

Farklı Su Sıcaklıklarında Tutulmuş Pullu Sazan (*Cyprinus carpio carpio* Linnaeus, 1758)'nın Karaciğer ve Böbreğindeki Bazı Antioksidan Parametreler Üzerine Propolisin Etkisi

Serpil MİŞE YONAR^{*1}, M. Enis YONAR¹, Naim SAĞLAM¹, Sibel SİLİCİ²

¹Fırat Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, 23119, Elazığ.

²Erciyes Üniversitesi, Seyrani Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji ABD, Kayseri.

e-posta: serpilmise@gmail.com

Geliş Tarihi: 29.01.2012 Kabul Tarihi: 03.12.2012

Özet: Bu çalışmada; farklı su sıcaklıkları uygulanmış pullu sazan (*Cyprinus carpio carpio*)'da malaondialdehit (MDA) ve glutasyon (GSH) düzeyi ile glutasyon-S-transferaz (GST) enzim aktivitesine propolisin etkisi araştırıldı. Balıklar 20, 24 ve 28 °C'de tutuldu ve propolis (10 mg kg⁻¹ yem) bu balıklara uygulandı. 24 °C'de tutulan balıklar kontrol grubu olarak seçildi. Uygulama 10 gün devam etti ve bu sürenin sonunda balıklardan karaciğer ve böbrek örnekleri alındı. 20 °C ve 28 °C'deki balıkların MDA düzeyinin önemli oranda arttığı, GSH düzeyi ile GST aktivitesinin düştüğü tespit edildi (P < 0.05). Bu gruplarda propolis uygulamasıyla MDA düzeyinin istatistiksel olarak önemli düzeyde düştüğü (P < 0.05), GSH düzeyi ile GST aktivitesinin önemli oranda yükseldiği belirlendi (P < 0.05).

Anahtar Kelimeler: Balık, propolis, oksidatif stres, antioksidan sistem, sıcaklık

The Effect of Propolis on Some Antioxidant Parameters in Liver and Kidney of Scaly Carp (*Cyprinus carpio carpio* Linnaeus, 1758) Raised at Different Water Temperatures

Abstract: In this study, it was investigated the effect of propolis on malaondialdehit (MDA) and glutathione (GSH) levels and glutathione-S-transferase (GST) activity in scaly carp (*Cyprinus carpio carpio*) applied different water temperatures. The fish were maintained at 20, 24 and 28 ° C and propolis (10 mg propolis/kg diet) was administered to these fish. The fish maintained at 24 ° C were selected as control group. Treatment was continued for 10 days, and at the end of this period, liver and kidney samples were obtained from fish. The MDA level of fish at 20 and 28 ° C was significantly increased, while the GSH level and GST activity were significantly decreased (p<0.05). The GST activity and the GSH level were significantly increased with propolis administration in these groups, while the MDA level was significantly decreased (p<0.05).

Keywords: Fish, propolis, oxidative stress, antioxidant system, temperature.

Giriş

Balık yetiştiriciliği, dünyada hızla gelişen ve önem kazanan bir endüstri kolu haline gelmiştir. Ancak dışarıdan alınan pestisitler, ağır metaller, sıcaklık değişimleri, diyet tipleri, oksijen miktarı, parazitler ve farklı çevresel nedenler balıkta serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif stresin artmasına dolayısıyla da ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Su sıcaklığı balıkların yaşamını, büyümesini, beslenmesini ve diğer birçok fizyolojik fonksiyonlarını etkileyen en önemli faktörlerden biridir (Lou ve ark., 2011). Yüksek sıcaklık (Parihar ve Dubey 1995; Heise ve ark., 2006; Luschchak ve Bagnyukova 2007) ve düşük sıcaklık (Malek ve ark., 2004; Martinez-Alvarez ve ark., 2005) balıklarda oksidatif strese yol açmaktadır. Yüksek sıcaklık oksijen tüketimini artırmakta buda balıklarda oksidatif strese neden olmaktadır. Diğer taraftan düşük sıcaklık antioksidan sistemi

zayıflatarak veya radikal oluşumuna yol açarak oksidatif stresi indüklemektedir (Lushchak, 2011). Diğer yüksek omurgalı canlılarda olduğu gibi balıklarda da lipid peroksidasyonun bir ürünü olan MDA, doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşur ve hücrenel bileşenlerde meydana gelen oksidatif stresin en önemli göstergelerinden biridir (Morales ve ark., 2004). Bütün aerobik organizmalar gibi balıklarda da oksidatif stresi ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri olarak bilinirler ve enzimatik karakterdeki süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutasyon peroksidaz (GSH-Px), glutasyon-S-transferaz (GST) ile enzimatik olmayan redükte glutasyon (GSH), A, E ve C vitaminleri gibi maddelerden oluşurlar (Dautremepuits ve ark., 2003; Trenzado ve ark., 2006).

Propolis; yapışkan, kendine özgü kokusu olan açık kahverengiden siyaha kadar rengi değişebilen,

arınların kendilerini soğuktan ve hastalıklardan korumak için yaprak, tomurcuk, dal ve ağaç kabuklarından topladığı reçinemi maddedir. Propolis antimikrobiyal, antibakteriyel, antikanserijen, antifungal, antiviral, antitümör, antiparaziter, antiprotozoan, antiinflamatuvar, anestetik, antioksidan, antiseptik özelliklere sahip immünostimulan yapıda bir maddedir (Yonar ve ark., 2012).

Bu çalışmada farklı su sıcaklıkları uygulanan pullu sazanın karaciğer ve böbrek dokusundaki MDA ve GSH düzeyi ile GST aktivitesine propolisin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Balık

Bu çalışmada, Keban IX. Bölge Keban Barajı Su Ürünleri Şube Müdürlüğü'nden temin edilen ve ortalama ağırlığı $52,13 \pm 5,21$ g olan balıklar kullanıldı. Balıklar $33 \times 100 \times 60$ cm ebatlarında ve su sıcaklığı ayarlanabilir ısıtıcılarla $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış 6 farklı cam akvaryuma yerleştirildi. Çalışma 3 tekrarlı olarak yürütüldü (her bir tekrar için 30, toplamda 90 balık).

Propolisin etanolik ekstraktının hazırlanması ve kimyasal analizi

Çalışmada kavak tipi Türk propolisi kullanıldı. Propolisin saflaştırılması ve kimyasal analizi Silici ve Kutluca (2005)'nin bildirdiği metoda göre yapıldı.

Yemlerin hazırlanması ve deneysel plan

Çalışmada kullanılan propolis 10 mg/kg yem olacak şekilde tartıldı ve daha sonra özel bir firmadan alınan ve toz haline getirilen yemle homojen olarak karıştırılarak 10 gün boyunca günde iki kez balıkların vücut ağırlıklarının % 2' si oranında oral yolla balıklara uygulandı.

Balıkların yerleştirildiği akvaryumlardan 2' sinin sıcaklığı $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye düşürülürken, diğer ikisinin ise $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye yükseltildi. Böylece $20, 24$ ve $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ su sıcaklığına sahip aşağıdaki gruplara propolis uygulandı. Sazanlar için optimum su sıcaklığı $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ olduğu için (Çelikkale, 1994) bu sıcaklıktaki balıklar kontrol grubu olarak seçildi.

Grup 1: $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta tutulan ve propolis uygulanmayan balıklar,

Grup 2: $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta tutulan ve propolis uygulanmayan balıklar (**Kontrol grubu**),

Grup 3: $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta tutulan ve propolis uygulanmayan balıklar,

Grup 4: $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta tutulan ve 10 mg/kg yem oranında propolis verilen balıklar,

Grup 5: $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta tutulan ve 10 mg/kg yem oranında propolis verilen balıklar,

Grup 6: $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta tutulan ve 10 mg/kg yem oranında propolis verilen balıklar.

Çalışmanın 3. ve 7. günlerinde akvaryum sularının 1/3' ü sifonlama yapılarak değiştirildi. Eksilen sular daha önceden sıcaklıkları $20, 24$ ve $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış sularla tamamlandı.

Doku Örneklerinin Hazırlanması ve Biyokimyasal Analizler

Deneme sonunda benzokain ile bayıltılan balıklardan karaciğer ve böbrek örnekleri alındı. Homojenatların hazırlanması için örnekler serum fizyolojik (% 0,09 NaCl) ile yıkandı. İki süzgeç kağıdı arasında suyu alındıktan sonra %1.15'lik KCl içinde 1:10 oranında sulandırılarak homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar 50 ml'lik propilen tüplerde soğutmalı santrifüjde 3200 rpm 'de $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alındı. Alınan örneklerin MDA düzeylerinde meydana gelen değişimler Placer ve ark. (1966)'den modifiye edilen yöntemle göre spektrofotometrik olarak ölçüldü. Dokulardaki GST aktivitesi Habig (1974)'e göre tayin edildi. GSH düzeyi Elman (1959) tarafından bildirilen metotla saptandı. Protein tayini ise Lowry (1951)'nin bildirdiği metoda göre belirlendi.

İstatistiksel analiz

Denemede elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri SPSS 12 paket istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol ve deneme grubu balıklarının incelenen parametrelerinde meydana gelen değişimler $p < 0.05$ düzeyinde tek yönlü varyans analizi (ONEWAY-ANOVA) ile test edildi.

Sonuçlar

Çalışmada kullanılan propolisin kimyasal analizinde fenolik bileşikler, organik ve yağ asitlerini, alkol, keton ve terpenleri, hidrokarbon ve diğer bazı bileşikler çeşitli oranlarda içerdiği tespit edildi (Tablo 1).

Tablo 1. Araştırmada kullanılan propolisin gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) kimyasal analizi.

R.T.	Bileşikler	% TIC
Fenolik Bileşikler		
27.93	4,5 dimethoxy-(2-propenyl) 2-phenol	1.25
31.06	Pinocembrin	14.75
32.50	5-methoxy-3,7-dihydroxyflavanone	1.57
32.72	5-hydroxy-7-methoxy flavone (tecto-chrysin)	5.27
33.30	7-dihydroxy-3- methoxyisoflavone	1.34
34.12	Chrysin	7.67
34.84	Galangin	4.90
35.24	4,5-dihydroxy-7-methoxyflavanone	1.08
Organik ve yağ asitleri		
9.03	Decanoic acid	0.23
13.31	4-pentenoic acid	1.74
20.30	Cinnamic acid	0.29
20.73	3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid	1.82
16.74	2-propenoic acid	2.70
20.91	3,4-dimethoxycinnamic acid	3.40
21.78	n-hexadecanoic acid	0.41
22.93	Coumaric acid	0.19
24.71	m-hydroxycinnamic acid	0.88
25.12	9-Octadecanoic acid	2.05
25.49	Octadecanoic acid	0.21
29.16	1,3-benzenedicarboxylic acid	4.62
Alkoller, ketonlar ve terpenler		
13.55	Nerolidol	0.39
8.02	2-propen-1-ol	0.21
14.28	Benzenemethanol	0.15
33.91	Chrysophanol	7.49
34.38	5-3,3-dimethyl-cyclohexanone	1.36
8.18	Ethanone	0.21
8.50	3-methoxy acetophenone	0.23
10.85	4H-pyrazolopyrimidin-4-one	7.03
22.37	Oxacyclododeca-6,9-dien-2-one	0.27
24.49	2-Nonadecanone	0.66
15.22	Gamma-eudesmol	0.37
15.66	Beta-eudesmol	0.38
15.71	Alpha-eudesmol	0.59
16.26	Alpha-bisabolol	0.17
22.45	1-Pentanone	0.47
29.72	2-propen-1-one	15.30
28.78	2,3-diphenylcyclopetanone	0.52
Hidrokarbonlar ve diğer bileşikler		
6.21	Benzofuran	0.73
24.03	6,8 tetradecadiene	0.28
16.81	1-buta-1,3-diene	1.34
27.35	3,6 dimethoxy-2-ethylbenzaldehyde	0.60
27.81	4-pyrimidinamine	0.49
34.68	Heptane-2-propanoate	0.93
36.57	3-cyano-5,6-dimethoxy-2-methylthio-1-indole-1-phenylindole	0.52

RT: Retention time (hafıza zamanı), **TIC:** Total ion current (toplam iyon akışı)

Balıklardan çalışma sonunda alınan karaciğer ve böbrek dokusunda MDA ve GSH düzeyleri ile GST enzim aktivitesinde istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulundu ($p < 0.05$). Kontrol ve deneme

grubu balıklarının MDA düzeyindeki değişimler Tablo 1' de, GSH düzeyindeki değişimler Tablo 2'de ve GST enzim aktivitesindeki değişimler ise Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Kontrol ve deneme grubu balıklarının dokularındaki MDA düzeyi (Ortalama \pm standart sapma, nmol/ g protein)

Gruplar	Karaciğer	Böbrek
20 °C	4.37 \pm 0.88 ^d	3.67 \pm 0.76 ^b
24 °C (Kontrol)	1.69 \pm 0.47 ^a	1.54 \pm 0.38 ^a
28 °C	3.63 \pm 1.10 ^c	4.71 \pm 1.13 ^c
20 °C + Propolis	2.65 \pm 0.72 ^b	1.78 \pm 0.71 ^a
24 °C + Propolis	1.82 \pm 0.59 ^a	1.70 \pm 0.68 ^a
28 °C + Propolis	2.50 \pm 0.66 ^b	1.86 \pm 0.73 ^a

^{a,b,c,d} Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0.05$).

Tablo 3. Kontrol ve deneme grubu balıklarının dokularındaki GSH düzeyi (Ortalama \pm standart sapma, μ mol/g protein).

Gruplar	Karaciğer	Böbrek
20 °C	24.47 \pm 3.76 ^b	26.67 \pm 5.20 ^a
24 °C (Kontrol)	32.71 \pm 6.47 ^a	41.13 \pm 6.72 ^d
28 °C	21.37 \pm 5.10 ^c	30.22 \pm 4.01 ^b
20 °C + Propolis	30.56 \pm 6.03 ^a	39.31 \pm 8.23 ^c
24 °C + Propolis	32.13 \pm 7.12 ^a	42.81 \pm 7.59 ^d
28 °C + Propolis	31.47 \pm 4.71 ^a	38.59 \pm 6.42 ^c

^{a,b,c,d} Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0.05$).

Tablo 4. Kontrol ve deneme grubu balıklarının dokularındaki GST aktivitesi (Ortalama \pm standart sapma, μ mol/dakika/mg protein).

Gruplar	Karaciğer	Böbrek
20 °C	13.19 \pm 3.12 ^b	12.13 \pm 2.97 ^a
24 °C (Kontrol)	18.23 \pm 2.96 ^a	20.17 \pm 4.59 ^d
28 °C	10.12 \pm 3.22 ^c	15.34 \pm 3.72 ^b
20 °C + Propolis	17.24 \pm 4.37 ^a	20.98 \pm 5.32 ^d
24 °C + Propolis	16.21 \pm 4.86 ^a	19.63 \pm 4.46 ^d
28 °C + Propolis	18.38 \pm 5.11 ^a	16.48 \pm 3.91 ^c

^{a,b,c,d} Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0.05$).

Kontrol (24 °C) grubuna göre 20 °C ve 28 °C' lik sıcaklıkların uygulandığı balıklarda karaciğer ve böbrek dokusundaki MDA düzeyinin önemli düzeyde arttığı, GSH düzeyi ile GST aktivitesinin düştüğü tespit edildi ($p < 0.05$). Ancak yemle propolis uygulanan bu gruplarda MDA düzeyinin istatistiksel olarak önemli düzeyde düştüğü, GSH düzeyi ile GST enzim aktivitesinin önemli oranda yükseldiği belirlendi ($p < 0.05$).

Tartışma

Doğal olarak elde edilen ve yan etkisi bulunmayan propolisin kimyasal yapısı botanik orjinine göre değişebilmektedir. Ülkemizde propolisin tiplendirme ve standardizasyon çalışmaları son yıllarda hız kazanmış kestane, kavak ve okaliptus propolislerinin kimyasal yapısı aydınlatılmıştır (Silici ve Kutluca 2005; Katırcıoğlu ve Mercan 2006; Silici ve ark., 2007). Bununla birlikte farklı kıtalarda ve tropik bölgelerdeki propolislerin botanik kaynağı ve buna bağlı olarak kimyasal yapısı oldukça değişken olabilmektedir (Bankova ve ark., 2000; Christov ve ark., 2005). Bu çalışmada kullanılan propolisin kavak tipi özellik

gösterdiği tespit edilmiş, kimyasal içeriği daha önce kavak propolisinin kimyasal analizinin yapıldığı çalışmalarla benzerlik göstermiştir. Nitekim, fenolik bileşikler, organik ve yağ asitleri, alkol, keton ve terpenler, hidrokarbon ve diğer bazı bileşikler propoliste tespit edilen bileşik gruplarıdır. Bu çalışma sonuçları MDA ve GSH düzeyiyle GST aktivitesindeki değişiklikler dikkate alındığında balıkların özellikle optimum aralıklar dışındaki çevresel sıcaklığa oldukça duyarlı olduğunu göstermiştir. Optimum sıcaklık dışındaki değerlerin balıklarda oksidatif stresi arttırması sıcaklığın hücre fonksiyonları etkilediğini göstermektedir (Vinagre ve ark., 2012).

Oksidatif stres, oksidan ve antioksidan denge arasındaki değişiklikler sonucunda meydana gelmekte ve reaktif oksijen türleri lehindeki artışlar oksidatif hasar olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller yüksek aktivitelelerinden dolayı hücre zarında bulunan doymamış yağ asitleri ile etkileşerek lipit peroksidasyonu başlatabilmektedir. Oluşan lipit peroksitler kolaylıkla yıkılarak başta MDA olmak üzere birçok sekonder ürün meydana getirebilmektedir (Bird and Draper, 1984;

Jain, 1988; Bandyopadhyay ve ark., 1999). Bu çalışmada kontrol grubuna (24 °C) göre, düşük (20 °C) ve yüksek (28 °C) sıcaklıkların uygulandığı balıkların karaciğer ve böbrek dokusunda MDA düzeyinin önemli oranda arttığı tespit edilmiştir. Bu sonuç, düşük ve yüksek sıcaklıklara bırakılan levreklerde (*Dicentrarchus labrax*) oksidatif stresin arttığını belirleyen Vinagre ve ark., (2012)' in sonuçlarıyla paralel bulunmuştur.

GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan, endojen ve enzimatik olmayan, çok önemli tripeptit karakterinde bir antioksidandır. Ayrıca protein yapısındaki sülfhidril gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu engellemektedir (Hayes and McLellan 1999). GST, GSH ile elektrofilik gruplar taşıyan bileşikler arasındaki konjugasyonu katalizleyen, birçok farklı ksenobiyotik ve endojen bileşiklerin detoksifikasyonu ve biyotransformasyonunda rol oynayan, çok fonksiyonlu faz II enzim ailesinin üyeleridir (Hamed ve ark., 2003). Bu çalışmada düşük ve yüksek sıcaklıklarda tutulan balıkların karaciğer ve böbreğindeki GSH düzeyi ve GST aktivitesi kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Lou ve ark. (2011), *Paralichthys olivaceus* türü balıkların karaciğerindeki süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktivitelerinin denemenin 13. ve 19. günlerinde kontrol grubuna (25 °C) göre 28, 30 ve 32°C' deki gruplarda düştüğünü saptamıştır. Hwang ve Lin (2002) tarafından yapılan bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş, 25 °C' ye (kontrol grubu) kıyasla 35 °C' de tutulan sazanlarda hepatopankreas ve kas dokusundaki GSH düzeyinin azaldığı belirlenmiştir. Antioksidan parametrelerdeki bu azalmanın nedeni sıcaklık farklılıklarının neden olduğu antioksidanların denaturasyonu veya protein sentezindeki bozulmalar olabilir (Heise ve ark., 2006; An ve Choi, 2009).

Bu araştırma sonuçlarına göre sıcaklık farklılıklarının neden olduğu oksidan/antioksidan dengedeki bozukluklar oral yolla propolis uygulamasıyla ortadan kaldırılmıştır. Bu bağlamda propolisin antioksidan kapasiteyi artırarak veya oluşan radikalleri inhibe ederek sıcaklık değişimlerine karşı balığın direncini arttırabileceği ve oksidatif stresi engelleyebileceği, özellikle yetiştiricilik yapılan yerlerdeki sıcaklık farklılıklarından kaynaklanan strese karşı propolisin antioksidan olarak kullanılabilirliği söylenebilir.

Kaynaklar

An, M.I., Choi, C.Y. 2010. Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: Effects on

hemolymph and biochemical parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 155 (1): 34-42.

- Bandyopadhyay, U., Das, D. and Banerjee, R.K. 1999. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Current Science*, 77: 658-666.
- Bankova, V.S., Castro, De L.S., Marcucci, M.C. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31: 3-15.
- Bird, R.P., Draper, H.H., 1984. Comparative studies of different methods of malondialdehyde determination. *Methods in Enzymology*, 105: 299-305.
- Christov, R., Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., Brandi, M. 2005. Chemical composition of propolis from Canada. its antiradical activity and plant origin. *Natural Product Research*, 19(7): 673-678.
- Çelikkale M.S. 1994. İçsu Balıkları ve Yetiştiriciliği (Cilt II). Karadeniz Teknik Üniversitesi Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Yayınları, Trabzon, Türkiye, 426 pp.
- Dautremepuits, C., Betoulle, S., Vernet, G. 2003. Stimulation of antioxidant enzymes levels in carp (*Cyprinus carpio* L.) infected by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Fish and Shellfish Immunology*, 15 (5): 467-471.
- Ellman, G.L. 1959. Tissue sulphhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82 (1): 70-77.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249: 7130-7139.
- Hamed, R.R., Farid, N.M., Elowa, S.H.F., Abdalla, A.M. 2003. Glutathione related enzyme levels of freshwater fish as bioindicators of pollution. *The Environmentalist*, 23: 313-322.
- Hayes, J.D. and McLellan, L.I. 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*, 31: 273-300.
- Heise, K., Puntarulo, S., Nikinmaa, M., Abele, D., Pörtner, H.O., 2006. Oxidative stress during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus* L. *Journal of Experimental Biology*, 209: 353-363.
- Hwang, D.F., Lin, T.K. 2002. Effect of temperature on dietary vitamin C requirement and lipid in common carp. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 131 (1): 1-7.
- Jain, S.K. 1988. Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica*, 937: 205-210.
- Katircioğlu, H., Mercan, N. 2006. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different region. *African Journal of Biotechnology*, 5(11): 1151-1153.

- Lou, B., Xu, D., Xu, H., Zhan, W., Mao, G., Shi, H., 2011. Effect of high water temperature on growth, survival and antioxidant enzyme activities in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. African Journal of Agricultural Research, 6(12): 2875-2882.
- Lowry, O.H., Rosenberough, N.J., Farr, A.L., Randal, R.J. 1951. Protein measurement with folinphenol reagent. Journal of Biochemistry, 193: 265-275.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquatic Toxicology, 101 (1): 13-30.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., 2007. Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Perccottus glenii*. Comparative Biochemistry and Physiology B, 148 (4): 390-397.
- Malek, R.L., Sajadi, H., Abraham, J., Grundy, M.A., Gerhard, G.S., 2004. The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. Comparative Biochemistry and Physiology C, 138 (3): 363-373.
- Martinez-Álvarez, R.M., Morales, A.E. and Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors, Fish Biology and Fisheries, 15: 75-88.
- 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.
- Parihar, M.S., Dubey, A.K., 1995. Lipid peroxidation and ascorbic acid status in respiratory organs of male and female freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to temperature increase. Comparative Biochemistry and Physiology C, 112 (3): 309-313.
- Placer, Z.A., Cushman, L. and Johnson, B.C. 1966. Estimation of products of lipid peroxidation (Malonyl dialdehyde) in biological fluids. Analytical Biochemistry, 16 (2): 359-364.
- Silici, S., Koç, A.N., Mıstık, S. 2007. Comparison of *in vitro* activities of antifungal drugs and propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. Annals of Microbiology, 57(2): 269-272.
- Silici, S., Kutluca, S. 2005. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. Journal of Ethnopharmacology, 99 (1): 69-73.
- Trenzado, C., Carmen H.M., Gallego, M.G., Morales, A.E., Furne, M., Domezain, A., Domezain, J., Sanz, A. 2006. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. Aquaculture, 254 (1-4): 758-767.
- Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Diniz, M., 2012. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. Ecological Indicators 23: 274-279.
- Yonar, M.E., Yonar, S.M., Ural, M.Ş., Silici, S., Düşükcan, M., 2012. Protective role of propolis in chlorpyrifos-induced changes in the haematological parameters and the oxidative/antioxidative status of *Cyprinus carpio carpio*. Food and Chemical Toxicology, 50 (8): 2703-2708.