

Isırgan otunun (*Urtica dioica*) metanolik özütünün japon balıklarının (*Carassius auratus*) doğal olmayan bağışıklık yanıtı üzerine etkileri.

Soner Bilen¹ Esra Soydaş² Aslı Müge Bilen¹

¹Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Kastamonu

²Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi, Çanakkale
e-posta: sbilen@kastamonu.edu.tr

Geliş Tarihi/Received:28.10.2014 Kabul Tarihi/Accepted:26.12.2014

Öz: Bu çalışmada ısırgan otunun metanolik özütünün japon balıklarının bağışıklık sistemi üzerine etkileri incelenmiştir. Özütün iki farklı konsantrasyonu (0,1 ve 0,5 g/kg yem) japon balığı yemi içerisinde katılarak balıklar bu yemle 30 gün boyunca beslenmişlerdir. Çalışma sonunda balıkların kaudal venasından kan örneği alınarak süperoksit anyon üretimi (NBT), lizozim, myeloperoksidaz ve fagozitik aktivite gibi parametreler bağışıklık sisteminde meydana gelen değişimleri belirlemek için kullanılmıştır. Çalışma sonunda tüm bağışıklık yanıtların her iki ısırgan otu grubunda da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kayda değer yüksek olduğu belirlenmiştir (P<0.05). Isırgan otu grupları kendi içerisinde değerlendirildiğinde en yüksek bağışıklık yanıtlar % 0,5 ısırgan otu içeren grupta gözlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre ısırgan otu özütünün japon balıkları için etkili bir bağışıklık uyarıcı olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Japon balığı, Metanolik özüt, Isırgan otu, Bağışıklık Uyarıcı.

Effects of methanolic extracts of nettle (*Urtica dioica*) on non-specific immune response of gold fish (*Carassius auratus*).

Abstract: In the study, the immunostimulant effects of the methanolic extract of nettle (*Urtica dioica*) on non-specific immune response of gold fish (*Carassius auratus*) were investigated. Two different concentration of extracts (0.1, 0.5 g/kg of feed) were individually mixed with the basal diet and fed to gold fish for 30 days. At the end of the study, blood samples were collected from caudal vein of the fish to assess the immunomodulatory characteristics of nettle using superoxide anion production (NBT), lysozyme, myeloperoxidase and phagocytic activity. In the study all immune parameters were affected positively by dietary nettle extract intake compared to control (P<0.05). The highest level of the non-specific immune responses were determined in the 0.5% nettle group (P<0.05). According to study results, it can be say that nettle extract is an effective non-specific immunostimulant for gold fish.

Keywords: Gold fish, Methanolic extracts, Nettle, Immunostimulant.

1. GİRİŞ

Süs balıkları yetiştiriciliği günümüzde önemli bir ticari değere sahip olup dünya çapında yaygındır. Süs balıkları içerisinde adet ve ekonomik değer olarak en çok tercih edilen tür Japon balığıdır. Japon balığı üretimi ülkemizde de önem kazanmakta ve giderek yaygınlaşmaktadır. Diğer tüm balık türleri üretiminde olduğu gibi japon balığı üretiminde de bazı sınırlayıcı etmenler söz konusudur. Özellikle hastalıklardan kaynaklanan kayıplar dikkat çekmektedir.

Günümüzde yoğun balık üretiminde tercih edilen yol balıkların hastalandıktan sonra kimyasal veya antibiyotik tedavileri ile sağaltımlarının yapılmasından ziyade hastalıklara yakalanmasını önleyecek önlemlerin alınması yönündedir. Balıkların hastalıklardan korunması için en çok tercih edilen yöntemlerden biri aşılama değildir. Bununla birlikte aşılamanın hastalık yapıcı patojen türler arasındaki sınırlı ve/veya belli türlere karşı etkili olması kullanımını daraltmaktadır (Robertsen, 1999).

Son yıllarda yetiştiriciler balıkları hastalıklardan korumak için bağışıklık uyarıcı maddelere yönelmiş durumdadırlar. Yaygın olarak tercih edilmeye başlayan bu yöntemde kullanılan ürünler bazı kimyasallar (Sahoo ve Mukherjee, 2001) yada bitki özütleri (Bilen ve ark., 2011, Bilen ve ark., 2013) olarak göze çarpmaktadır.

Isırgan otu ülkemizde bol olarak bulunan bir bitki türüdür. Isırgan otunun antioksidan ve bağışıklık yanıt üzerinde etkilerinin incelemek için yapılmış çalışmalar mevcuttur (Düğenci ve ark., 2003). Bu çalışmada ise ısırgan otunun metanolik özütünün Japon balıklarının bağışıklık sistemi üzerine etkileri incelenmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışma Kastamonu Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ortalama ağırlığı $8,1 \pm 0,78$ g olan japon balıkları kullanılmıştır. Ticari bir işletmeden satın alınan japon balıkları 300 L hacmindeki 9 adet akvaryuma her bir akvaryuma 15 adet olacak şekilde stoklanmıştır. Üç tekerrürlü olarak sürdürülen çalışmada ısırgan otunun metanol özütü, yemlerin içerisine % 0, % 0,1 (Is 1) ve % 0,5 (Is 2) olacak şekilde spreyleme yöntemi ile eklenmiş ve balıklar bu yemlerle günde iki kere doyana kadar beslenmişlerdir. Çalışmada kullanılan yem Bilen ve ark (2014)'de belirtilen formüle göre hazırlanmıştır.

Bağışıklık parametrelerinden NBT aktivitesi Siwicki ve Anderson (1993)'e göre yapılmıştır. Kısaca, her bir balıktan alınan 0,1 ml kan örneği üzerine eşit miktarda % 0,2 NBT içeren solüsyondan eklenmiştir. Bu karışım karıştırıldıktan sonra 25 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Aktivasyonu durdurmak için bu karışımın üzerine 1 ml N,N-dimetilformamid eklenmiştir. Karışım 3000 g'de 5 dakika boyunca santifüj edilmiş ve supernatant alınmıştır. Bu örnekler spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda N,N-dimetilformamid kör örneğine karşı okunmuştur.

Lizozim aktivitesi Siwicki ve Anderson (1993)'e göre yapılmıştır. Sonuçlar Lizozim Unit/ml olarak verilmiştir.

Myeloperoksidaz aktivitesi Quade ve Roth (1997)'e göre belirlenmiştir. Kandan elde edilen 20 µl serum Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen Hanks Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma) ile seyreltilmiştir. Daha sonra bu karışımın üzerine 35 µl 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin hidroklorid (TMB, 20 mM) (Sigma) ve H_2O_2 (5 mM) eklenmiştir. Aktivasyonu durdurmak için karışımın üzerine 2 dakika sonra 35 µl 4 M sulfirik asit eklenmiştir. Karışım 450 nm de okunmuştur.

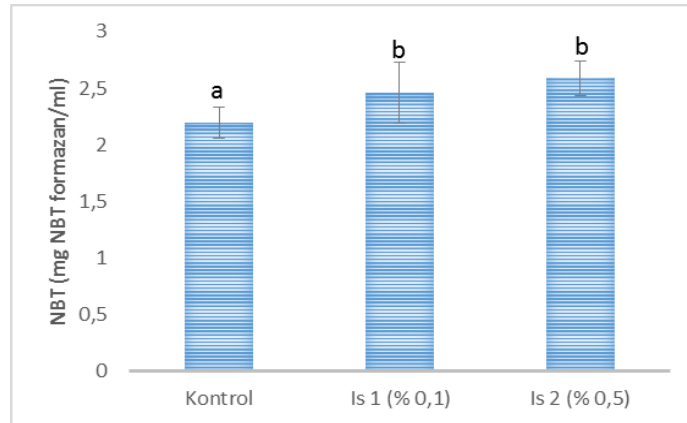
Fagozitik aktivite (FA) Siwicki ve ark. (1994)'e göre belirlenmiştir. Sonuçlar aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$FA = (\text{Fagozitik hücre sayısı} / \text{Toplam hücre sayısı}) \times 100.$$

Çalışma sonunda elde edilen veriler tek yönlü varyans analize tabi tutulmuş ve gruplar arasındaki farklılıkların tespiti için Duncan's Multiple Range ($P < 0,05$) testi kullanılmıştır.

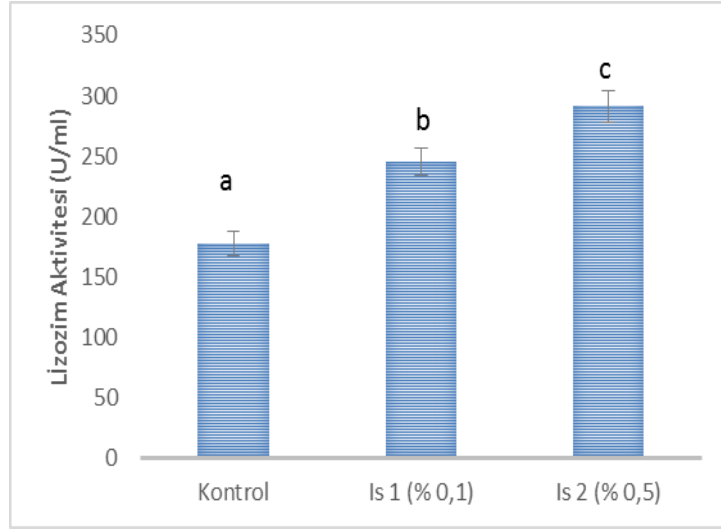
3. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çalışma sonuçlarına göre NBT aktivitesi tüm ısırgan otu gruplarında kontrol grubu ile kıyaslandığında kayda değer artış göstermiştir (Şekil 1). Bununla birlikte gruplar arasında bir farklılık tespit edilememiştir ($P > 0,05$).



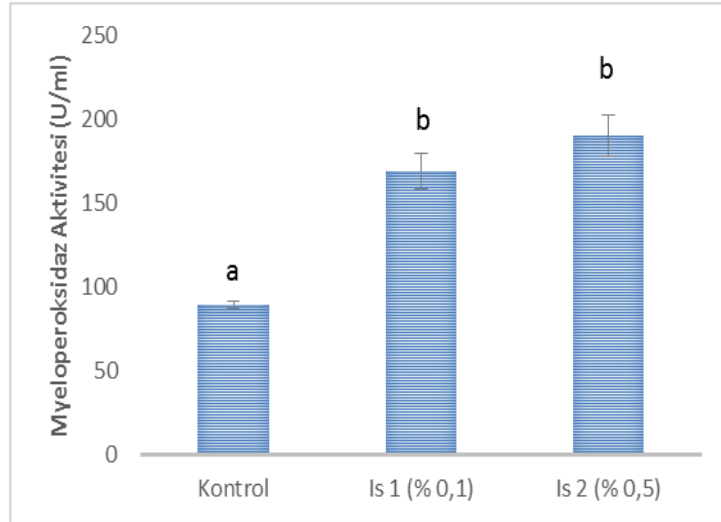
Şekil 1. Farklı dozlarda uygulanan ısırgan otunun metanol özütünün japon balıklarındaki NBT aktivitesi. Farklı harfler gruplar arasındaki farklılıkları ifade eder ($\alpha=0,05$).

Lizozim aktivitesi tüm gruplarda kontrol grubuna göre yüksek olmuştur ($P<0,05$) (Şekil 2). Isırgan otu grupları kontrol edildiğinde Is 2 grubunun lizozim aktivitesi Is 1 grubuna kıyasla daha yüksek tespit edilmiştir ($P<0,05$).



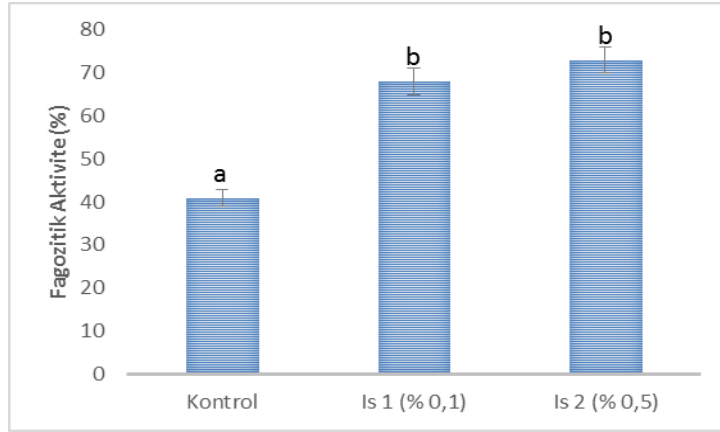
Şekil 2. Farklı dozlarda uygulanan ısırgan otunun metanol özütünün japon balıklarındaki lizozim aktivitesi. Farklı harfler gruplar arasındaki farklılıkları ifade eder ($\alpha=0,05$).

Myeloperoksidaz aktivitesinde de NBT aktivitesine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Çalışma sonunda deneme gruplarındaki myeloperoksidaz aktivitesi kontrol grubuna göre kayda değer oranda artış gösterirken gruplar kendi içerisinde değerlendirildiğinde herhangi bir farklılık tespit edilememiştir ($P>0,05$).



Şekil 3. Farklı dozlarda uygulanan ısırgan otunun metanol özütünün japon balıklarındaki myeloperoksidaz aktivitesi. Farklı harfler gruplar arasındaki farklılıkları ifade eder ($\alpha=0,05$).

Fagozitik aktivite sonuçları Şekil 4. gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre tüm deneme grupları kontrol grubuna göre kayda değer yükselirken gruplar arasında farklılık gözlenmemiştir ($P>0,05$).



Şekil 4. Farklı dozlarda uygulanan ısırgan otunun metanol özütünün japon balıklarındaki fagozitik aktivite. Farklı harfler gruplar arasındaki farklılıkları ifade eder ($\alpha=0,05$).

Akvakültür çalışmalarında immunostimulant kullanımı her geçen gün önemini arttırmaktadır. Özellikle organik ürün yetiştirme çalışmalarında hastalıklara karşı örneğin balığı koruyacak ve antibiyotik ve kimyasal kullanımını en az düzeye indirecek bitkisel kaynaklı ürünlerin kullanımı her geçen gün daha büyük bir önem kazanmaktadır.

Bu çalışma sonuçlarına göre ısırgan otunun metanol özütünün japon balıklarında bağışıklık yanıtı olumlu yönde etkilediği tespit edilmiştir. Isırgan otunun sulu özütünün alabalıklarda bağışıklık sistemi olumlu yönde uyardığı tespit edilmiştir (Düğenci ve ark., 2003). Ayrıca ısırgan otunun doğal olarak kullanımının mersin balıklarında (*Huso huso*) da bağışıklık yanıtı olumlu yönde etkilediği tespit edilmiştir (Binai ve ark., 2014).

Çalışma verilerine göre her iki deneme grubu için de tüm bağışıklık parametrelerinde benzer sonuçlar elde edilmiş ve kontrol grubu ile kıyaslandığında artış gözlenmiştir. Süperoksit radikal salınımı (NBT) patojenlerin öldürülmesinde hücreler tarafından salınan önemli bir elementtir. Çalışmada elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde benzer sonuçlar tetra uygulanan alabalıklarda (Bilen ve ark. 2011), tetra uygulanan koi balıklarında (Bilen ve ark 2013) ve japon balıklarında (Bilen ve ark 2014) tespit edilmiştir. Bunların aksine tilapia balıkları (*Oreochromis niloticus*) *Lonicera japonica* ve *Ganoderma lucidum* (Yin et al., 2008), *Astragalus radix* ve *Scutellaria radix* (Yin e al., 2006) bitki özütleri ile muamele edildiklerinde NBT aktivitesinde bir artışa rastlanmamıştır. NBT aktivitesindeki artışların hücreler içerisindeki zararlı etkilerinin de değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu noktada, daha sonra yapılacak olan çalışmalar ile ısırgan otu metanol özütünün antioksidan özelliklerinin de tespit edilmesi faydalı olacaktır.

Lizozim önemli bir enzim olup aynı zamanda viral, parazitik ve bakteriyel hastalıklarda patojenin hücre duvarının parçalanarak etkisiz hale getirilmesinde önemli rol oynayan doğal olmayan bağışıklık yanıt aktivitesidir (Kumari ve Sahoo 2006). Çalışmamızda lizozim aktivitesi her iki deneme grubu içinde artarken en yüksek seviyesine Is 2 grubunda ulaşmıştır. Önceki çalışmalarda farklı bitki özütlerinin lizozim aktivitesini çalışmamıza benzer şekilde arttırdığı tespit edilmiştir (Düğenci ve ark., 2003; Xie ve ark, 2008; Bilen ve ark., 2011; Bilen ve ark., 2013; Bilen ve ark 2014).

Myeloperoksidaz (MPO) nötrofiller tarafından salgılanan ve H_2O_2 'i kullanarak yabancı amillerin etkisiz hale getirilmesini sağlayan bir enzimdir (Hampton ve Kettle, 1996). Bu çalışmada deneme gruplarının MPO aktiviteleri kayda değer artarken gruplar arasında farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuçlar Alexander ve ark. (2010) ve Bilen ve ark. (2014) çalışmaları ile örtüşmektedir.

Fagozitik aktivite sonuçları, bağışıklık yanıtta görev alan hücrelerde fagozitosisi gerçekleştiren hücre sayılarının attırdığını ve buna ek olarak fagozitosizin arttığı söylenebilir. Özellikle bu sonuçlar Düğenci ve ark. (2003)'ün ısırgan otunun sulu özütünün alabalıklar üzerinde ve Bilen ve ark. (2011)'nin tetra yaprak tozlarının alabalıkların üzerindeki fagozitik aktivitelerindeki artış ile örtüşmektedir.

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde ısırgan otunun metanolik özütünün alabalıklarda bağışıklık yanıtı olumlu yönde etkilediği söylenebilir. Dolayısıyla ısırgan otunun bağışıklık uyarıcı olan bir yem katkısı olarak kullanılması önerilmektedir. Bunlara ek olarak ısırgan otunun Türkiye sınırları içerisinde bol olarak bulunmasına rağmen özüt çıkarma metodu ve maliyetinin yem katkısı olarak kullanımı düşünülen ısırgan otunun ekonomik kriterleri de göz önünde bulundurulmalıdır.

KAYNAKLAR

- Alexander, C.P., Kirubakaran, C.J.W., Michael, R.D. 2010. Water soluble fraction of *Tinospora cordifolia* leaves enhanced the non-specific immune mechanisms and disease resistance in *Oreochromis mossambicus*. *Fish & Shellfish Immun.*, 29:765-772.
- Bilen, S., Bulut, M., Bilen, A.M., 2011. Immunostimulant effects of *Cotinus coggyria* on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 30: 451-455.
- Bilen, S., Yılmaz, S., Bilen, A.M., 2013. Influence of Tetra (*Cotinus coggyria*) Extract against *Vibrio anguillarum* Infection in Koi Carp, *Cyprinus carpio* with Reference to Haematological and Immunological Changes. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 13: 517-522.
- Bilen, S., Yılmaz, S., Bilen, A.M., Biswas, G., 2014. Effects of Dietary Incorporation of Tetra (*Cotinus coggyria*) Extract on Immune Response and Resistance to *Aeromonas hydrophila* in Koi Carp (*Cyprinus carpio*)., *The Israeli Journal of Aquaculture- Bamidgeh*. 66:1-6.
- Binaii, M., Ghiasi, M., Farabi, S.M.V., Pougholam, R., Safari, R., Alavi, S.E., Taghavi, M.J., Bankehsaz, Z., 2014. Biochemical and hemato-immunological parameters in juvenile beluga (*Huso huso*) following the diet supplemented with nettle (*Urtica dioica*). *Fish & Shellfish Immunology*, 36: 46-51.
- Düğenci KS, Arda N, Candan A. Some medicinal plants as immunostimulant for fish. *Journal of Ethnopharmacology* 2003;88:99e106. doi:10.1016/S0378-8741(03)00182-x.
- Hampton, M.B., Kettle, A.J. and Winterbourn, C.C. 1996. Involvement of superoxide and myeloperoxidase in oxygen-dependent killing of *Staphylococcus aureus* by neutrophils. *Infect Immun* 64: 3512–3517.
- Kumari J. and P. K. Sahoo, 2006. Dietary levamisole modulates the immune response and disease resistance of Asian catfish *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Aquac. Res.*, 37:500-509.
- Quade, M.J. and Roth, J.A. 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet Immunol Immunop.*, 58: 239-248. doi: 10.1016/S0165-2427(97)00048-2
- Robertson, B., 1999. Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 269–290.
- Sahoo, P.K., Mukherjee, S.C., 2001. Dietary intake of levamisole improves non-specific immunity and disease resistance of healthy and aflatoxin induced immunocompromised roho (*Labeo rohita*). *J. Appl. Aquacult.* 11, 15–25.
- Siwicki AK, Anderson DP., 1993. Nonspecific Defense Mechanisms Assay in Fish. II. Potential Killing Activity of Neutrophils and Macrophages, Lysozyme Activity in Serum and Organs and Total Immunoglobulin Level in Serum. In: Siwicki AK, Anderson DP, Waluga J, editors. *Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods*. Poland: Olsztyn; 1993. pp. 105–112.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout effects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 41: 125-139.
- Xie J., Liu B., Zhou Q., Su Y., He Y., Pan L., Ge X. And P. Xu, 2008. Effects of anthraquinone extract from rhubarb *Rheum officinale* Bail on the crowding stress response and growth of common carp *Cyprinus carpio* var. Jian. *Aquaculture*, 281:5-11.

- Yin G., Jeney G., Racz T., Xu P., Jun X. and Z. Jeney, 2006. Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 253:39-47.
- Yin G., Ardo L., Jeney Z., Xu P. and G. Jeney, 2008. Chinese Herbs (*Lonicera japonica* and *Ganoderma lucidum*) enhance non-specific immune response of Tilapia, *Oreochromis niloticus*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. *Dis. Asian Aquac. IV*, 269-281.