

Makale Türü
Araştırma

Geliş Tarihi
17 Ekim 2023

Kabul Tarihi
14 Kasım 2023

Propolisle Beslenen Kerevitlerin Pleopodal Yumurtalarında Oksidatif Stresin Belirlenmesi

Serpil MİŞE YONAR¹


Özet: Propolis, arıların kendilerini soğuktan ve hastalıklardan korumak için ağaçların yaprak, tomurcuk, dal ve kabuklarından topladığı yapışkan, kendine özgü kokusu olan, açık kahverengiden siyaha kadar rengi değişebilen reçinemi karakterdeki maddedir. Antimikrobiyal, antibakteriyel, antikanserojen, antifungal, antiviral, antitümör, antiparaziter, antiprotozoan, antiinflamatuvar, anestetik, antioksidan, antiseptik gibi özelliklere sahip immünostimulan yapıda bir madde olan propolis son yıllarda oldukça fazla dikkat çekmektedir. Bu çalışmada, farklı oranlarda yeme katılan propolis uygulandığı kerevitlerden alınan pleopodal yumurtalarda malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeylerindeki değişimler araştırıldı. Bu amaçla % 0 (kontrol), % 0.5 (D1), % 1 (D2) ve % 2 (D3) oranlarında propolis içeren deneme yemleri oluşturuldu. 90 günlük besleme sonunda, kerevitlerden pleopodal yumurta örnekleri alındı. Alınan örneklerde MDA ve GSH düzeyleri araştırıldı. Propolis uygulanan grupların pleopodal yumurtalarında MDA düzeylerinin azaldığı belirlendi ($p < 0, 05$). Pleopodal yumurtalardaki GSH düzeylerinin ise arttığı ($p < 0,05$) gözlemlendi. Propolisin kerevit yumurtalarında oksidatif strese karşı koruyucu bir etki gösterdiği ve üreme döneminde stresi azaltabileceği söylenebilir.

Anahtar kelimeler: glutatyon, kerevit, malondialdehit, oksidatif stres, propolis

Determination of Oxidative Stress in Pleopodal Eggs of Propolis-Feeding Crayfish

Abstract: Propolis is a sticky, resinous substance that has a unique smell and can vary in color from light brown to black, collected by bees from the leaves, buds, branches and bark of trees to protect themselves from cold and diseases. Propolis, an immunostimulant substance with properties such as antimicrobial, antibacterial, anticarcinogenic, antifungal, antiviral, antitumor, antiparasitic, antiprotozoan, anti-inflammatory, anesthetic, antioxidant and antiseptic, has attracted a lot of attention in recent years. In this study, changes in malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels were investigated in pleopodal eggs taken from crayfish to which propolis was added to the feed at different rates. For this purpose, trial feeds containing 0% (control), 0.5% (D1), 1% (D2) and 2% (D3) propolis were created. At the end of 90 days of feeding, pleopodal egg samples were taken from crayfish. MDA and GSH levels were investigated in the samples taken. It was determined that MDA levels decreased in the pleopodal eggs of the propolis applied groups ($p < 0.05$). It was observed that GSH levels in pleopodal eggs increased ($p < 0.05$). It can be said that propolis has a protective effect against oxidative stress in crayfish eggs and can reduce stress during the reproductive period.

Key words: crayfish, glutathione, malondialdehyde, oxidative stress, propolis

¹Corresponding author, Fırat Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Elazığ/Türkiye, serpilmise@gmail.com,  0000-0003-2736-5731

GİRİŞ

Dünyanın birçok ülkesindeki tatlı su kaynaklarında yaşayan kerevitler kültürü yapılabilen kabuklu su ürünlerindedir. Afrika dışındaki hemen hemen bütün kıtalarda doğal olarak 500'ün üzerinde türü bulunan kerevitlerin en önemli cinsleri *Pontastacus*, *Pacifastacus*, *Procambarus*, *Orconectes*, *Austropotamobius* ve *Cherax*'tır. Doğal kerevit türümüz olan *Pontastacus leptodactylus* ülkemizde geniş bir dağılım göstermektedir (Harlıoğlu, 2008).

Protein içeriğinin yüksek olması ve yapısında önemli vitamin ve mineralleri bulundurması nedeniyle kerevit eti oldukça tercih edilen bir besin kaynağıdır. Bununla birlikte dünyanın pek çok bölgesinde lüks bir gıda maddesi olarak tercih edilen kerevitlerin ekonomik değeri gün geçtikçe artmaktadır. Ancak bilinçsiz avlanma, sulardaki kirlenme ve hastalık gibi faktörler nedeniyle bazı kerevit popülasyonlarında azalmalar olmuştur. Bu sebeple, kerevitlerin popülasyonlarının desteklenmesi bağlamında pleopodal yumurta oldukça önem arz etmektedir (Mişe Yonar, 2012).

Önemli biyolojik aktivitelerinden dolayı son yıllarda araştırmacıların dikkatini çeken propolis, bal arılarının kendi kovanlarını koruk için ürettiği yapışkan, reçinemi bir üründür. Propolis çeşitli miktarlarda polifenoller (fenolik asitler ve esterleri, flavonoidler ve fenolik aldehytler), ketonlar ve alkoller, terpenler, steroidler, inorganik bileşikler ve amino asitler içermektedir (Bankova vd., 2000). Antifungal ve antibakteriyel aktiviteleri en çok araştırılmakla birlikte (Kujungiev vd., 1999), antiinflamatuvar (Wang vd, 1993), antiviral, antikanser, antibiyotik, immünostimülan ve antioksidan gibi farmakolojik aktiviteleri belirlenmiş ve propolisin etanolik ekstraktlarıyla ilişkilendirilmiştir (Yonar vd., 2011; Mişe Yonar vd., 2014; Mişe Yonar vd., 2017).

Bu çalışmada, propolisin yemle uygulandığı kerevitlerden alınan pleopodal yumurtalarda malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeylerindeki değişimler araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Kerevit örnekleri (Şekil 1), Elazığ ili Keban Baraj Gölü Ağın bölgesindeki kerevit avcılığı yapan kişilerden temin edildi. Kerevitler, ortalama ağırlığı 30 ± 1 g ve uzunluğu $11 \pm 0,5$ cm olan dişi ve erkekler arasından seçildi. Kerevit örnekleri Fırat Üniversitesi Cip Balık Üretim Tesisine getirilerek $7 \times 4 \times 0,5$ m ve $16 \times 4 \times 1$ m ebatlarındaki beton stok havuzlara yerleştirildi. Havuzların kerevitler için uygun bir ortam oluşturması amacıyla havuz zeminine 20 cm uzunluğunda ve 7 cm çapında yeterli sayıda barınak (plastik borular) yerleştirildi. Havuzlara 1 m^2 yüzey alanı için dakikada 1,5 litre su akışı sağlandı. Adaptasyonları sağlanan kerevitlere bu dönemde kontrol yemi verildi.

Çalışma başlatılmadan hemen önce stok havuzlarından alınan kerevitler $2 \times 2 \times 0,5$ m ebatlarındaki deneme havuzlarına alındı (Şekil 2). Çalışma üç tekrarlı yürütüldü ve toplamda 12 havuz kullanıldı. Stoklama yoğunluğu 15 birey / m^2 (4 dişi: 1 erkek) olarak ayarlandı. 48 adet dişi ve 12 adet erkek kerevit olmak üzere her bir tekrar için 60 örnek kullanıldı.

Çalışmada, Yonar vd. (2011) tarafından özellikleri bildirilen ve identifiye edilen kavak tipi Türk propolisi kullanıldı.



Şekil 1. Araştırmada kullanılan kerevit örneği.



Şekil 2. Kerevitlerin bırakıldığı havuzlar.

Denemeye başlamadan önce toplam enerji düzeyi 3326 kcal/kg, ham protein oranı % 42,85 olan ve propolis içermeyen bir kontrol (K) yemi hazırlandı (Tablo 1). Bu yeme % 0,5 (D1), % 1 (D2) ve % 2 (D3) oranlarında propolis ilave edilerek deneysel yemler oluşturuldu. Bunun için Mişe Yonar (2012), tarafından belirtilen yöntem kullanıldı. Yemler kullanılıncaya kadar 4 °C' de plastik muhafaza kapları içerisinde saklandı.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan yem öğelerinin ham besin madde (kuru maddenin %'si olarak) ve toplam enerji düzeyleri (kcal/kg).

Ham besin maddeleri (%) ve toplam enerji (kcal/kg)	Balık unu	Soya Fasulyesi Küspesi	Buğday unu	Mısır glütteni
Protein	64,3	44,0	12,90	60,4
Yağ	7,6	1,1	1,70	1,8
Selüloz	1,0	7,3	2,50	1,5
Kül	14,3	6,3	1,65	2,1
Nem	8	10	12	9

Ekim ayının başında beslenmeye başlanan kerevitlere günlük olarak doyuncaya kadar 90 gün süreyle hazırlanan yemler verildi. 90 günlük deneme sonunda kerevitlerden pleopodal yumurtalar bir pens yardımıyla toplandı (Şekil 3).

Her bir kerevitten alınan tüm yumurtalar bir örnek olarak kabul edildi. Yumurtalar % 1.15'lik potasyum klorür (KCl) ile 1:10 oranında sulandırıldı ve homojenize edildi. 50 ml'lik propilen tüplere bırakılan homojenatlar 3200 rpm'de +4 °C' de soğutmalı santrifüjde 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar alındı. Elde edilen süpernatantlarda malondialdehit (MDA) (Placer vd., 1966) ve redükte glutatyon (GSH) (Ellman, 1951) düzeyleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Doku protein düzeyleri Lowry vd. (1951)' nin bildirdiği yöntemle belirlendi ve MDA ve GSH düzeylerini hesaplamak için kullanıldı.



Şekil 3. Pleopodal yumurtalar.

Sonuçların istatistiksel analizleri SPSS 22.0 istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol ve deneysel grupların incelenen parametrelerinde oluşan değişimlerin belirlenmesi için tek yönlü varyans analizi (ONEWAY – ANOVA) kullanıldı. Gruplar arasındaki farklılıklar ise Least Significant Difference (LSD) test edildi. Sonuçlar ortalama \pm standart hata olarak gösterildi.

BULGULAR

Kontrol ve deneme gruplarının pleopodal yumurtalarında belirlenen MDA ve GSH düzeyleri Tablo 2' de sunulmuştur. Kontrol grubuna göre propolis uygulanan tüm deneme gruplarında pleopodal yumurtaların MDA düzeylerinin azaldığı belirlendi ($p < 0,05$). Yemdeki propolisin artan düzeyine bağlı olarak MDA düzeylerindeki azalmanın daha yüksek olduğu görüldü ($p < 0,05$). Sadece propolis uygulanan gruplar kendi içinde incelendiğinde en düşük MDA düzeyi D3 grubunda belirlendi. D1, D2 ve D3 gruplarının MDA düzeylerinin istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu saptandı ($p < 0,05$).

Tablo 2. Kontrol ve deneme gruplarının pleopodal yumurtalarında MDA ve GSH düzeyleri.

Gruplar	MDA (nmol/g protein)	GSH (μ mol/g protein)
K	1,94 \pm 0,14 ^d	3,76 \pm 0,41 ^a
D1	1,81 \pm 0,22 ^c	3,98 \pm 0,55 ^b
D2	1,67 \pm 0,17 ^b	4,24 \pm 0,76 ^c
D3	1,55 \pm 0,20 ^a	4,47 \pm 0,68 ^d

K: Kontrol, D1; % 0.5 oranında propolis ilave edilmiş yem verilen grup; D2: % 1 oranında propolis ilave edilmiş yem verilen grup; D3; % 2 oranında propolis ilave edilmiş yem verilen grup.

^{a,b,c,d}: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($p < 0,05$).

Kontrol grubuna göre propolis uygulanan tüm deneme gruplarında pleopodal yumurtaların GSH düzeylerinin arttığı belirlendi ($p < 0,05$). Yemdeki propolisin artan düzeyine bağlı olarak GSH düzeylerindeki artışın daha yüksek olduğu görüldü ($p < 0,05$). Sadece propolis uygulanan gruplar kendi içinde incelendiğinde en yüksek GSH düzeyi D3 grubunda belirlendi. D1, D2 ve D3 gruplarının GSH düzeylerinin istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu saptandı ($p < 0,05$).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Karbonhidrat, protein, lipit ve nükleik asitlerin yıkımına sebep olan serbest radikaller oksijenden tek elektronun indirgenmesiyle oluşurlar. Bununla birlikte reaktif oksijen türleri olarak da bilinen serbest radikaller DNA' ya zarar verdikleri gibi enzimlerin aktivasyonunu ve hücrelerde membran geçirgenliğini değiştirerek bozarlar. Serbest radikallerin etkisiyle doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı sonucu oluşan, bir başka ifadeyle lipid peroksidasyon sonucu açığa çıkan aldehitlerden biri olan MDA' nın düzeyinin ölçülmesi hücrelerde oluşan oksidatif zararın belirlenmesinde kullanılan en önemli göstergelerden biridir (Morales vd., 2004; Fontagné vd., 2006). Mişe Yonar vd. (2017), tarafından kerevitler üzerine yapılan bir çalışmada %1, 2 ve 4 oranında yeme ilave edilen propolisin hepatopankreas ve ovaryumlardaki MDA düzeylerinde önemli bir azalmaya yol açtığı bulunmuştur. Benzer şekilde bu çalışmada da diyetle propolis uygulanan deneme gruplarının pleopodal yumurtalarındaki MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığı, yine artan propolis düzeyiyle paralel olarak MDA düzeylerinin deneme gruplarında düştüğü belirlenmiştir. Bu durum propolisin kerevitin yumurtlaması sırasında ve yumurtayı taşıdığı dönemde oluşan serbest radikallerin birikimini azaltma yeteneğiyle açıklanabilir. Propolisin bu etkisi, propolis ekstraktındaki fenolik bileşiklerin antioksidan özellikleriyle ilişkili olabilir (Mişe Yonar vd., 2017). İsla vd. (2005) propolisin biyolojik aktivitesinden özellikle fenolik bileşiklerin sorumlu olduğunu bildirmiştir. Marquele vd. (2005), Christov vd. (2006) ve Mani vd. (2006) ayrıca fenolik bir bileşik olan

flavonoidlerin, öncelikle radikal temizleme yeteneklerinden dolayı antioksidan aktiviteden sorumlu olduğunu belirtmiştir.

Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif stresten koruyan tripeptit karakterdeki GSH, çok önemli bir antioksidan olup non-enzimatik ve endojen özelliindedir. Protein yapısındaki sülfhidril gruplarını indirgenmiş halde tutan GSH böylece çoğu protein ve enzimin inaktive olmasını önler (Hayes ve McLellan, 1999). Bu çalışmada propolis verilen deneme gruplarının pleopodal yumurtalarındaki GSH düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli artışlar göstermiştir. Harlıoğlu vd. (2012) % 1, 2 ve 4 oranında kerevit yemine ilave n-3 serisi doymamış yağ asitlerinin pleopodal yumurtalardaki GSH düzeylerini arttırdığını ifade etmişlerdir. Araştırmacının bulgularıyla bu çalışmadan elde edilen sonuçlar arasındaki benzerlik propolisin yapısında bulunan yağ asitlerinden kaynaklanıyor olabilir.

Sonuç olarak, yapılan bu çalışmada yeme ilave edilen propolisin kerevitlerde MDA düzeyini düşürdüğü, öte yandan GSH düzeyini arttırdığı belirlenmiştir. Propolisin kerevit yumurtalarında oksidatif strese karşı koruyucu bir etki gösterdiği ve kerevitlerde üreme verimliliğinin artırılmasında bir etkisinin olabileceği görülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma III. Uluslararası Battalgazi Bilimsel Çalışmalar Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

KAYNAKLAR

- Bankova, V.S., Castro, De L.S., & Marcucci, M.C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31, 3-15.
- Christov, R., Trusheva, B., Popova, M., Bankova, V., & Bertrand, M. (2006). Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Nat Prod Res.*, 20, 531-536.
- Ellman, G.L. (1959). Tissue sulphhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70-77.
- 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.
- Harlıoğlu, M.M. (2008). The harvest of the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus* Eschscholtz in Turkey: harvest history, impact of crayfish plague, and present distribution of harvested populations. *Aquaculture International*, 16, 351-360.
- Harlıoğlu, M.M., Köprücü, K., Yılmaz, Ö., Çakmak, M.N., Aksu, Ö., Harlıoğlu, A.G. ... Özcan, S. (2012). Kerevit yemine katılan n-3 serisi yağ asitlerinin pleopodal yumurta, hepatopankreas ve kas dokusunda lipid peroksidasyon ve glutatyon düzeylerine etkisi. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 2(5), 8-16.
- Hayes, J.D., & McLellan, L.I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*, 31, 273-300.
- Isla, M.I., Paredes-Guzman, J.F., Nieva-Moreno, M.I., Koo, H., & Park, Y.K. 2005. Some chemical composition and biological activity of northern Argentine propolis. *J. Agric. Food. Chem.*, 53, 1166-1172.

- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., & Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*, 64, 235-240.
- Lowry, O.H., Rosenberough, N.J., Farr, A.L., & Randal, R.J. (1951). Protein measurement with folinphenol reagent. *J Biochem.*, 193, 265-275.
- Mani, F., Damasceno, H.C., Novelli, E.L., Martins, E.A., & Sforcin, J.M. (2006). Propolis: effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *J. Ethnopharmacol.*, 105, 95-98.
- Marquele, F.D., Di Mambro, V.M., Georgetti, S.R., Casagrande, R., Valim, Y.M., & Fonseca, M.J. (2005). Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 39, 455-462.
- Mişe Yonar, S. (2012). Kerevitin rasyonlarına ilave edilen selenyumun pleopodal yumurta ve birinci devre yavru sayısı ile oksidatif stres ve bazı antioksidan enzimler üzerine etkilerinin araştırılması. (Doktora Tezi) Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Mişe Yonar, S., Köprücü, K., Yonar, M.E., & Silici, S. (2017). Effects of dietary propolis on the number and size of pleopodal egg, oxidative stress and antioxidant status of freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz). *Animal Reproduction Science*, 184, 149-159.
- Mişe Yonar, S., Ural, M.S., Silici, S., & Yonar, M.E. (2014). Malathion-induced changes in the haematological profile, the immune response, and the oxidative/antioxidant status of *Cyprinus carpio carpio*: protective role of propolis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 102, 202-209.
- Morales, A.E., Pèrez-Jimènez, 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.
- Placer, Z.A., Cushman, L., & Johnson, B.C. (1966). Estimation of products of lipid peroxidation (Malonyldialdehyde) in biological fluids. *Anal. Biochem.* 16, 359-364.
- Wang, L., Mineshita, S., Ga, L. (1993). Anti-inflammatory effects of propolis. *Jpn J Pharmacol Therapeut* 1993; 24, 223-226.
- Yonar, M.E., Mişe Yonar, S., & Silici, S. (2011). Protective effect of propolis against oxidative stress and immunosuppression induced by oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.). *Fish and Shellfish Immunology*, 31, 318-325.

How to cite this article/Bu makaleye atıf için:

Mişe Yonar, S. (2023). Propolisle beslenen kerevitlerin pleopodal yumurtalarında oksidatif stresin belirlenmesi. *DÜSTAD-Dünya Sağlık ve Tabiat Bilimleri Dergisi*, 6(2), 76-82. <https://doi.org/10.56728/dustad.1377353>