

Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nda Oksitetrasiklinle İndüklenen Toksikiteye Karşı Polenin Koruyuculuğu

Abdullah Emre SAFİ¹
Serpil MİŞE YONAR²

Özet: Bu çalışmada, gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nda oksitetrasikline karşı polenin koruyuculuğunun araştırılması amaçlandı. Balıklara 60 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklin tek doz olarak enjekte edildi. Oksitetrasiklin enjekte edilen balıklara 30 ppm polen eş zamanlı olarak uygulandı. Deneme 96 saat sürdü ve bu sürenin sonunda balıklardan doku (karaciğer, böbrek ve solungaç) örnekleri alındı. Doku örneklerinde malondialdehit düzeyi, glutatyon peroksidaz, katalaz ve glutatyon-S-transferaz aktiviteleri ile redükte glutatyon düzeyleri analiz edildi. Oksitetrasiklin enjekte edilen grubun doku malondialdehit düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görüldü. Yalnız oksitetrasiklin uygulanan gruba kıyasla oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grubun doku malondialdehit düzeylerinin daha düşük olduğu tespit edildi. Kontrol grubuna göre oksitetrasiklin enjekte edilen grubun doku glutatyon peroksidaz, katalaz ve glutatyon-S-transferaz aktiviteleri ile redükte glutatyon düzeyinin istatistiksel olarak daha düşük olduğu görüldü. Oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grupta doku glutatyon peroksidaz, katalaz ve glutatyon-S-transferaz aktiviteleri ile redükte glutatyon düzeyinin yalnız oksitetrasiklin uygulanan gruba göre daha yüksek olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: antioksidan, balık, doku, oksidatif stres, oksitetrasiklin

Protectiveness of Pollen Against Oxytetracycline-Induced Toxicity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Abstract: In this study, it was aimed to investigate protectiveness of pollen against oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The fish were injected with a single dose of oxytetracycline at a dose of 60 mg / kg fish. 30 ppm pollen was simultaneously applied to oxytetracycline injected fish. The experiment lasted 96 hours and tissue (liver, kidney, and gill) samples were taken from the fish at the end of this period. In tissue samples, malondialdehyde level, glutathione peroxidase, glutathione peroxidase, glutathione-transferase activities and reduced glutathione level were analyzed. Tissue malondialdehyde levels of the oxytetracycline injected group were observed to be statistically higher than the control group ($p<0.05$). Tissue malondialdehyde levels were found to be lower in the group that was applied pollen simultaneously with oxytetracycline when compared to the group treated with oxytetracycline alone ($p<0.05$). Tissue glutathione peroxidase, catalase and glutathione-S-transferase activities and reduced glutathione levels were found to be statistically lower in the oxytetracycline injected group compared to the control group ($p<0.05$). Tissue glutathione peroxidase, catalase and glutathione-S-transferase activities and reduced glutathione levels were found to be higher in the group that was applied pollen simultaneously with oxytetracycline when compared to the group treated with oxytetracycline alone ($p<0.05$).

Keywords: antioxidant, fish, tissue oxidative, stress, oxytetracycline

¹ Meteoroloji 13. Bölge Müdürlüğü, 23119, Elazığ, Türkiye, 0000-0002-5500-6333

² Corresponding author, Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, 23119, Elazığ, Türkiye, serpilmise@gmail.com,

0000-0003-2736-5731

GİRİŞ

Tetrasiklinler içerisindeki en eski ve en büyük grubu oluşturan oksitetrasiklin gram pozitif bakterilerle birlikte gram negatif bakteriler, riketsiya, mikoplazma, spiroket ve aktinomiset gibi mikroorganizmalara etkiyen geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (Aktaş, 2016). Geniş spektrumlu olması nedeniyle neredeyse tüm bakteriyel balık hastalıklarının tedavisinde ilk akla gelen ve kullanılan antibiyotik oksitetrasiklidir. Oksitetrasiklin furunkuloz yersinyoz, kolumnaris, vibriyoz, mikobakterioz ve streptokokkoz gibi önemli birçok bakteriyel enfeksiyonun tedavisinde oldukça fazla tercih edilmektedir. Balıklara enjeksiyon, oral ve immersiyon şeklinde üç farklı yöntemle uygulanabilmektedir (Treves-Brown, 2000). Buna karşın sindirim kanalındaki mikrobiyal floranın uzun süreli uygulamalarda bozulması, yüksek doz ve uzun süreli kullanımlarda karaciğer ve böbrek başta olmak üzere çeşitli organlarda birikerek dejenerasyonlara yol açması ve oksidatif strese neden olması önemli yan etkileri arasında sayılmaktadır (Brander vd., 1982; Kayaalp, 1984; Katzung, 1995; Kaya vd., 2007).

Bitkilerin çiçeklenme dönemlerinde görülen, sarı, kırmızı, mor, yeşil ve siyah gibi farklı renklerde olabilen, çok çekirdekli haploit kromozoma sahip olan, dışı organın tozlaşmasını sağlayan çiçekli bitkilerin erkek üreme organında oluşan, çiçek tozu anlamına da gelen erkek gametofitlere polen denmektedir (Gülhan, 2014; Fişne, 2016; Tümerdem, 2016). İnsan metabolizması için gerekli olan çok değerli besin maddelerini içinde barındıran polen, hem yüksek derecede protein ve karbonhidrat kaynağıdır hem de zengin vitamin ve mineral madde deposudur (Gülhan, 2014). Polenin kimyasal içeriği incelendiğinde yapısında aminoasitlere, proteinlere, karbonhidratlara, lipitlere (doymuş ve doymamış yağlar ve onların türevleri) ve şekerlere yüksek oranda sahip olduğu görülmektedir (Gülhan, 2014; Tümerdem, 2016). Arı polenin yapısında bulunan flavonoidler ve fenolik bileşikler, onun güçlü antioksidan, antimikrobiyal, antiinflammatuvar, antikarsinojen, vazodilatör, antialerjik ve antiviral gibi çeşitli biyolojik aktivitelerinden sorumludurlar (Gülhan, 2014).

Bu çalışmada, balık hastalıklarının tedavisinde oldukça fazla başvuru alan oksitetrasiklinin gökkuşuğu alabalığındaki muhtemel olumsuz yan etkilerine karşı polenin koruyuculuğu araştırılmıştır. Bu amaçla farklı dokulardaki malondialdehit düzeyi, glutatyon peroksidaz, katalaz ve glutatyon-S-transferaz aktivitesi ile redükte glutatyon düzeyi ölçülmüştür.

MATERYAL ve METOT

Araştırmada ortalama ağırlığı yaklaşık 50 ± 5 g olan 150 adet gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanıldı. Elâzığ ili Keban ilçesindeki yerel bir işletmeden canlı olarak temin edilen balıklar, $33 \times 100 \times 60$ cm boyutlarındaki 15 farklı cam akvaryuma (3 tekrar ve her bir tekrar için 5, toplamda 15 akvaryum) her birinde 10 adet olacak şekilde yerleştirildi. Çalışmaya başlamadan önce dezenfekte edilen akvaryumların çalışma başladıktan sonra üzerleri balıkların atlamalarını engellemek için balık ağıyla kapatıldı. Balıkların akvaryumlara 15 gün süreyle adaptasyonu sağlandı.

Akvaryumlar aşağıdaki gibi beş gruba ayrıldı.

- 1: Kontrol grubu;
- 2: Fosfat buffer saline (PBS) enjekte edilen grup;
- 3: 30 ppm konsantrasyonunda 96 saat süreyle banyo yoluyla polen uygulanan grup;
- 4: 60 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklin enjekte edilen grup;

5: 60 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklin enjekte edilen ve 30 ppm konsantrasyonunda 96 saat süreyle banyo yoluyla polen uygulanan grup.

Deneme 96 saat sürdü. Bu sürenin sonunda benzokain (25 mg/l) yardımıyla anestezi edilen balıklar otopsi edildi ve karaciğer, böbrek ve solungacı çıkarılarak folyolara sarıldı. Çıkarılan dokular işleninceye kadar - 20 °C' de derin dondurucuda saklandı.

Çalışmada, her bir tekrarda 50 toplamda ise 150 balık kullanıldı. Çalışmada daha önce Yöntürk (2017), tarafından identifiye edilen ve kimyasal analizi yapılan kestane poleni kullanıldı. Araştırma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 04/11/2020 tarih ve 2020/13 sayılı izni ile gerçekleştirildi.

Oksidan/antioksidan parametrelerin belirlenmesi için öncelikle karaciğer, böbrek ve solungaçlardan homojenatlar hazırlandı. Bunun için dokular serum fizyolojik (% 0,09 NaCl) ile yıkandıktan sonra iki süzgeç kağıdı arasında suyu alındı ve % 1.15'lik potasyum klorür (KCl)' de 1:10 oranında sulandırılıp homojenize edildi. Homojenatlar propilen tüpler içerisinde 3200 rpm'de +4 °C'de soğutmalı santrifüjde 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alındı ve oksidatif stresin bir göstergesi olarak malondialdehit düzeyi (Placer vd., 1966), katalaz (Aebi, 1983), glutatyon peroksidaz (Beutler, 1975) ve glutatyon-S-transferaz (Habig vd., 1974) aktiviteleri ile redükte glutatyon düzeyi (Ellman, 1959) ölçüldü.

Dokulardaki katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon S-transferaz spesifik enzim aktivitesi ile malondialdehit ve redükte glutatyon düzeylerini hesaplamak için ölçülen doku protein düzeyleri Lowry vd. (1951), tarafından bildirilen yöntemle göre belirlendi.

Sonuçların istatistiksel analizleri için SPSS 21.0 istatistik programı kullanıldı. Kontrol ve deneme gruplarının incelenen parametrelerinde oluşan değişimler $p < 0,05$ düzeyinde tek yönlü varyans analizi ile (ONEWAY – ANOVA) test edildi. Gruplar arasındaki farklılıklar ise Least Significant Difference (LSD) ile test edildi. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak verildi.

BULGULAR

Kontrol grubu ile deneme gruplarının karaciğer, böbrek ve dalak malondialdehit (MDA) düzeylerindeki değişimler Tablo 1' de sunulmuştur. PBS enjekte edilen grubun doku MDA düzeylerinin kontrol grubundan istatistiksel olarak herhangi bir farklılık göstermediği saptandı ($p > 0,05$). Kontrol grubu ve PBS enjekte edilen gruba kıyasla, polen uygulanan grubun doku MDA düzeylerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığı belirlendi ($p < 0,05$). Oksitetrasiklin enjekte edilen grubun doku MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$). Yalnız oksitetrasiklin uygulanan gruba kıyasla oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grubun doku MDA düzeylerinin düştüğü ($p < 0,05$), oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grubun doku MDA düzeylerinin kontrol grubuna yakın olduğu ve kontrol grubundan istatistiksel herhangi bir farklılık göstermediği tespit edildi ($p > 0,05$).

Tablo 1. Kontrol ve deneme gruplarının doku malondialdehit (MDA) düzeyleri (nmol/mg protein).

Gruplar	Dokular		
	Karaciğer	Böbrek	Solungaç
1	2,56 \pm 0,41 ^b	3,89 \pm 0,36 ^b	3,37 \pm 0,55 ^b
2	2,60 \pm 0,35 ^b	3,92 \pm 0,48 ^b	3,35 \pm 0,39 ^b
3	2,20 \pm 0,29 ^a	3,37 \pm 0,62 ^a	2,86 \pm 0,47 ^a
4	2,98 \pm 0,63 ^c	4,45 \pm 0,79 ^c	4,06 \pm 0,88 ^c
5	2,68 \pm 0,57 ^b	3,95 \pm 0,66 ^b	3,43 \pm 0,70 ^b

1: Kontrol grubu; 2: Fosfat buffer saline (PBS) enjekte edilen grup; 3: 30 ppm konsantrasyonundaki polenin 96 saat banyo yoluyla uygulandığı grup; 4: 60 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklin enjekte edilen grup; 5: 60 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklin enjekte edilen ve 30 ppm konsantrasyonunda polenin 96 saat banyo yoluyla eş zamanlı uygulandığı grup. ^{ab,c} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0,05).

Kontrol grubu ile deneme gruplarının karaciğer, böbrek ve dalak katalaz (CAT) aktivitelerindeki değişimler Tablo 2'de sunulmuştur. Kontrol grubu ile PBS enjekte edilen grubun doku CAT aktiviteleri arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık tespit edilmedi (p>0,05). Polen uygulanan grubun doku CAT aktivitelerinin kontrol grubu ve PBS enjekte edilen gruba kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı belirlendi (p<0,05). Kontrol grubuna göre oksitetrasiklin enjekte edilen grubun doku CAT aktivitelerinin istatistiksel olarak daha düşük olduğu gözlemlendi (p<0,05). Oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grupta doku CAT aktivitelerinin yalnız oksitetrasiklin uygulanan gruba göre arttığı (p<0,05), oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grubun doku CAT aktivitelerinin kontrol grubuna yakın olduğu ve kontrol grubundan istatistiksel herhangi bir farklılık göstermediği saptandı (p>0,05).

Tablo 2. Kontrol ve deneme gruplarının doku katalaz (CAT) aktiviteleri (k/mg protein).

Gruplar	Dokular		
	Karaciğer	Böbrek	Solungaç
1	3,89 ± 0,46 ^b	3,12 ± 0,52 ^b	2,66 ± 0,32 ^b
2	3,86 ± 0,41 ^b	3,15 ± 0,63 ^b	2,67 ± 0,38 ^b
3	4,37 ± 0,69 ^c	3,74 ± 0,40 ^c	3,16 ± 0,64 ^c
4	3,05 ± 0,27 ^a	2,63 ± 0,36 ^a	2,12 ± 0,51 ^a
5	3,77 ± 0,55 ^b	3,09 ± 0,68 ^b	2,60 ± 0,29 ^b

1: Kontrol grubu; 2: Fosfat buffer saline (PBS) enjekte edilen grup; 3: 30 ppm konsantrasyonundaki polenin 96 saat banyo yoluyla uygulandığı grup; 4: 60 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklin enjekte edilen grup; 5: 60 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklin enjekte edilen ve 30 ppm konsantrasyonunda polenin 96 saat banyo yoluyla eş zamanlı uygulandığı grup. ^{ab,c} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0,05).

Kontrol grubu ile deneme gruplarının karaciğer, böbrek ve dalak glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitelerindeki değişimler Tablo 3'de sunulmuştur. PBS enjekte edilen grubun doku GSH-Px aktivitelerinin kontrol grubundan istatistiksel olarak herhangi bir farklılık göstermediği saptandı (p>0,05). Kontrol grubu ve PBS enjekte edilen gruba kıyasla, polen uygulanan grubun doku GSH-Px aktivitelerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı belirlendi (p<0,05). Oksitetrasiklin enjekte edilen grubun doku GSH-Px aktivitelerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu gözlemlendi (p<0,05). Yalnız oksitetrasiklin uygulanan gruba kıyasla oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grubun doku GSH-Px aktivitelerinin yükseldiği (p<0,05), oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grubun doku GSH-Px aktivitelerinin kontrol grubuna yakın olduğu ve kontrol grubundan istatistiksel herhangi bir farklılık göstermediği tespit edildi (p>0,05).

Kontrol grubu ile deneme gruplarının karaciğer, böbrek ve dalak glutatyon S-transferaz (GST) aktivitelerindeki değişimler Tablo 4'de sunulmuştur. Kontrol grubu ile PBS enjekte edilen grubun doku GST aktiviteleri arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık tespit edilmedi (p>0,05). Polen uygulanan grubun doku GST aktivitelerinin kontrol grubu ve PBS enjekte edilen gruba kıyasla istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı belirlendi (p<0,05). Kontrol grubuna göre oksitetrasiklin enjekte edilen grubun doku GST aktivitelerinin istatistiksel olarak daha düşük olduğu gözlemlendi (p<0,05). Oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grupta doku GST aktivitelerinin yalnız oksitetrasiklin uygulanan gruba göre arttığı (p<0,05), oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grubun doku GST aktivitelerinin kontrol grubuna yakın olduğu ve kontrol grubundan istatistiksel herhangi bir farklılık göstermediği saptandı (p>0,05).

Tablo 3. Kontrol ve deneme gruplarının doku glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri (U/mg protein).

Gruplar	Dokular		
	Karaciğer	Böbrek	Solungaç
1	3,65 ± 0,33 ^b	2,83 ± 0,42 ^b	2,41 ± 0,26 ^b
2	3,38 ± 0,52 ^b	2,80 ± 0,30 ^b	2,45 ± 0,47 ^b
3	4,19 ± 0,66 ^c	3,46 ± 0,49 ^c	2,93 ± 0,38 ^c
4	2,96 ± 0,22 ^a	2,10 ± 0,46 ^a	1,99 ± 0,29 ^a
5	3,54 ± 0,61 ^b	2,72 ± 0,65 ^b	2,34 ± 0,34 ^b

1: Kontrol grubu; 2: Fosfat buffer saline (PBS) enjekte edilen grup; 3: 30 ppm konsantrasyonundaki polenin 96 saat banyo yoluyla uygulandığı grup; 4: 60 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklin enjekte edilen grup; 5: 60 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklin enjekte edilen ve 30 ppm konsantrasyonunda polenin 96 saat banyo yoluyla eş zamanlı uygulandığı grup. ^{a,b,c} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0,05).

Tablo 4. Kontrol ve deneme gruplarının doku glutasyon S-transferaz (GST) aktiviteleri (µmol/dakika/mg protein).

Gruplar	Dokular		
	Karaciğer	Böbrek	Solungaç
1	129,41 ± 11,63 ^b	102,10 ± 9,57 ^b	88,37 ± 10,71 ^b
2	131,08 ± 12,38 ^b	101,47 ± 8,88 ^b	90,14 ± 11,24 ^b
3	148,77 ± 14,29 ^c	114,23 ± 11,09 ^c	105,69 ± 12,75 ^c
4	100,83 ± 12,45 ^a	79,27 ± 8,72 ^a	69,86 ± 7,43 ^a
5	127,59 ± 13,52 ^b	99,98 ± 6,83 ^b	86,25 ± 6,10 ^b

1: Kontrol grubu; 2: Fosfat buffer saline (PBS) enjekte edilen grup; 3: 30 ppm konsantrasyonundaki polenin 96 saat banyo yoluyla uygulandığı grup; 4: 60 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklin enjekte edilen grup; 5: 60 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklin enjekte edilen ve 30 ppm konsantrasyonunda polenin 96 saat banyo yoluyla eş zamanlı uygulandığı grup. ^{a,b,c} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0,05).

Kontrol grubu ile deneme gruplarının karaciğer, böbrek ve dalak redükte glutasyon (GSH) düzeylerindeki değişimler Tablo 5' de sunulmuştur. PBS enjekte edilen grubun doku GSH düzeylerinin kontrol grubundan istatistiksel olarak herhangi bir farklılık göstermediği saptandı (p>0,05). Kontrol grubu ve PBS enjekte edilen gruba kıyasla, polen uygulanan grubun doku GSH düzeylerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı belirlendi (p<0,05). Oksitetrasiklin enjekte edilen grubun doku GSH düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu gözlemlendi (p<0,05). Yalnız oksitetrasiklin uygulanan gruba kıyasla oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grubun doku GSH düzeylerinin yükseldiği (p<0,05), oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grubun doku GSH düzeylerinin kontrol grubuna yakın olduğu ve kontrol grubundan istatistiksel herhangi bir farklılık göstermediği tespit edildi (p>0,05).

Tablo 5. Kontrol ve deneme gruplarının doku redükte glutasyon (GSH) düzeyleri (µmol/mg protein).

Gruplar	Dokular		
	Karaciğer	Böbrek	Solungaç
1	121,53 ± 12,41 ^b	74,25 ± 11,03 ^b	48,73 ± 6,39 ^b
2	124,01 ± 10,88 ^b	72,69 ± 8,25 ^b	50,00 ± 7,82 ^b
3	149,66 ± 14,76 ^c	90,44 ± 7,62 ^c	61,06 ± 5,17 ^c
4	107,09 ± 9,57 ^a	60,10 ± 5,13 ^a	32,29 ± 4,98 ^a
5	120,74 ± 13,15 ^b	73,10 ± 9,94 ^b	47,04 ± 5,26 ^b

1: Kontrol grubu; 2: Fosfat buffer saline (PBS) enjekte edilen grup; 3: 30 ppm konsantrasyonundaki polenin 96 saat banyo yoluyla uygulandığı grup; 4: 60 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklin enjekte edilen grup; 5: 60 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklin enjekte edilen ve 30 ppm konsantrasyonunda polenin 96 saat banyo yoluyla eş zamanlı uygulandığı grup. ^{a,b,c} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0,05).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Oksijenden tek elektronun indirgenmesiyle oluşan serbest radikaller karbohidrat, protein, lipit ve nükleik asitlerin yıkımına sebep olmalarının yanı sıra DNA' ya zarar vermekte, enzim aktivasyonunu ve hücrelerde membran geçirgenliğini bozmaktadırlar. Serbest radikallerin etkisiyle doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı sonucu oluşan, bir başka ifadeyle lipit peroksidasyon sonucu açığa çıkan aldehitlerden biri olan MDA düzeyinin ölçülmesi hücrelerde oluşan oksidatif zararın belirlenmesinde kullanılan en önemli göstergelerden biridir (Benzer, 2001; Morales vd., 2004; Fontagné vd., 2006). Bu araştırmada da oksidatif stresin bir belirteci olarak MDA düzeyindeki değişimler incelenmiştir.

Dastan vd. (2017), tarafından yapılan ve 0,5, 2,5, 5, 10, 20 ve 30 ppm konsantrasyonlarında 96 saat süreyle banyo yoluyla uygulanan polenin alabalıklarda karaciğer, dalak ve kalp dokusundaki MDA düzeylerine etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak karaciğer MDA düzeyinin tüm deneme gruplarında, dalak ve kalp MDA düzeyinin ise 0,5 ppm konsantrasyonunda polen uygulanan grup dışındaki tüm deneme gruplarında düştüğü tespit edilmiştir. Yine alabalıklarda yapılan fakat polenin oral yolla verildiği diğer bir araştırmada deneme gruplarına 21 gün süreyle polen uygulamasının kontrol grubuna göre karaciğer, böbrek ve dalak MDA düzeylerini düşürdüğü belirlenmiştir (Yöntürk, 2017). Bu iki çalışmada elde edilen sonuçların aksine, Ferreira vd. (2012), tarafından yapılan bir çalışmada fungusit karakterdeki tebuconazole maruz kalan *Rhamdia quelen* türü balıklarda, suya katılarak yalnız polenin uygulandığı grubun karaciğer, böbrek ve beyin dokusundaki MDA düzeylerinde istatistiksel herhangi bir farklılık görülmemiştir. Bu çalışmada ise 30 ppm konsantrasyonunda yalnızca polenin uygulandığı grubun karaciğer, böbrek ve solungaç MDA düzeylerinin azaldığı belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç Dastan vd. (2017), ve Yöntürk (2017)' ün bulgularıyla paralel iken, Ferreira vd. (2012), ile tezat oluşturmaktadır.

Öte yandan bu araştırmada karaciğer, böbrek ve solungaç MDA düzeylerinin yalnız oksitetrasiklin uygulanan grupta arttığı belirlenmiştir. Bu sonuç, 100 mg/kg balık dozunda ve 14 gün boyunca oral yolla uygulanan oksitetrasiklinin gökkuşağı alabalığının kan, karaciğer, böbrek, dalak ve kalp dokusunda MDA düzeyini arttırdığını ifade eden Yonar vd. (2011)'nin bulgularıyla paraleldir. Bu paralellik 50 mg/L konsantrasyonunda ve 48 saat banyo tarzında oksitetrasiklinin uygulandığı alabalığın karaciğer, böbrek, dalak ve solungaç MDA düzeylerinin yükseldiği çalışmada da görülmüştür (Mişe Yonar vd., 2014). Fakat bu çalışmada oksitetrasiklinle eş zamanlı polen uygulanan grubun karaciğer, böbrek ve solungaç MDA düzeylerinin kontrol grubuna yakın olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç oksitetrasiklin uygulamasıyla dokularda oluşan oksidatif hasarın polen uygulamasıyla engellendiğini göstermektedir. Önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi (Eraslan vd., 2009) polenin bu etkisi onun güçlü radikal temizleyici etkisiyle veya antiradikal aktivitesiyle açıklanabilir.

Yüksek omurgalılarıdaki gibi balıklarda da antioksidan savunma non-enzimatik ve enzimatik olarak sınıflandırılırlar. Balıklarda en önemli antioksidan enzimler, aktiviteleri ve diğer antioksidanlarla ilişkileri hakkındaki bilgilerin sınırlı olduğu hidrojen peroksid (H_2O_2)'i temizleyen katalaz, süperoksid radikali ($O_2^{\cdot-}$)'ni yok eden süperoksid dismutaz, H_2O_2 ve lipit hidroperoksitleri temizleyen glutatyon peroksidaz ile glutatyona bağlı diğer enzimlerdir (Storey, 1996; Droge, 2002). GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasardan koruyan, enzimatik olmayan, tripeptit karakterinde, endojen, çok önemli bir antioksidandır. GSH protein yapısındaki sülfhidril gruplarını indirgenmiş halde tutarak çoğu protein ve enzimin inaktive olmasını engeller. GSH glutatyona bağlı enzimlerin fonksiyonları için de gereklidir (Hayes ve McLellan, 1999). Örneğin GSH-Px GSH' ı kullanarak H_2O_2 'yi suya dönüştürür. Bu reaksiyonda redükte glutatyon (GSH) okside glutatyon (GSSG) formuna dönüşür. Diğer taraftan GST ise GSH ile elektrofilik gruplar taşıyan bileşikler arasındaki

konjugasyonu katalizleyen, birçok farklı ksenobiyotik ve endojen bileşiklerin detoksifikasyonu ve biyotransformasyonunda rol alan, çok fonksiyonlu faz II enzim ailesinin bir üyesidir (Hamed vd, 2003). Bu çalışmada yalnızca polenin uygulandığı grubun karaciğer, böbrek ve solungaç dokusundaki CAT, GSH-Px ve GST aktiviteleri ile GSH düzeylerinin kontrol grubuna göre yükseldiği tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar diğer birkaç çalışmada da elde edilmiştir. Örneğin, Dastan vd. (2017), alabalıklarda polen uygulamasıyla karaciğer, dalak ve kalp dokusundaki total serbest sülfirid grup düzeylerinin arttığını, ayrıca polenin total antioksidan kapasiteyi (TAS) artırarak total oksidan kapasiteyi (TOS) düşürdüğünü belirlemişlerdir. Yöntürk (2017), alabalıklara 21 gün süreyle % 1, 2 ve 4 oranında oral yolla polen uygulamasının karaciğer, böbrek ve dalak GSH düzeyleri ile GSH-Px aktivitelerini istatistiksel olarak arttırdığını, GST aktivitelerinde ise önemli herhangi bir farklılığa yol açmadığını ifade etmiştir. Ferreira vd. (2012), *Rhamdia quelen* türü balıklara yalnız polen uygulamasının karaciğer GST aktivitesini arttırdığını, böbrek GST aktivitesini düşürdüğünü, beyin dokusundaki GST aktivitesini ise etkilemediğini göstermiştir.

Yonar (2012), 100 mg/kg balık dozunda oksitetrasiklinin oral yolla verildiği gökkuşağı alabalığında kan, karaciğer, böbrek ve dalak CAT ve GSH-Px aktiviteleri ile GSH düzeylerinin düştüğünü fakat bu dokulardaki GST aktivitelerinin ise arttığını belirlemiştir. Alabalığa oksitetrasiklinin banyo yoluyla, 50 mg/L konsantrasyonunda ve 48 saat uygulandığı bir çalışmada ise karaciğer, böbrek, dalak ve solungaç GSH-Px ve GST enzim aktiviteleri ile GSH düzeylerinin düştüğü (böbrek dokusu hariç) tespit edilmiştir (Mişe Yonar vd., 2014). Yukarıda açıklanan çalışmalardan elde edilen bulgulara paralel olarak bu çalışmada da yalnız oksitetrasiklin uygulanan gruptaki balıkların CAT, GSH-Px ve GST enzim aktiviteleri ile GSH düzeylerinin azaldığı görülmüştür. Fakat oksitetrasiklin ile eş zamanlı olarak polen uygulanan deneme grubunun incelenen tüm dokularında CAT, GSH-Px ve GST aktivitelerinin ve GSH düzeylerinin istatistiksel olarak arttığı ve bu değerlerin kontrol grubuna yakın olduğu saptanmıştır. Bu sonuç polenin yapısında bulunan fenolik maddeler sayesinde dokulardaki antioksidan kapasiteyi artırmasıyla açıklanabilir (Leja vd., 2007).

Sonuç olarak yalnızca polen uygulanan gruptaki balıkların incelenen dokularında oksidatif stresin azaldığı, antioksidan kapasitenin arttığı tespit edilmiştir. Yalnızca oksitetrasiklin enjekte edilen gruptaki balıkların incelenen dokularında oksidatif stresin arttığı, antioksidan kapasitenin azaldığı tespit edilmiştir. Ancak oksitetrasiklinle eş zamanlı olarak polen uygulanan grupta oksidatif stresin azaldığı, oksidan/antioksidan parametrelerden elde edilen sonuçlara göre oksitetrasiklinin neden olduğu oksidatif stresin polen uygulamasıyla önlenebileceği belirlenmiştir. Yalnız polen uygulaması oksidatif stresi azalttığı ve antioksidan kapasiteyi arttırdığı için bu madde balıklarda antioksidan olarak kullanılabilir. Oksitetrasiklinin neden olduğu oksidatif stres polen kullanılarak önlenebilir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar bu makale ile ilgili başka kişi veya kurumlar ile çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Not: Bu çalışma; birinci yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

KAYNAKÇA

- Aebi, H. E. (1983). Catalase. HU Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd Ed. Verlag Chemie.
- Aktaş, İ. (2016). *Kilis keçilerinde geleneksel ve uzun etkili oksitetrasiklin müstahzarlarının farmakokinetiği* [Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi].

- Benzer, F. (2001). *Fasciola hepatica* ile enfekte koyunların kan ve karaciğer dokularında arginaz, nitrik oksit, bazı antioksidant enzimler ve lipid peroksidasyon düzeyleri ile karaciğer arginaz enziminin biyokimyasal özellikleri [Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi].
- Beutler, E. (1975). Red cell metabolism. E Beutler (Ed.), *A Manual of Biochemical Methods*. Grune Stroutan.
- Brander, G. C., Pugh, D. M., & Bywater, R. J. (1982). *Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics*, Bailliere Tindall.
- Dastan, S. D., Gulhan, M. F., Selamoglu, Z., & Dastan, T. (2017). The determination of different effective concentration of ethanolic extract of bee pollen on biochemical analysis in liver, spleen and heart tissues of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 16(1), 326-340.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82, 47-95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulphhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70-77. doi: 10.1016/0003-9861(59)90090-6.
- Eraslan, G., Kanbur, M., & Silici, S. (2009). Effect of carbaryl on some biochemical changes in rats: The ameliorative effect of bee pollen. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 86-91. doi: 10.1016/j.fct.2008.10.013.
- Ferreira, D., Unfer, T. C., Rocha, H. C., Kreutz, L. C., Gessi Koakoski, G., & Barcellos, L. J. G. (2012). Antioxidant activity of bee products added to water in tebuconazole-exposed fish. *Neotropical Ichthyology*, 10(1), 215-220. doi: 10.1590/S1679-62252012000100021.
- Fişne, A. (2016). *Trabzon yöresi ballarında polen analizi* [Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi].
- Fontagné, S., Bazin, D., Brèque, J., Vachot, C., Bernarde, C., Rouault, T., & Bergot, P. (2006). Effects of dietary oxidized lipid and vitamin A on the early development and antioxidant status of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) larvae. *Aquaculture*, 257, 400-411. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.01.025.
- Gülhan, M. F. (2014). *Nitrik oksit sentaz blokajı ile hipertansiyon oluşturulan sıçanlarda propolis, cape ve polen'in kan basıncı, adma, NF-KB ve paraoksanaz düzeylerine etkileri* [Doktora Tezi, Niğde Üniversitesi].
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- Hamed, R. R., Farid, N. M., Elowa, S. H. E., & Abdalla, A. M. (2003). Glutathione related enzyme levels of freshwater fish as bioindicators of pollution. *The Environmentalist*, 23, 313-322. doi: 10.1023/B:ENVR.0000031409.09024.cc.
- Hayes, J. D., & McLellan, L. I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*, 31, 273-300. doi: 10.1080/10715769900300851.
- Katzung, B. G. (1995). *Temel ve Klinik Farmakoloji*. (Çev. Z. Özünler). Melisa Matbaacılık.
- Kaya, S., Pirinççi, İ., & Bilgili, A. (2007). *Veteriner Farmakoloji*. Medisan Yayınevi.
- Kayaalp, O. (1984). *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Ulucan Matbaası.

- Leja, M., Mareczek, A., Wyżgolik, G., Klepacz-Baniak, J., & Czekońska, K. (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*, 100(1), 237-240. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.09.047.
- Lowry, O. H., Rosenberough, N. J., Farr, A. L., & Randal, R. J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biochemistry*, 193, 265-275.
- Mişe Yonar, S., Yonar, M. E., Yöntürk, Y., & Sarıeyyüpoğlu, M. (2014). Oksitetrasiklinin gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nda oksidatif stres ve bazı antioksidan parametrelere etkisinin araştırılması. *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 29(1), 37-45.
- Morales, A. E., Pérez-Jiménez, A., Hidalgo, M. C., Abellán, E., & Gabriel C. G. (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 139(1-3), 153-161. doi: 10.1016/j.cca.2004.10.008.
- Placer, Z. A. Cushman, L., & Johnson, B. C. (1966). Estimation of products of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 16, 359-364. doi: 10.1016/0003-2697(66)90167-9.
- Storey, K. B. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29, 1715-1733.
- Treves-Brown, K. M. (2000). *Applied Fish Pharmacology*. Kluwer Academic Publisher.
- Tümerdem, Ç. (2016). *Beypazarı ballarında polen analizi* [Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi].
- Yonar, M. E. (2012). The effect of lycopene on oxytetracycline-induced oxidative stress and immunosuppression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.). *Fish and Shellfish Immunology*, 32(6), 994-1001. doi: 10.1016/j.fsi.2012.02.012.
- Yöntürk, Y. (2017). *Gökkuşığı alabalığı (Oncorhynchus mykiss, W.)'nda arı polenin antioksidan ve immunostimulan etkisinin araştırılması* [Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi].