

## Tatlı Suya Adapte Edilmiş Levrek (*Dicentrarchus labrax*)'lerde Karaciğer Antioksidan Sistemler ve Lipid Peroksidasyonu\*

Aysel ŞAHAN

Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Balcalı, Adana - TÜRKİYE

Ergül KURUTAŞ

Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kahramanmaraş - TÜRKİYE

Suat DİKEL

Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Balcalı, Adana - TÜRKİYE

Received: 07.12.2001

**Özet:** Düşük tuzluluğa (‰ 0) adapte olmuş levrek (*Dicentrarchus labrax*)'lerde karaciğer dokusunun antioksidan sistemlerindeki farklılıklar ortaya konulmuştur. Ayrıca oksidan stresin spesifik indikatörü olan Malondialdehit (MDA) düzeyleri de ölçülmüş ve araştırmada adaptasyonu sağlamış grup (deney grubu) ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). Deney grubu balık karaciğerlerinde histopatolojik bir takım hasarların oluştuğu ve karaciğer ağırlıkları ile hepato/somatik indekste anlamlı artışların varlığı saptanmıştır. Adaptasyonun etkisiyle karaciğer Superoksit Dismutaz (SOD), Glutatyon Peroksidaz (GPX), Glukoz-6-Fosfat-Dehidrogenaz (G6PDH) ve Malondialdehit (MDA) aktivitesi deney grubunda artış gösterirken, Redükte Glutatyon (GSH) seviyesi kontrol grubuna göre azalma göstermiştir. Malondialdehit (MDA)'te izlenen artışlar lipid peroksidasyonundaki en önemli indikatör olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Adaptasyon, levrek (*Dicentrarchus labrax*), antioksidan sistemler, malondialdehit

### Liver Antioxidant Systems and Lipid Peroxidation in Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Adapted to Fresh Water

**Abstract:** Changes in the antioxidant systems of the liver tissues of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) adapted to low salinity levels (0 ‰) were investigated. Malondialdehyde levels, as a specific indicator of oxidant stress, were determined. The results indicated highly significant differences among the test and control groups ( $P < 0.05$ ). Some histopathological destruction, liver weight and hepatosomatic index values were determined at high levels and, moreover, superoxide dismutase, glutathione peroxidase (GPX), glucose-6-phosphate-dehydrogenase and malondialdehyde activities increased, while reduced glutathione levels decreased in comparison with the control group. An increase in the malondialdehyde level was determined to be an indicator of lipid peroxidation.

**Key Words:** Adaptation, sea bass (*Dicentrarchus labrax*), antioxidant systems, malondialdehyde

### Giriş

Deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*, L.) yumurtlamak amacıyla acı sulara, nehir ağızlarına gelen, osmoregülasyon yeteneği yüksek eurohalin bir türdür. Farklı tuzluluk düzeylerine tolerans gösteren levreklerde yapılan çeşitli çalışmalarda, levreklerin özellikle larval ve yavru dönemlerinde acı suları tercih ettikleri bildirilmiştir (1). Denizde yaşayan bir tür olan levreğin tatlı su alanlarında üremeyi kesmesi, gonad gelişimine harcayacakları enerjii büyüme harcamalarına ve

dolayısıyla tatlı sularda daha iyi büyüme göstermelerine neden olacaktır (2). Bu türün, yavru ve yetişkin dönemlerinde tatlı suya alıştırılması ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Maragos ve ark. (3), deneysel koşullarda yaptıkları adaptasyon çalışmasında 11-20 °C'de ve ‰ 11-20 tuzlulukta deniz levreği (*D. labrax*) yumurtalarının daha iyi açılabilceğini bildirmişlerdir. Bundan başka, düşük tuzlulukta (‰ 10,7-19,7) larval yaşama oranının ve hatta hava kesesi oluşumunun acı sularda daha iyi gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Marino ve

\* Bu Makale'nin Özeti XI.Uluslararası Biyoteknoloji Sempozyumu (BERLİN)'nda 3-8 Eylül 2000, Yayınlanmıştır.

ark. (4), haçeri ve doğadan elde edilen levrek yavrularının tatlı suya direkt transferlerinde tüm bireylerin tamamının öldüğünü, düşük tuzluluklarda (% 3,43), 48 saatlik kısa sayılabilecek alıştırmaların uzun alıştırmaya denemesinden daha az bir yaşama oranı sağladığını bildirmişlerdir. Benzer bir çalışmada Cataudella ve ark. (5), 48 saatlik kısa süreli adaptasyon uygulamasının doğadan toplanan levreklerin tamamında direkt ölümlere neden olduğunu, tatlı suya uyumlarının kültüre alınmış bireylerden daha az olduğunu bildirmişlerdir. Balık vücudunda normal metabolizma faaliyetleri sırasında (yağların oksidasyonu, karaciğerde ilaçların biyo-transformasyonu) superoksit radikali, hidroksil radikali benzeri serbest oksijen radikalleri oluşur.

Bunlar canlılarda oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türleridir (6). Canlı organizmada normal metabolizmanın dışında vücuda dışardan alınan kimyasal karsinojenler (pestisidler, ağır metaller, vb.), enfeksiyonlar (bakteriyel, paraziter, viral vb.), radyasyon hasarları ve çevresel stres (ağır metal zehirlenmesi, su kirliliği ve mevsimsel farklılıklar) faktörleri, vücutta serbest oksijen radikallerinin artmasına dolayısıyla oksidatif strese neden olurlar (7). Hücre içinde bulunan enzimatik antioksidan sistemler; Glukoz-6-Fosfat-Dehidrogenaz (G6PDH), Glutasyon Peroksidaz (GPX), Glutasyon Redüktaz (GR), Katalaz (CAT) ve Superoksit Dismutaz (SOD)) ile non-enzimatik antioksidanlardan olan Vitamin E, C, A, Redükte Glutasyon (GSH) ve ürik asit'tir (8,9). Bunlar eritrositlerde ve karaciğerde oksidatif strese karşı oluşan savunma mekanizmalarıdır (10,11). *GSH*; en önemli non-enzimatik antioksidandır. *GSH*, *GPX* için bir substrat olarak görev yapar. Dokudaki *GSH* ve glutasyon disülfid (*GSSG*) oranı, çevresel etmenler, yüksek basınçlı oksijen ve ilaç metabolizması ile değişim gösterir. Bunlar ayrıca oksidatif strese de neden olurlar (12). *SOD*; genelde aerobik solunum yapan canlılarda bulunurlar. Enzim, superoksit radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmayı korur (9,10). *G6PDH*; oksidatif strese karşı hücrel cevapta en önemli rolü oynayan enzimdir, insan ve balıkta (*Tetraodontinae*, *Fugu ruppripes*) homoloji gösterdiği bildirilmiştir (13). *G6PDH*'ın temel fizyolojik görevi redükte Nicotinamide Adenin Dinukleotid Fosfat (*NADPH*)'ın oluşumunu sağlamaktır. *NADPH* oksidatif strese karşı, yağ asitleri sentezini içeren biyosentetik reaksiyonlar ile toksisitenin önlenmesinde gerekli bir nükleotittir (10,14). Biyokimyasal fonksiyonundan dolayı tüm organizmalarda ve hücre tiplerinde bulunmuştur

(15). *GPX*; hidrojen peroksit'lerin toksik etkilerinin önlenmesinde en önemli peroksidazdır ve hidrojen peroksit'in yıkımını katalizler (10). *CAT*; hidrojen peroksit'in su ve oksijene yıkımını sağlar ve bir çok hayvan türünde belirlenmiştir (6). Bu görevi ile *GPX* enzimi ile yarış içindedir. Zarın lipid yapısını bozarak, lipid peroksidasyonu olarak adlandırılan bir dizi reaksiyonu başlatır. Lipid peroksidasyonu genelde kirli ortamlarda yer alan canlılarda en iyi stres indikatörü olarak kullanılır (16).

Araştırmamızda, ekonomik açıdan da üzerinde önemle durulan deniz balıklarından levreğin (*D. labrax*) tatlı suya adaptasyonu sonrası karaciğerde, enzimatik yönden oluşan değişimleri incelenmiştir. Normal metabolizmadaki antioksidan enzim miktarı ile tatlı suya (% 0 tuzluluk) uyum sağlamış balıklardaki farklılıklar izlenmiş ve balıklarda bu yöndeki fizyolojik değişimler belirlenmiştir. Böylece antioksidan sistem bozukluğu olarak saptanan bu olguların, ileride yapılacak moleküler düzeydeki çalışmalara katkı getireceği düşünülmektedir.

## Materyal ve Metot

Araştırmamızda tatlı suya adaptasyonu sağlanmış levrekler ele alınmış ve bunlar kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır (2). Deneme, biri kontrol (% 40 tuzluluk) ve diğeri deney grubu (tatlı su) olacak şekilde iki tekerrürlü kurulmuştur. Tankların her birine 20 balıktan, dört tank için 80 balık stoklanmıştır. Tanklara verilen su sürekli, kum ve kartuj filtrelerinden geçirilerek 1 µm'ye kadar filtre edilmiş, hava taşlarıyla havalandırılmıştır. Araştırmada kullanılan balık bireyleri 90 gün süreyle aynı koşullar altında denemeye alınmış ve pelet yem ile beslenmişlerdir. Balıklar açısından ortamda strese neden olabilecek her türlü olumsuz çevresel faktörler giderilmiştir. Balıklar üzerinde yapılan dış bakı ve disseksiyon sonrası muayenelerde, stresten kaynaklanan herhangi bir anormalliğe rastlanmamıştır. Ancak 90. günün sonlarına doğru deney grubunda ölümler başlamıştır. Kullanılan suyun bazı özelliklerini gözlemlemek amacıyla, tuzluluk ve sıcaklık ölçümleri her gün YSI marka (YSI 3010 USA) dijital bir salinometre ile yapılmış, pH ve oksijen değerleri de beşer gün aralıklarla WTW marka bir pH metre ve aynı marka bir oksijen metre kullanılarak belirlenmiştir. Araştırmamızda adaptasyon süresince balıkların maruz kaldığı farklı çevresel faktörlerin balıklar üzerinde yarattığı olası stres

düzeyi enzimatik açıdan karşılaştırmalı olarak verilmeye çalışılmıştır. Denemeye alınan balıklarda boy ölçümleri mm'ye duyarlı ölçüm tahtasında, ağırlık ölçümleri ise, mg'a duyarlı hassas terazide yapılmıştır. Daha sonra disseksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Analizler için, ölümlerin gözlemlendiği balıklardan seri bir şekilde, sağlıklı olarak gözlenen balıklardan ise öldürüldükten hemen sonra karaciğerler çıkarılıp, öncelikle ağırlıkları alınmış, analize alınacağına kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Ardından karaciğer dokusu, soğuk % 1,15 KCl (Merck) ile 1:5 oranında (w/v) homojenizatörde (Heidolph 50110 R2RO) 15-20 dk. homojenize edilmiştir. Homojenizatlar 14000 rpm'de + 4 °C'de 30 dk. santrifüj (Sorvall RC 2B) edilerek, süpernatantta enzim aktivitelerine, GSH ve MDA düzeylerine bakılmıştır. G6PDH, GPX, CAT ve GSH aktiviteleri Beutler yöntemiyle saptanmıştır (17). Buna göre G6PDH tayininde; reaksiyon karışımı 3 ml'lik total volümde 0,3 ml 1 M Tris-HCl pH 8,0 tampon, 0,3 ml 6 mM glukoz-6-fosfat (G6P), 0,3 ml 2 mM nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP), 0,3 ml 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, belirli miktarda saf su ve enzim içeren süpernatanttan oluşmaktadır. Tepkime, 37 °C'de enzim tarafından indirgenen 1 µmol NADP'nin 340 nm dalga boyunda ışık yolu 1 cm olan kuvars küvetlerde 10 dk süreyle her 5 dk'daki absorban değişimi izlenerek gerçekleştirilmiştir. GPX aktivitesi için; reaksiyon karışımı 1 ml'lik total volümde 100 µl 1 M Tris-HCl pH 8,0 tampon, 20 µl 0,1 M GSH, 100 µl 10 U/ml GR, 100 µl 2 mM NADPH ve belirli miktarda saf su ve enzim içeren süpernatant 37 °C'de 10 dk inkübe edildikten ve 10 µl 7 mM t-butil hidroperoksit konulduktan sonra başlatılmıştır. Tepkime, 37 °C'de enzim tarafından oksitlenen 1 µmol NADPH'in 340 nm dalga boyunda ışık yolu 1 cm olan kuvars küvetlerde 10 dk süreyle her 5 dk'daki absorban değişimi izlenerek gerçekleştirilmiştir. CAT aktivitesi süpernatantta yapılmıştır. Buna göre; reaksiyon karışımı 1 ml'lik total volümde 50 µl 1 M Tris-HCl pH 8,0 tampon, 900 µl 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 30 µl saf su ve 20 µl süpernatanttan oluşur. Tepkime, ışık yolu 1 cm olan küvetlerde 37 °C'de 230 nm dalga boyunda 5 dk süreyle her 2,5 dk'daki absorban değişimi izlenerek gerçekleştirilmiştir (17). GSH miktarı için; reaksiyon karışımı 10 ml'lik total volümde 2,0 ml filtrat, 8 ml fosfat tampon ve 1,0 ml DTNB (5,5'dithiobis 2-nitrobenzoic acid)'den oluşmaktadır. Kör 1,2 ml presipite edici solüsyon, 0,8 ml distile su, 8 ml fosfat tampon ve 1 ml DTNB'den hazırlanmıştır. Spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda DTNB öncesi ve DTNB sonrası

absorbanslar okunarak değerler standart eğriden değerlendirilmiştir (17). SOD aktivitesi ise Fridovich yöntemiyle saptanmıştır (18). Bunun için süpernatant 1:65 oranında 0,01 M fosfat tampon pH 7,0 ile dilüe edilmiş, bu dilüsyonda aktivite tayini yapılmıştır. Reaksiyon karışımı 1 ml'lik total volümde 25 µl enzim içeren süpernatant yada hemolizat, 850 µl ksantin ve INT (p-iyodonitrotetrazolium viyole) içeren mix substrat ve 125 µl ksantin oksidazdan oluşur. Kör de tıpkı numune gibi hazırlanmış, fakat örnek yerine fosfat tamponu konmuştur. Tepkime, 37 °C'de ışık yolu 1 cm olan kuvars küvetlerde numunenin 37 °C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı ilk 30 sn'deki başlangıç absorbanları (A1) okunmuş. Aynı anda kronometre çalıştırılarak 3 dk sonra son absorbanları (A2) tekrar okunmuş ve değerler standart eğriden değerlendirilmiştir. Süpernatantta MDA düzeyleri Okawa ve ark.'dan modifiye edilerek spektrofotometrik yöntem ile ölçülmüştür (19). Bu yöntemin esası TBA (tiyobarbitürik) ile MDA'nın asidik pH ve sıcak ortamda tepkimesi sonucu oluşan pembe renkli pigmentin spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır. MDA'nın kendisi stabil olmadığından, standart olarak test sırasında MDA'ya hidroliz olan 1,1,4,4-tetrametoksipropan kullanılmıştır. Yöntem uygulama prosedürüne göre; 0,1 ml eritrosit süspansiyonu üzerine 0,2 ml % 8,1'lik sodyum dodesil sülfat, 1,5 ml % 20'lik asetik asit, 1,5 ml % 0,8'lik tiyobarbitürik asit ve 0,7 ml saf su konularak 95 °C'de 30 dk su banyosunda kaynatılmıştır. Tüpler soğutulduktan sonra 1 ml saf su ve 5 ml butanol/piridin (1:14 oranında) ilave edilip, sonra tüpler 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstteki organik faz alınarak 532 nm dalga boyunda absorban okunmuş ve değerler standart eğriden değerlendirilmiştir. Enzim aktivite sonuçları, U/g doku, GSH seviye sonuçları mmol/g doku ve MDA seviyesi ise, nmol/g doku olarak tayin edilmiştir.

Karaciğer dokularının histopatolojik incelemesi için, doku kesitleri % 10'luk formaldehitte fikse edilmiş ve rutin işlemlerden sonra 5 mm kalınlığındaki doku kesitleri Harris hematoksilen-eosin boyası ile boyanarak, ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir (19). Elde edilen verilerin istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde ise, student t testi kullanılmıştır (20,21). Sonuçlar aritmetik ortalama (X) ve standart sapma (SD) olarak verilmiş, P < 0,05 önem düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir.

## Bulgular

Çalışmada kullanılan toplam 80 balıktan yapılan ölçümlerde ortalama boy  $14,62 \pm 0,68$  cm (Min 13,40 cm-Max 15,70 cm.) ve ağırlık ise  $32,90 \pm 6,05$  g (Min 24,59 g-Max 42,60 g) olarak tespit edilmiştir. Deneme boyunca su sıcaklığı  $23,4 - 26,2$  °C arasında olup, ortalama  $24,64$  °C'dir. pH  $7,92-8,96$  ve oksijen miktarı ise  $5,89-6,98$  mg/l olarak ölçülmüştür. Gruplar arasında yapılan karaciğer ağırlığı ve hepato/somatik indeks (HSI; karaciğer ağırlığı/vücut ağırlığı) tayininde değerler arasında önemli düzeyde artış gözlenmiştir ( $P < 0,05$ ) (Tablo 1). Deney grubu ve kontrol grubuna ait antioksidan enzim aktivite düzeylerinin sonuçları ise Tablo 2'de verilmiştir. Karaciğer dokularının mikroskopik incelemelerinde portal alanlarda yer yer eosinofil, lökosit ve mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve bazı alanlarda yağ dokunun artışı izlenmiştir (Şekil).

## Tartışma

Çalışmamızda normal metabolik faaliyetler sırasında oluşan serbest radikaller ile adaptasyon sırasında oluşabilecekler arasındaki fark izlenmiştir. Reaktif oksijen radikalleri, aeroblar tarafından oksijen kullanımının bir sonucu olarak üretilirler ve hücrede makromoleküllerle reaksiyona girerek enzim inaktivasyonuna, DNA hasarına ve sonunda hücrenin ölümüne neden olurlar (16). Fakat hücre bu hasara karşı, antioksidan sistemlerle korunur. Antioksidan sistemlerin düzeyleri, türe, cins, yaşa ve

Tablo.2. Kontrol Grubu ve Adaptasyonu Sağlanmış Levrek (*D.labrax*)'lerden Elde Edilen Antioksidan Enzimler.

	Kontrol Grubu Levrek ( <i>D.labrax</i> )'ler X±SD. (Min.-Max.) (n=40)	Adaptasyonu Sağlanmış Levrek ( <i>D.labrax</i> )'ler X±SD. (Min.-Max.) (n=40)
G6PDH (U/g liver)	13,19 ± 3,92 (8,75-16,25)	17,52 ± 5,44* (10,87-23,01)
GPX (U/g liver)	0,955 ± 1,205 (0,271-1,205)	3,58 ± 2,45* (1,20-6,23)
CAT (U/g liver)	14080,1 ± 8192,3 (4787,8-22584,3)	20622,3 ± 8680,9* (10250,1-29587,2)
SOD (U/g liver)	1938,7 ± 473,0 (1280,7-2512,0)	5383,6 ± 2459,0* (2524,6-7859,6)
GSH (µmol/g liver)	0,109 ± 0,071 (0,032-0,183)	0,003 ± 0,002* (0,00095-0,0051)
MDA (nmol/g liver)	53,20 ± 22,03 (30,08-78,23)	387,63 ± 178,16* (200,00-578,09)

X±SD. : Ortalama Değer ± Standart Sapma

Min.-Max. : Minimum ve Maksimum Değerler

\* : P<0,05 Önem Düzeyi

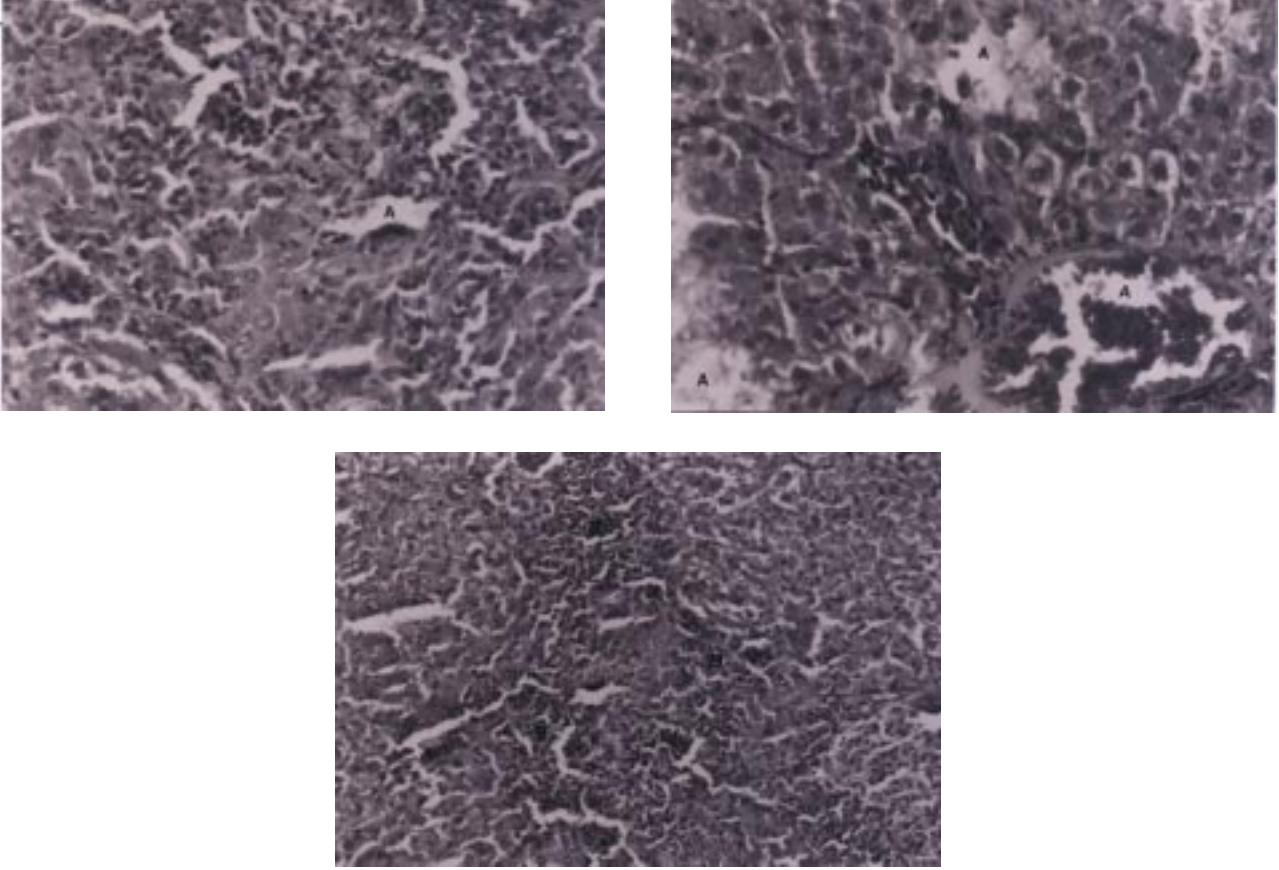
Tablo.1. Kontrol Grubu ve Adaptasyonu Sağlanmış Levrek (*D.labrax*)'lerden Elde Edilen Karaciğer Ağırlığı (g) ve Hepato / Somatik İndeksler.

Uygulamalar	Karaciğer Ağırlığı (g) X±SD. (Min.-Max.)	Hepato/Somatik İndeks X±SD. (Min.-Max.)
Kontrol Grubu Levrek ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )'ler	0,86±0,50 (0,12-1,27)	1,60±1,9 (1,2-2,0)
Adaptasyonu Sağlanmış Levrek ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )'ler	1,70±0,75* (0,67-3,22)	9,86±5,20* (8,4-11,2)

X±SD. : Ortalama Değer ± Standart Sapma

Min.-Max. : Minimum ve Maksimum Değerler

\* : P<0,05 Önem Düzeyi



Şekil. Tatlı Suya Adaptasyon Sonrası Levrek (*D.labrax*)'lerden Elde Edilen Karaciğer Doku Kesitleri A. Artış Gösteren Yağ Doku B. Lökosit ve Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu. H+E x 40.

çevresel etmenlere bağlı olarak değişim gösterir. SOD enzimi, genelde stres altındaki balıkta, doğal oksidasyonu önlemek için artış gösterir. Ayrıca kimyasal stresten de kaynaklanan bir takım artışlar olabildiği gibi sucul çevredeki adaptasyon durumlarında da SOD aktivitesinde farklılıklar gözlenmiştir (22). Çalışmamızda, adaptasyonu sağlanmış balıklarda SOD aktivitesinde artış tespit edilmiştir. SOD aktivitesinin artışı, hücre içinde intrasellüler superoksit radikalini yüksek oranda oluştuğunu göstermektedir. Enzim bir taraftan superoksit radikalini yok etmeye çalışırken diğer yandan hidrojen peroksit radikalini oluşturmaktadır. Bu hücrelerde tespit edilen yükselmeler GPX aktivitesinden de kaynaklanabilir. Bunun yanı sıra, kontrol levrek bireyleri arasındaki en büyük farklılık GPX enziminde görülmüştür. İncelenen 40 levrek bireyi içinde 17'sinin ortalamadan saptığı ve standart sapmanın ortalamasının üstünde olduğu gözlenmektedir (Tablo 2). Ortalamayı saptıran değerler çıkarıldığında  $0,897 \pm 0,785$  U/g

karaciğer bulunmuştur. Bu değerler, levrek bireylerinin aynı ortamdaki yaşam koşullarına farklı şekillerde verdikleri cevabın bir belirtisidir. Yapılan bir çalışmada, *Oreochromis niloticus* bireyleri içinde en büyük farklılığın SOD enziminde olduğu bildirilmiştir (23). SOD ve GPX farklı balık türlerinde de en önemli iki antioksidan enzimdir (16). GPX enzimi katalitik döngü süresince redükte GSH kullanır. Ortamda redükte GSH'ın yeterince sentezlenememesinden dolayı okside glutatyon artmış olabileceğinden GPX aktivitesinde de artış izlenmiştir. GPX üzerinde yapılan çalışmalarda, GPX'in sitozol, nukleus ve lizozom'da lokalize olduğu, balık karaciğer peroksizomlarında oluştuğu da bildirilmiştir (6). Deney grubunda, GSH seviyesinin düşmesi, GR aktivitesinin azalması olarak yorumlanmıştır. GR, okside glutatyonu redükte glutatyon, GSH'a dönüştürmektedir. Deney grubunda izlenen bu azalmalar, adaptasyon koşullarının pentoz-fosfat yolu aktivitesini etkilemesi yada Alfa-Glutamil sentaz enzimi üzerine repressör etki yaparak

GSH düzeyinde azalmalara neden olduğunu düşündürmektedir. GSH, balıkları ksenobiyotiklere karşı koruyan en önemli endojen maddelerden biridir. Bu nedenle GSH balıklarda bileşiklerin detoksifikasyonunu, mutagenesis, karsinogenesis ve doku nekrozu gibi kimyasal lezyonların önlenmesinde son derece önemlidir (6,11). G6PDH enzimi ise, yüksek oranda NADPH üretmektedir. NADPH aracılığı ile eritrositlerdeki antioksidan enzimler oksidatif strese karşı koruyucu etki yaparlar. NADPH, oksidatif stres koşullarına karşı saldırıda GSH ve GR aktivitesinin azalmasında önemli bir etken olup, ayrıca CAT yapımında da gerekli bir nükleotittir (8,10,17). Çalışmamızda deney grubunda G6PDH aktivitesinin arttığı buna bağlı olarak GSH düzeyinin azaldığı gözlenmiştir. Ortamda okside glutatyonun fazlalığı GPX aktivitesini artırmaktadır. Çünkü GPX enzimi substrat olarak GSSG'yi kullanmaktadır (10,24). Çalışmamızda G6PDH enzimi redükte GSH'ı tekrar oluşturmak için fizyolojik bir cevap olarak artmış olabilir. Peroksitlerin yıkımını sağlayan enzimler GPX ve CAT'dır. Deney grubunda CAT aktivitesindeki artış peroksit radikallerinin artışı ile ilgili olabileceği gibi G6PDH aktivitesinin artışı ile de ilgili olabilir. CAT, sucul organizmaların antioksidan enzim çalışmalarında farklı canlılar için farklı bölgelerde tespit edilmiştir. Bir araştırmacı, mollusk'larda ve balıklarda çevresel faktörlere bağlı olarak (mevsimsel) kirlilik çalışması (özellikle organik kirlilik) yapmıştır. Buna göre katalaz (CAT), midyede (*Mytilus sp.*) sindirim bezinin peroksizomlarında sitokimyasal veya immünositokimyasal yöntemlerle tanımlanmıştır. Yengeç (*Carcinus maenas*)'lerin hepatopankreaslarında ve değişik tip balıkların karaciğerinde bulunmuştur. Ayrıca antioksidan enzimler yengeç ve midyenin kan hücrelerinde de tespit edilmiştir (6). Hücre içinde serbest radikallerin arttığı durumlarda veya antioksidan enzimlerin serbest radikallerin yok edilmesinde yetersiz kaldığında lipid peroksidasyonu artmakta, dolayısıyla MDA seviyesini de artırmaktadır. MDA kanserojen bir madde olup, lipid

peroksidasyonunun göstergesidir (21). Çalışmamızda adaptasyon gösteren balıkların karaciğerlerinden yapılan makroskopik bakıda, normalin dışında büyüme ve konumda farklılıklar, renkte kahverengiden-sarıya doğru açılmalar izlenmiştir. Gül ve ark. (25), levreklerde tatlı suya adaptasyon ile ilgili çalışmalarında karaciğer dokusunda benzer patolojik bulgulara rastladıklarını bildirmişlerdir. Farklı bir çalışmada, denizler veya acı sulardan tatlı sulara geçiş yapan balıklarda kas, böbrek, solungaç ve karaciğer dokusunda yağlanmaların izlendiği bildirilmiştir (26). Şekil'de deneysel grubun karaciğerlerinde yer yer dejeneratif değişimlere rastlanmış, bazı alanlarda yağ dokuda artış gözlenmiştir. Bununla birlikte, karaciğer ağırlığı ve HSI'de de artış saptanmıştır (Tablo 1). Araştırmamızda adaptasyonlu grubun karaciğer dokusunda enzimler arasında izlenen farklılıklar, doğadan yakalanan bu balıklarda kısa süreli adaptasyonun (48 saat) çok sağlıklı bir tablo gösteremediğinin kanıtı olmuştur. Elde ettiğimiz sonuç, Cataudella ve ark. (5)'nin çalışmasında değindiği doğadan yakalanan deniz levrekleri'nin 48 saatlik tatlı suya direkt adaptasyonlarında gösterdikleri tolerans yeteneklerinin daha az olduğuna dair verdikleri sonuç ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca adaptasyonlu grupta yer alan balıklarda, karaciğer antioksidan sistemlerde kontrol grubuna göre farklılıklar, karaciğer dokusunda fizyometabolik fonksiyon bozukluğu, histopatolojik ve biyokimyasal değişimler de belirlenmiştir. Belirtilen adaptasyon koşullarının balıklarda gerek enzimatik ve gerekse histolojik yönden bazı farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, kısa sürede oluşturulan ve doğadan adaptasyona alınan bu balıkların, belirtilen koşullara yeteri düzeyde tolerans gösteremediklerinin iyi bir kanıtı olarak düşünülmektedir. Araştırma tatlı suya adapte olduğu düşünülen balıklar üzerinde adaptasyon koşullarının özellikle stres indikatörü antioksidan enzimler ve karaciğer dokusu üzerindeki etkilerinin ortaya çıkarılması açısından önem taşımaktadır.

## Kaynaklar

1. Cataudella, S., Allegrucci, G., Bronzi, P., Cataldi, E., Cion, C., Corti, M., Crosetti, D., De-Merich, D., Fortunato, C.: Multidisciplinary approach to the optimization of Sea Bass (*D. labrax*) rearing in fresh water. 1. Basic morphophysiology and osmoregulation. *Aquacult. Environ.* 1991; 14: 56-57.
2. Eroldoğan, T.O., Kumlu, M.: Growth performance, body traits and fillet composition of the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) reared in various salinities and freshwater. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2002; 26: 993-1001.

3. Maragos, C., Yagi, H., Ceccaldi, H.J.: Role de temperature et de la salinite sur le taux de survie et la morphogenese au cours du development embryonnaire chez les oeufs du loup de mer *Dicentrarchus labrax* (Linnae, 1758) (Pisces Teleostei Serranidae). Aquaculture. 1986; 54: 287-300.
4. Marino, G., Cataldi, E., Pucci, P.I., Bronzi, P., Cataudella, S.: Acclimation trials of wild and hatchery sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fry at different salinities. J. Appl. Ichthyol. Angew. 1994; 10: 57-63.
5. Cataudella, S., Allegrucci, G., Bronzi, P., Cataldi, E., Cion, C., Corti, M., Crosetti, D., De-Merich, D., Fortunato, C.: Multidisciplinary approach to the optimization of sea bass (*D. labrax*) rearing in fresh water. 1. Rearing trials at different salinities. Aquacult. Environ. 1991; 14: 60-61.
6. Orbea, A., Fahimi, D.H., Cajaraville, M.P.: Immunolocalization of four antioxidant enzymes in digestive glands of mollusks and crustaceans and fish liver. Histochem. Cell Biol. 2000; 114: 393-404.
7. Belge Kurutaş, E., Doran, F., Varinli, S.: Sağlıklı erkek farelerde (*Mus musculus*) eritrosit ve karaciğer antioksidan sistemin referans değerleri. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2001; 25: 505-509.
8. Isamah, G.K., Asagba, S.O., Coker, H.A.B.: Comparative evaluation of the levels of some antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different fish species in two rivers in the Western Niger Delta. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2000; 65: 351-356.
9. Scott, M.E., Harrington, P.J.: Comparative studies of catalase and superoxide dismutase activity within Salmon fish erythrocyte. Comp. Biochem. Physiol. 1990; 95: 91-93.
10. Bairy, C.D.A., Saito, E., Carvalho, S.M.P.: Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile Tilapia (*O. niloticus*) from a polluted site. Aquatic Toxicol. 1996; 34: 151-162.
11. Belge Kurutaş, E., Doran, F.: The effects of endosulfan on activity and kinetic properties of lactic dehydrogenase enzyme: A biochemical and histopathological Study. T. Klin. J. Med. Sci. 2001; 21: 11-16.
12. Ji, L.L., Katz, A., Fu, R., Griffiths M., Spencer, M.: Blood glutathione status during exercise: effect of carbohydrate supplementation. J. Appl. Physiol. 1993; 74: 788-799.
13. Mason, P.J., Stevens, D.J., Luzzatto, L.: Genomic structure and sequence of the *Fugu rupripes* glucose-6-phosphate-dehydrogenase (G6PDH). Genom. 1995; 26: 587-591.
14. Bagnasco, M., Camoirano, A., De Flora, S.: Enhanced liver metabolism of mutagens and carcinogens in fish living in polluted seawater. Mutation Res. 1991; 262: 129-137.
15. Benjamin, O., Alex, C.I., Emmanuel, N.: A comparative study of superoxide dismutase in various animal species. Comp. Biochem. Physiol. 1990; 95: 521-523.
16. Manno, M., Bertazzon, A., Burlina, A., Galzigna, L.: Interaction of low doses of ionizing radiation and carbon tetrachloride on liver superoxide dismutase and glutathione peroxidase in mice. Enzyme. 1985; 34: 107-112.
17. Beutler, E.: Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase Deficiency. In the Metabolic Basis of the Inherited Diseases. 5th ed. Mc Graw Hill, 1983. New York.
18. Fridovich, I.: Superoxide dismutase. Advan. Enzymol. 1974; 41: 35-97.
19. Okawa, H., Ohishi, N., Tagi, K.: Assay for lipid peroxidase in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 1979; 95: 351-358.
20. Beutler, E.: Red Cell Metabolism. Press. 2. Grune and Stratton. 1975. New York.
21. Yagi, K.: Assay for plasma lipid peroxidase. Meth. Enzymol. 1984; 109: 328-331.
22. Zülal, A.: Uzun Yaşamın Sırları. TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi. 2001; 400: 58-61.
23. Belge, E., Oruç, E., Yüregir, G.T., Üner, N., Doran, F., Varinli, S.: *Mus musculus* ve *Oreochromis niloticus*'un karaciğer dokusunda antioksidan sistemlerin karşılaştırılması. Erciyes Tıp Derg. 1998; 20: 239-243.
24. Morrism, S., Albright, T.S.: Catalase, glutathione, peroxidase and superoxide dismutase in the rete mirabile and gas gland epithelium of six species of marine fishes. Exp. Zool. 1984; 232: 29-39.
25. Gül, Ş., Belge, E., Şahan, A., Dikel, S.: Influence of hypo-salinity on liver antioxidant systems in the marine fish (sea bass). 11th Biotechnology Symposium and Exhibition in BERLIN. Book of Abstracts 2000; 3: 254-255.
26. Hansen, H.J.M., Grosell, M.H., Rosenkilde, P.: Gill lipid metabolism and unidirectional Na<sup>+</sup> flux in the European Eel (*Anguilla anguilla*) after transfer to dilute media: The formation of wax alcohols as a primary response. Aquaculture. 1999; 177: 277-283.