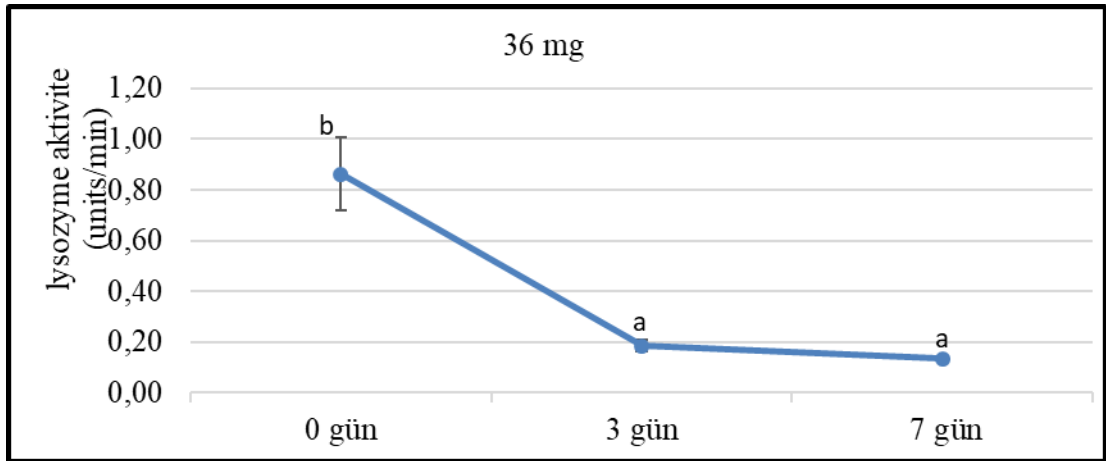
Küçük harfler gruplar arasındaki farklılıkları gösterirken, büyük harfler aynı grubun farklı günler arasındaki farklılığı göstermektedir.



Grafik 4.16. 18 gün boyunca 24 mg PBS ile beslenen enfekte pullu sazanların Lizozim aktiviteleri.



Grafik 4.17. 18 gün boyunca 24 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların lizozim aktiviteleri.



Grafik 4.18. 18 gün boyunca 24 mg metanolik Kurkumin ekstraktı ile beslenen enfekte pullu sazanların lizozim aktiviteleri.

5. TARTIŞMA

Çeşitli hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde kullanılan bitkilerin biyoaktif bileşikleri, vücudun doğal direncini enfeksiyona karşı artırır ve sağlığı geliştirir (Citarasu, Babu, Sekar ve Petermarian, 2002; Devasagayam ve Sainis, 2002). Sepsis, çoğunlukla birden fazla organ işlev bozukluğunun ortaya çıkmasına neden olan ve çeşitli enfeksiyonlara karşı yaygın bir inflamatuvar yanıt olarak geliştiği için milyonlarca insanın ölümüne neden olan karmaşık heterojen bir sendrom olarak ortaya çıkar. İnsanlardaki sepsisin çalışılması zordur ve bu nedenle hayvan modelleri kullanılması gerekmiştir. Hayvan modelleri, sepsis ile ilgili sistematik çalışmada kesinlikle önemli bir rol oynamaya devam edecektir, çünkü genellikle klinik sepsis için deney verileri ile korelasyon terimlerinin yorumlanmasına tabii tutulmaktadırlar. (Popov ve Pavlov, 2013). Su ürünlerinde, tıbbi ot özütlerini kullanan çok sayıda çalışma spesifik olmayan bağışıklık sistemini iyileştirmek için bağışıklık düzenleyici olarak ortaya konmuştur. Metalion bağlayıcı proteinler, aglutinin ve lizozim gibi humoral elementlerin ve makrofajların, nötrofillerin, granülositlerin ve monositlerin esas olarak spesifik olmayan bağışıklık sistemi bileşenleri oldukları kabul edilmektedir. (Secombes, 1990). Bu çalışmada, Kurkumin'in pullu saz veaki (*cyprinus carpio*) *A. hydrophila*'ya karşı spesifik olmayan bağışıklık parametreleri ve hastalık direnci üzerine etkisi araştırılmıştır.

Solunumsal patalama aktivitesi oksijen bağımlı bakterisidal aktivitelerin bir göstergesi olarak Nitroblue Tetrazolyum aktivitesi (NBT) ile tespit edilmiştir. Çalışmada artan NBT seviyesinin balıkların bakteriyel ürünler ve bakteriler de dahil olmak üzere çeşitli zararlı ve istilacı patojenlerden ve glukanolardan (Jha, Pal, Sahu, Kumar ve Mukherjee, 2007) korunmasına katkı sağladığı ortaya konmuştur (Lamas ve Ellis, 1994; Solem, Jørgensen ve Robertsen, 1995). solunumsal patlama adı verilen süreç içinde hidroksit kökü ($\cdot\text{OH}$), süperoksit anyon kökü (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve single oksijen ($^1\text{O}_2$)'den oluşmaktadırlar (Munoz *et al.*, 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 C vean ,2003). Patojenlerin solunumsal patlama aktivitesi, balıklardaki *spesifik* olmayan bağışıklık belirtisi olarak sıklıkla kullanılmaktadır (veerson ve Siwicki, 1995; Sahoo ve Mukherjee, 2002; Sahoo vd, 2005).

Bu çalışmada NBT sonuçları deneyin başlangıcında anlamlı bir düşüş ($P<0.05$) göstermiştir. Siwicki vd (1994) da NBT testi ile immunostimülate edilmiş gökkuşakı alabaklarında oksidatif üretiminde radikal bir artış gözlemlemişlerdir. Daha sonra sonuçlar 3.günde düşüş göstermiş ve hem deney 1 hem de deney 2 için deneylerin bitimine kadar böyle kalmıştır. Bu sonuçlar süperoksit anyon radikalini temizleyerek Kurkumin'in kuvvetli antioksidan özelliğine sahip olmasına atfedilir (Lim ve ark, 2001; Borra, Gurusurthy ve Mahendra, 2013). Diğer y vean en yüksek NBT aktivitesi düşük dozda (24 mg) kaydedilmiştir (Frank vd,2008). Kurkuminoidlerin reaktif oksijen türleri üretimi üzerinde doza bağlı olarak inhibitör etkisi vardır. Behera vd (2011)'nın *Cyprinus carpio* (pullu sazanlara) Kurkumin ekstratı vererek yaptıkları çalışma da bu bulguyu desteklemektedir. Bunun aksine, El-sayed vd (2014), Ekinezya ekstratı ile tedavi edilen Nil Tilapia üzerinde geçici olarak daha yüksek NBT değerleri gözlemlemişlerdir. Ayrıca, Wijendra ve Pathinratne, (2011) levamisol ile beslenen *Cyprinus carpio*larda NBT değerlerinin geliştiğini göstermişlerdir.

Miyeloperoksidaz (MPO) spesifiktir ve bir organizmaya karşı savunmada önemli rol oynayan aktif nötrofiller tarafından üretilen kendine özgü bir hemeproteindir. MPO, nötrofillerin primer azurofilik granüllerinde bol miktarda depolanır. Solunumsal patlaması esnasında hipokloröz asit üretmek için hidrojen peroksit kullanır (Dalmo, Ingebrigtsen ve Bøğwald, 1997). Bu çalışmada miyeloperoksidaz aktivitesi tedavi (deney) gruplarıyla kıyasla veğında kontrol gruplarında daha yüksek çıkmıştır. Bazal nötrofilin artan MPO aktivitesinin hücre içi MPO aktivitesi nedeniyle çözünür

plazma MPO ile ilişkili olmadığını fark etmek önemlidir. Bu sonuç, oral gavaj yoluyla Kurkumin ile beslenen sıçanları çalışan Tuorkey ve Karolin, (2009) tarafından elde edilen verilerle tutarlılık göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçları Behera vd (2011)'nin *Cyprinus carpio (pullu sazanlara)* Kurkumin ekstratı vererek yaptıkları çalışmanın bulgularını desteklemektedir. Basha vd ise (2013) deney gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, *verographis paniculata* ile beslenen *L. rohita* fingerlings için daha yüksek miyelperoksidaz aktivitesi gözlemlenmiştir. Aynı doğrultuda bulgular levamisol enjekte edilen *cyrinus carpio* üzerinde çalışan Siwicki (1987) tarafından da bulunmuştur.

Lizozim, enfeksiyon ve hastalıkları önlemek için fagosit ve kompleman sistemi akti ve eden hem bakterisit hem de opsonin etkileri olan (Alex veer ve Ingram, 1992), spesifik olmayan savunma mekanizmalarının hümöral bir bileşenidir (Beutler, 2004). Bu enzimin bakterisit etkisi, hücre lizisine yol açan bakteriyel hücre duvarlarının peptidoglikanının hidrolizasyonunu kapsamaktadır. Lizozim, mukusta ve balıkların serumunda belirgin olarak görülür. Nötrofiller lizozim kaynağı olarak kabul edilir ve enziminde yüksek omurgalıların lizoziminden çok daha fazla öldürücü bakteri olduğu görülür (Ellis, 2001). Bu çalışmada deney gruplarında lizozim parametresi açısından anlamlı değişiklikler gözlemlenmemiştir. Bu sonuç Ekinezya ekstratıyla beslenen shirbotlardaki lizozim aktivitesinde önemli bir fark olmadığını bildiren Mesbah ve Mohammadia'in çalışması (2015) ile uyumludur. Öte y vean *Solanum tribatum* ve Kurkumin verilen *Oreochromis mossambicus* üzerine çalışan Divyagnaneswari vd, (2008) yüksek derecede lizozim seviyesi tespit etmişlerdir. Aynı doğrultuda, Alishahi vd (2010) Aleo vera ile beslenen *Cyprinus carpio*larda lizozim aktivitesi artışı gözlemlenmiştir..

6. SONUÇ

The present study results summarizes that, feeding of *Kurkumin* might have maintained protection for long-term in fish by significantly stimulate some the non specific immune system such a myeloperoxidase (MPO) activity ve nitroblue tetrazolium (NBT) without any side effects. The effect of *Kurkumin* as an immunomodulator at low doses. Howe ver it's efficacy ve use in health management of fish needs to be further in vestigated by using various pathogens.

KAYNAKLAR

- Akram, M., Uddin, S., Ahmed, A., Usmanghani, K., Hannan, A., Mohiuddin, E. and Asif, M. (2010). Curcuma longa and Curcumin: a review article. *Rom Biol Plant Biol*, 55(2), 65-70.
- Alishahi, M., Ranjbar, M. M., Ghorbanpour, M., Peyghan, R. and Mesbah, M. (2010). Effects of dietary on some specific and nonspecific immunity in the common carp . *International. Andterinary. Resour.* 4(3), 189-195.
- Austin, B. and Austin, D. A. (2007). *Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish*. Springer Science and Business Media.
- Balon, E. K. (2006). The oldest domesticated fishes, and the consequences of an epigenetic dichot.
- Basha, K. A., Raman, R. P., Prasad, K. P., Kumar, K., Nilavan, E. and Kumar, S. (2013). Effect of dietary supplemented andrographolide on growth, non-specific immune parameters and resistance against Aeromonas hydrophila in Labeo rohita (Hamilton). *Fish and Shellfish Immunology*, 35(5), 1433-1441.
- Behera, T., Swain, P., Sahoo, S. K., Mohapatra, D. and Das, B. K. (2011). Immunostimulatory effects of Curcumin in fish, Labeo rohita (H.). *Indian International Prod Resour*, 2, 18.
- Bilen, S., Soydaş, E. and Bilen, A. M. (2014). Isırgan otunun (*Urtica dioica*) metanolik özütünün japon balıklarının (*Carassius auratus*) doğal olmayan bağışıklık yanıtı üzerine etkileri/Effects of methanolic extracts of nettle (*Urtica dioica*) on non-specific immune response of gold fish (*Carassius aura*. *Alinteri Zirai Bilimler Dergisi*, 27(2), 24-28.
- Billard, R. (1999). *The carp: biology and culture*. Springer Science and Business Media.
- Bird, S., Zou, J. and Secombes, C. J. (2006). Advances in fish cytokine biology gi and clues to the evolution of a complex network. *Current Pharmaceutical Design*, 12(24), 3051-3069.

- Biswas, G., Korenaga, H., Nagamine, R., Kawahara, S., Takeda, S., Kikuchi, Y., Dashnyam B, Yoshida T, Kono T & 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.
- Borra, S. K., Gurumurthy, P. and Mahendra, J. (2013). Antioxidant and free radical scavenging activity of Curcumin determined by using different in vitro and ex vivo models. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(36), 2680-2690.
- Borsari, M., Ferrari, E., Grandi, R. and Saladini, M. (2002). Curcuminoids as potential new iron-chelating agents: spectroscopic, polarographic and potentiometric study on their Fe (III) complexing ability. *Inorganica Chimica Acta*, 328(1), 61-68.
- Braun-Nesje, R., Kaplan, G. and Seljelid, R. (1982). Rainbow trout macrophages in vitro: morphology and phagocytic activity. *Developmental and Comparative Immunology*, 6(2), 281-291.
- Camus, A. C., Durborow, R. M., Hemstreet, W. G., Thune, R. L. and Hawke, P. (1998). *Aeromonas Bacterial Infections: Motile Aeromonad Septicemia* (No. 478). Southern Regional Aquaculture Center.
- Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandopadhyay, U. and Banerjee, R. K. (2004). Turmeric and Curcumin: Biological actions and medicinal applications. *Curr Sci*, 87(1), 44-53.
- Cihan, B., Yarat, A., Tunali Akbay, T. and Şener, G. (2015). Investigation of the effect of silymarin on the lipid in experimental sepsis.
- Citarasu, T., Babu, M. M., Sekar, R. R. J. and Petermarian, M. (2002). Developing Artemia enriched herbal diet for producing quality larvae in *Penaeus monodon*, Fabricius. *Asian Fisheries Science*, 15(1), 21-32.
- Cohly, H. H. P., Asad, S., Das, S. K., Angel, M. F. and Rao, M. (2003). Effect of antioxidant (turmeric, turmerin and Curcumin) on human immunodeficiency virus. *International Journal of Molecular Sciences*, 4(2), 22-33.
- Cookson, B. D., Houang, E. T. and Lee, J. V. (1984). The use of a biotyping system to investigate an unusual clustering bacteriaemia caused by *Aeromonas* species. *Journal of Hospital Infection*, 5(2), 205-209.
- Dalmo, R. A., Ingebrigtsen, K. and Bøgwald, J. (1997). Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases*, 20(4), 241-273.

- Dellinger, R. P., Levy, M. M., Rhodes, A., Annane, D., Gerlach, H., Opal, S. M., Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R and Osborn, T. M. (2013). Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of se and re sepsis and septic shock, 2012. *Intensi and care medicine*, 39(2), 165-228.
- Devasagayam, T. P. A. and Sainis, K. B. (2002). Immune system and antioxidants, especially those deri andd from Indian medicinal plants. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40(6), 639-655.
- Ellis, A. E. (1989). The immunology of teleosts. *Fish pathology*, 2, 135-152.
- Ellis, A. E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *De andlopmental and Comparati and Immunology*, 25(8), 827-839.
- Esatbeyoglu, T., Huebbe, P., Ernst, I., Chin, D., Wagner, A. E. and Rimbach, G. (2012). Curcumin—from molecule to biological function. *Angew andte Chemie International Edition*, 51(22), 5308-5332.
- Gupta, S. C., Prasad, S., Kim, J. H., Patchva, S., Webb, L. J., Priyadarsini, I. K. and Aggarwal, B. B. (2011). Multitargeting by Curcumin as re andaled by molecular interaction studies. *Natural product reports*, 28(12), 1937-1955.
- Hardie, L. J., Ellis, A. E. and Secombes, C. J. (1996). In vitro activation of rainbow trout macrophages stimulates inhibition of Renibacterium salmoninarum growth concomitant with augmented generation of respiratory burst products. *Diseases of aquatic organisms*, 25(3), 175-183.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Moon, Y. G., Kim, M. C., Kim, J. S. and Heo, M. S. (2009). USE OF HERBAL CONCOCTION IN THE THERAPY OF GOLDFISH. *Bull andt Inst Pulawy*, 53, 27-36.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M. S. (2011). Impact of plant products on innate and adapti and immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, 317(1), 1-15.
- Igbinosa, I. H., Igumbor, E. U., Aghdasi, F., Tom, M. and Okoh, A. I. (2012). Emerging Aeromonas species infections and their significance in public health. *The Scientific World Journal*, 2012.
- Indira Priyadarsini, K. (2013). Chemical and structural features influencing the biological activity of Curcumin. *Current pharmaceutical design*, 19(11), 2093-2100.
- Irving, G. R., Karmokar, A., Berry, D. P., Brown, K. and Steward, W. P. (2011). Curcumin: the potential for efficacy in gastrointestinal diseases. *Best practice and research Clinical gastroenterology*, 25(4), 519-534.

- Jamieson, D. J., Uyeki, T. M., Callaghan, W. M., Meaney-Delman, D. and Rasmussen, S. A. (2014). What obstetrician–gynecologists should know about Ebola: a perspective and from the Centers for Disease Control and Prevention. *Obstetrics and Gynecology*, 124(5), 1005-1010.
- Jawahar, S., Nafar, A., Vasanth, K., Musthafa, M. S., Arockiaraj, J., Balasundaram, C. and Harikrishnan, R. (2016). Dietary supplementation of Zeolite on growth performance, immunological role, and disease resistance in *Channa striatus* against *Aphanomyces invadans*. *Fish and shellfish immunology*, 51, 161-169.
- Koskivaara, M., Valtonen, E. T. and Prost, M. (1991). Seasonal occurrence of gyrodactylid monogeneans on the roach (*Rutilus rutilus*) and variations between four lakes of differing water quality in Finland. *Aqua Fennica*, 21(1), 47-55.
- Lamas, J. and Ellis, A. E. (1994). Atlantic salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. *Fish and Shellfish Immunology*, 4(3), 201-219.
- LeChevallier, M. W., Seidler, R. J. and Evans, T. M. (1980). Enumeration and characterization of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(5), 922-930.
- Lim, G. P., Chu, T., Yang, F., Beech, W., Frautschy, S. A. and Cole, G. M. (2001). The curry spice Curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *The Journal of Neuroscience*, 21(21), 8370-8377.
- Manoj, V. R. and Vasudevan, N. (2009). Functional Options for Sustainable Shrimp Aquaculture in India. *Reviews in Fisheries Science*, 17(3), 336-347.
- Martí-Carvajal, A. J., Solà, I., Gluud, C., Lathyris, D. and Cardona, A. F. (2012). Human recombinant protein C for severe sepsis and septic shock in adult and paediatric patients. *The Cochrane Library*. Casey, A. and Conrad, K. (2016). Consultation and Comanagement. In *Absolute Hospital Medicine Review* (pp. 107-148). Springer International Publishing.
- Mellersh, A. R., Norman, P. and Smith, G. H. (1984). *Aeromonas hydrophila*: an outbreak of hospital infection. *Journal of Hospital Infection*, 5(4), 425-430.
- Mesbah, M. and Mohammadian, T. (2015). Effects of dietary *Aloe andra* and *Echinacea* on some nonspecific immunity in shirbot (*Barbus grypus*). *Iranian Journal of Aquatic Animal Health*, 2(1), 24-36.
- Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., van der Knaap, W. P., Mialhe, E. and Bachère, E. (2000). Measurement of reactive and oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 191(1), 89-107.

- Musa, N., Wei, L. S., Shaharom, F. and Wee, W. (2008). Sur andillance of bacteria species in diseased freshwater ornamental fish from aquarium shop. *World Applied Sciences Journal*, 3(6), 903-905.
- Peteri, A. (2006) Inl and Water Resources and Aquaculture Service (FIRI). Cultured Aquatic Species Information Programme-Cyprinus carpio. Cultured Aquatic Species Fact Sheets. FAO-Rome.omy in fish culture. *J Ichthyol Aquat Biol*, 11(2), 47-86.
- Picard, B. and Goullet, P. (1987). Seasonal prevalence of nosocomial Aeromonas hydrophila infection related to Aeromonas in hospital water. *Journal of Hospital Infection*, 10(2), 152-155.
- Popov, D. and Pavlov, G. (2013). Sepsis models in experimental animals. *Trakia Journal of Sciences*, 11(1).
- Priyadarsini, K. I. (2009). Fotoğrafğrafphysics, fotoğrafğrafchemistry and fotoğrafğrafbiology of Curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *Journal of Fotoğrafğrafchemistry and Fotoğrafğrafbiology C: Fotoğrafğrafchemistry Reviews*, 10(2), 81-95.
- Priyadarsini, K. I. (2014). The chemistry of Curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*, 19(12), 20091-20112.
- Przybylska, D. A.(2012). Mucosal immune response in common carp (Cyprinus carpio L.) Host pathogen interactions in relation to-glucan stimulation β .
- Rahman, T., Ak anda, M. M. R., Rahman, M. M. and Chowdhury, M. B. R. (2009). Evaluation of the efficacies of selected antibiotics and medicinal plants on common bacterial fish pathogens. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 7(1), 163-168.
- Rey, G., Fouillet, A., Bessemoulin, P., Frayssinet, P., Dufour, A., Jouglu, E. and Hémon, D. (2009). Heat exposure and socio-economic vulnerability as synergistic factors in heat-wa and-related mortality. *European journal of epidemiology*, 24(9), 495-502.
- Roberts, R. J. (1986). Field and laboratory in andstigations into ulcerati and fish diseases in the Asia-Pacific region.
- Sahu, S., Das, B. K., Mishra, B. K., Pradhan, J., Samal, S. K. and Sarangi, N. (2008). Effect of dietary Curcuma longa on enzymatic and immunological profiles of rohu, Labeo rohita (Ham.), infected with Aeromonas hydrophila. *Aquaculture Research*, 39(16), 1720-1730.
- SamCookiyaei, A., Afsharnasab, M., Razavilar, V., Motalebi, A. A., Kakoolaki, S., Asadpor, Y., Yahyazade M. Y. and Nekuie Fard, A. (2012). Experimentally pathogenesis of Aeromonas hydrophila in freshwater Crayfish (Astacus leptodactylus) in iran. , 11(3), 644-656.

- Secombes, C. J. (1990). Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. *Techniques in fish immunology*, 1, 137-154.
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., ... and 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., anderson, D. P. and Rumsey, G. L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *andterinary immunology and immunopathology*, 41(1), 125-139.
- Sokolov, A. V., Kostevich, V. A., Zakharova, E. T., Samygina, V. R., Panasenko, O. M. and 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.
- Solem, S. T., Jørgensen, J. B. and Robertsen, B. (1995). Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*, 5(7), 475-491.
- Soltanian, S. and Fereidouni, M. S. (2016). Effect of Henna (*Lawsonia inermis*) extract on the immunity and survival of common carp, *Cyprinus carpio* infected with *Aeromonas hydrophila*. *International Aquatic Research*, 8(3), 247-261.
- Tønnesen, H. H. and Karlsen, J. (1985). Studies on Curcumin and Curcuminoids. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 180(5), 402-404.
- Tort, L., Balasch, J. C. and Mackenzie, S. (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adapti and responses. *Inmunología*, 22(3), 277-286.
- Tuorkey, M. and Karolin, K. (2009). Anti-ulcer activity of Curcumin on experimental gastric ulcer in rats and its effect on oxidati and stress/antioxidant, IL-6 and enzyme activities. *Biomedical and Environmental Sciences*, 22(6), 488-495.
- Van der Marel, M., Adamek, M., Gonzalez, S. F., Frost, P., Rombout, J. H., Wiegertjes, G. F., Sa andlkoul HFJ& Steinhagen, D. (2012). Molecular cloning and expression of two β -defensin and two mucin genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and their up-regulation after β -glucan feeding. *Fish and Shellfish Immunology*, 32(3), 494-501.

- Wichitnithad, W., Jongaroonngamsang, N., Pummangura, S. and Rojsitthisak, P. (2009). A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of Curcuminoids in commercial turmeric extracts. *Phytochemical Analysis*, 20(4), 314-319.
- Wijendra, G. D. N. P. and Pathinratne, A. (2011). Evaluation of immune responses in an Indian carp, *Labeo rohita* (Hamilton) fed with levamisole incorporated diet. *Journal of Science of the University of Kelaniya Sri Lanka*, 3.
- Wilson, D. (2010). *Clinical and veterinary advisor: The horse*. Elsevier Health Sciences.
- Yu, H. B., Rao, P. S., Lee, H. C., Vilches, S., Merino, S., Tomas, J. M. and Leung, K. Y. (2004). A type III secretion system is required for *Aeromonas hydrophila* AH-1 pathogenesis. *Infection and immunity*, 72(3), 1248-1256.
- Zapata, A. G. and Cooper, E. L. (1990). *The immune system: comparative and histophysiology*. John Wiley and Sons.

