

Farklı Su Sıcaklıklarında Tutulan Aynalı Sazanlarda (*Cyprinus carpio*) Eritrosit Hücrelerinin Ozmotik Kırılgenlıkları ile Yağ Asidi Kompozisyonları

Olçay HİSAR, Şükriye ARAS HİSAR
Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Bölümü, 25240, Erzurum - TÜRKİYE
Mükerrem KAYA
Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği, 25240, Erzurum - TÜRKİYE
Telat YANIK
Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Bölümü, 25240, Erzurum - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 05.04.2002

Özet: Farklı sıcaklık derecelerinde (8, 16 ve 28 °C) tutulan aynalı sazanlarda (*Cyprinus carpio*) eritrosit hücrelerinin ozmotik kırılgenlıkları (EOF) ve yağ asidi kompozisyonları belirlenmiştir. Sıcaklık düşüşü ile birlikte eritrositlerde EOF değerleri önemli derecede artmıştır (% 0,19 - % 0,24). Doymuş (% 44,49 - % 38,40) ve tekli doymamış (% 26,30 - % 13,99) yağ asit miktarlarında önemli miktarda azalmalar, çoklu doymamış yağ asidi (% 29,21 - % 47,59) miktarlarında ise önemli miktarda artışlar (P < 0,05) tespit edilmiştir. Sonuç olarak düşük sıcaklığın (8 °C) sazanlarda tolere edilebilir bir strese neden olduğu görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Ozmotik kırılgenlık, yağ asitleri, eritrosit, aynalı sazan

Osmotic Fragility and Fatty Acid Composition of Erythrocyte in Mirror Carp (*Cyprinus carpio*) Kept at Different Water Temperatures

Abstract: Osmotic fragility and fatty acid composition in erythrocytes of mirror carp (*Cyprinus carpio*) kept at 8 °C, 16 °C and 28 °C were determined. Osmotic fragility in erythrocytes (EOF) increased significantly (0.19-0.24%) with the low water temperature. Significant declines in the quantity of saturated fatty acid (44.49-38.40%) and monounsaturated fatty acids (26.30-13.99%), and significant increases in that of polyunsaturated fatty acid (29.21-47.59%) were determined (P < 0.05). It was concluded that low water temperature caused a tolerable stress in mirror carps.

Key Words: Osmotic fragility, fatty acids, erythrocyte, mirror carp

Giriş

Sazanlar çok değişik sıcaklık ve O₂ muhtevasına sahip sularda bulunabilmektedirler (1). Fakat, balıklar uzun süre veya sık sık tekrarlanan periyotlar içerisinde stres faktörlerine maruz bırakıldıklarında büyümede gecikme, üretim performansında düşüş ve çeşitli hastalıklara karşı dirençleri azalmaktadır. Stres, su ürünleri yetiştiriciliğinde önem arz eden çevresel faktörlerin kaçınılmaz bir bileşenidir ve çevresel etkiler sonucu oluşan stres faktörlerinin en önemlilerinden bir tanesi suyun sıcaklığıdır (2,3).

Poikilotermik omurgalıların vücut sıcaklıkları hem günlük hem de mevsimsel sıcaklık değişimlerine bağlı

olarak devamlı bir iniş çıkışa sahiptir. Vücut sıcaklığında meydana gelen bu sıcaklık değişimleri, hayvanların eritrositleri üzerinde fizyolojik strese neden olmaktadır (4). Düşük sıcaklıktan kaynaklanan streste balıkların eritrosit hücrelerinin ozmotik kırılgenlığının önemli derecede değişmediği vurgulanmaktadır (5). Diğer taraftan, çevre sıcaklık değişimlerinin poikilotermik canlıların eritrosit hücrelerindeki membran yağ asidi kompozisyonunu değiştirdiği bildirilmektedir (6,7). Bu değişim miktarının türlere bağlı olarak farklılıklar gösterebileceği örneğin ektoterm canlıların EOF (eritrosit hücrelerinin ozmotik kırılgenlığı) değerlerinin endoterm canlıların EOF değerlerinden oldukça düşük olduğu kaydedilmektedir (8).

Canlı organizmalarda plazma membran akışkanlığının biyolojik önemi çok büyüktür. Çünkü, plazma membranları katı, sert ve akışkan olmayan bir yapıya sahip olsalardı hücrelerin hareketi, büyümesi, bölünmesi ve hücreler arası birleşmeler gibi birçok temel hücresel işlevler gerçekleşemezdi (9,10). Düşük sıcaklıklarda sıcakkanlı hayvanlarda bu işlevlerin yerine getirilmesinde eritrositlerdeki kolesterol rol oynarken, balıkların eritrosit hücrelerinde kolesterol olmadığından membran akışkanlığını sabit tutmak için plazma membranının yağ asidi kompozisyonunu değiştirirler (10). Balıklarda 16 ve 18 karbonlu yağ asitleri fazla miktarlarda bulunmaktadır (11). Çoklu doymamış yağ asitlerinden dokosaheksaenoik, eikosapentaenoik ve araşidonik yağ asitlerinin balıklardaki biyokimyasal, hücresel ve fizyolojik fonksiyonlarda rol oynadığı, örneğin bu yağ asitlerinin hücre membranlarının fonksiyonel bütünlüğünün ve akışkanlığının korunmasının sağlanmasında rol aldıkları kaydedilmektedir (9,10).

Farklı ortamlarda tutulan balıklarda farklı verimlerin alınmasına sebep olarak sıcaklık, ışık, balığın türü gibi faktörlerin etki yaptığı bilinen bir olgudur. Ekonomik bakımdan ele alındığında her balık türü maksimum verim verebilmek için optimum sıcaklıklar istemektedir. Bu sıcaklık derecesinin altında ve üzerinde verimlerde düşmeler görülmektedir. Bu çalışmada verim düşüklüğüne neden olan düşük sıcaklığın vücutta özellikle eritrositlerde yaptığı değişikliklerin tespit edilmesi amaçlanmaktadır. Bu maksatla farklı sıcaklık derecelerinde (8, 16 ve 28 °C) yetiştirilen aynalı sazanlarda, eritrosit hücrelerinin ozmotik kırılabilirlikleri (EOF) ile yağ asidi kompozisyonları tespit edilmiştir.

Materyal ve Metot

Denemede kullanılan balıklar (ortalama 80 ± 10 g ağırlığında) Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Bölümünden alınmış ve daha sonra 9 adet ve her biri 0,5 m³'lük tanklara 10 adet balık konularak üç grup oluşturulmuştur. Başlangıçta sıcaklık adaptasyonu için beklenen 1 aylık süre hariç, birinci gruptaki balıklar 8 °C'de, ikinci gruptakiler 16 °C'de ve üçüncü gruptakiler ise 28 °C'de 2 ay tutulmuşlardır. Balıklara, deneme boyunca haftada beş gün 3567 cal/kg enerjiye sahip ticari sazan yemi ile serbest yemleme yapılmıştır.

Balıklar MS-222 ile bayıltılmış daha sonra heparinli şırıngalar kullanılmak suretiyle alınan 1,5 ml'lik kan

numuneleri yine heparin içeren tüplerde muhafaza edilmiştir (12,13).

Ozmotik kırılabilirliğin belirlenmesinde Aldrich ve Saunders (8) tarafından modifiye edilen metot kullanılmıştır. Bu metotta solüsyon miktarı 2,5 ml'den 1ml'ye, örnek kan miktarı da 50 µl'den 20 µl'ye düşürülmüştür. Araştırmada farklı oranlarda tuz içeren (% 0, % 0,1, % 0,2, % 0,3, % 0,4, % 0,5, % 0,6, % 0,7, % 0,8 ve % 0,9) solüsyonlar kullanılmıştır. Başlangıçta her balık kanı örneği için üç tekerrürlü, % 0 ve % 0,9 arasında NaCl içeren solüsyonlardan 1 ml alınarak tüplere konulmuştur. Ardından 8 °C, 16 °C ve 28 °C sıcaklıkta yetiştirilen balıklardan alınan kan örnekleri iyice karıştırılarak her bir solüsyonun içerisine 20 µl kan örneği ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletilen tüpler daha sonra hafifçe çalkalanarak 2000 devir/dak.'da 5 dak. santrifüjlenmiştir. Liziz olan eritrosit hücrelerinin membranlarını ve liziz olmayan kan hücrelerini içeren pelletler atılarak süpernatantlarda yalnızca liziz olmuş eritrosit hücrelerinin hemoglobini ile NaCl solüsyonunun kalması sağlanmıştır. Süpernatantların spektrofotometrede (540 nm dalga boyunda) absorbansları ölçülerek süpernatanttaki hemoglobinin oransal değeri belirlenmiş ve aşağıdaki eşitlikten yararlanılarak her bir NaCl solüsyonundaki % liziz hesaplanmıştır (14).

$$\% \text{ Hemoliz} = A_{(x)} - A_{\% 0,85} / A_{(0)} - A_{\% 0,85}$$

Bu eşitlikte $A_{(x)}$ belirli miktarda hemoliz olan herhangi bir solüsyonun absorbans miktarı, $A_{(0)}$ ise % 0,0 NaCl içeren solüsyonun absorbansdır.

Balıkların eritrosit hücrelerindeki yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi için başlangıçta alınan kan örneklerinin 1ml'si ependorf tüpleri içerisinde santrifüj edilip (3000 devir/dak.) plazmanın ayrılması sağlanmıştır. Ardından, eritrosit hücreleri izotonik tuz çözeltisi ile üç defa yıkanmış ve MIDI-Sherlock® gaz kromatografisi kullanılarak yağ asidi kompozisyonu belirlenmiştir (15).

Deneme sonunda elde edilen veriler varyans analizine ve Duncan çoklu karşılaştırma testine $\alpha = 0,05$ seviyesinde tabi tutulmuştur (16).

Bulgular

Yapılan analizler sonucunda % 0,0 NaCl içeren solüsyonda eritrosit hücrelerinin tamamı liziz olurken % 0,9 NaCl içeren solüsyonda ise liziz olayı gözlenmemiştir. Çünkü % 0,9 NaCl içeren solüsyon, balık kan

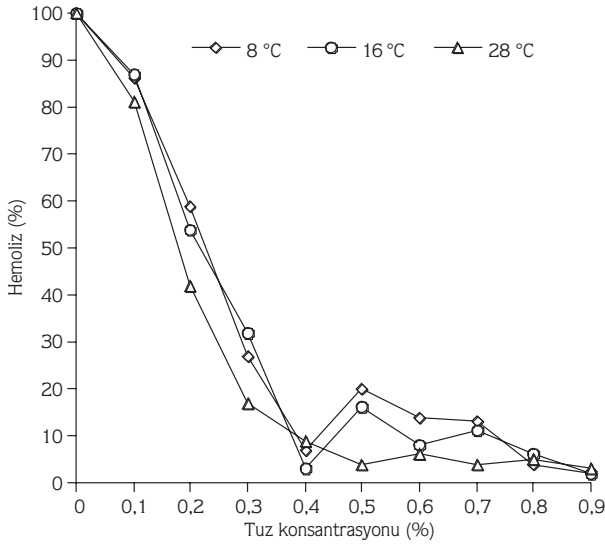
plazmalarının ozmotik basıncına yakın bir basınca sahiptir. Değişik oranlarda NaCl içeren diğer solüsyonlar ise içerdikleri NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak eritrosit hücrelerinde lizis meydana getirmişlerdir (Şekil). Farklı sıcaklıkta tutulan sazanların eritrosit hücrelerinin % 50 hemoliz oldukları % tuz konsantrasyonlarının aralarındaki farklar önemli bulunmuştur ($P < 0,05$) (Tablo 1).

Eritrosit hücrelerinin yağ asitleri ile ilgili elde edilen

Tablo 1. 8 °C, 16 °C ve 28 °C'de yetiştirilen sazan balıklarında eritrositlerin % 50 hemoliz oldukları % NaCl konsantrasyonları (Ortalama \pm standart sapma)

	Sıcaklık (°C)		
	8	16	28
Oransal EOF değeri (%)*	0,24 \pm 0,01 ^a	0,23 \pm 0,02 ^{ab}	0,19 \pm 0,01 ^b

* Aynı satırda bulunan farklı üst simgeli ortalamalar birbirlerinden 0,05 seviyesinde önemlidir



Şekil. Farklı sıcaklık derecelerinde (8 °C, 16 °C ve 28 °C) yetiştirilen sazanların tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak eritrosit hücrelerinde meydana gelen % hemoliz oranları

veriler, çevresel sıcaklık değişimlerine karşı sazan eritrositlerinin yağ asidi kompozisyonunda değişiklikler olduğunu göstermiştir. Sıcaklık artışı ile birlikte doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerinin yüzde konsantrasyonunda önemli artış meydana gelirken çoklu doymamış yağ asitlerinde ise önemli miktarda azalış meydana gelmiştir (Tablo 2).

Tartışma

Düşük sıcaklıkta, membranın suya olan geçirgenliğinin arttığı ve eritrosit hücrelerinin maruz kaldığı ozmotik gradientin yükseldiği, dolayısıyla eritrosit hücrelerinin zarar görme risklerinin de arttığı bildirilmektedir (17). Martinez ve ark. (5) sazanlarda (*Cyprinus carpio* L.) 5 °C, 11 °C ve 20 °C'lik sıcaklıkların balıkların eritrosit hücreleri üzerine hiçbir etkisinin olmadığını bildirmelerine rağmen, bu çalışmada EOF değerinin 8 °C'de 28 °C'ye göre önemli derecede arttığı tespit edilmiştir. Çalışmalardan elde edilen zit sonuçlara benzer şekilde Lands (18), membran akışkanlığı ile biyosentez olayı arasında doğrudan bir ilişkinin olmadığını bildirmesine rağmen, düşük sıcaklıkta eritrositlerde meydana gelen bu değişimlerin, membranın fonksiyonel sıvı kristal halini uygun akışkanlıkta devam ettirme gereksiniminden kaynaklandığı, ayrıca bu düzenleme ile balıklarda ölüme neden olan yüksek sıcaklıklardaki aşırı membran hareketinin de önlenildiği sanılmaktadır (6,7). Fakat hala, membran akışkanlığındaki bu adaptasyonu sağlamak için nasıl bir biyosentetik işlem yapıldığı bilinmemektedir. Bu konu hakkında değişik görüşler bulunmaktadır. Örneğin, membranın doymamış yağ asitleri kompozisyonundaki değişikliğin membrandaki biyosentetik enzimlerin dikey hareketlerinden meydana geldiği (19), veyahut doymuş veya doymamış yağ asitlerinin farklı çözünürlüğünün gerekli olan akışkanlığı sağlayabildiği farz edilmektedir (20).

Lie ve ark. (21) farklı su sıcaklıklarında (8 °C, 12 °C ve 16 °C) beslenen morina balıklarının (*Gadus morhua*) eritrosit hücre membranlarındaki, fosfotidilkolin (PC), fosfotidiletanolamin (PE), fosfotidilserin (PS) ve fosfotidilinositol (PI) fosfolipidlerinin yağ asidi kompozisyonlarını belirlemiş ve su sıcaklığındaki düşüş ile birlikte çoklu doymamış yağ asitlerinde genellikle artış, tekli doymamış ve doymuş yağ asitlerinde düşüş olduğunu bildirmişlerdir. Lie ve ark. (21)'nin elde ettiği sonuçlara benzer şekilde doymuş yağ asitlerinde 8 °C'de önemli bir düşüşün olduğu, tekli doymamış yağ asitlerinde ise önemli derecede artışın olduğu görülmektedir. Bu durum balıkların sıcaklık değişikliklerine karşı benzer reaksiyonlar sergilediklerini akla getirmektedir. Ancak daha kesin yargıya varabilmek için aynı çalışmanın farklı balık türlerinde de yapılması gerekmektedir.

Araştırmadan elde edilen tüm veriler değerlendirildiğinde, düşük sıcaklıkta (8 °C), sazan eritrosit membranlarındaki doymamış yağ asitlerinin yüzdelerin artmasına rağmen,

Tablo 2. 8 °C, 16 °C ve 28 °C'de yetiştirilen sazanların eritrosit hücrelerinin yağ asidi kompozisyonu (%).

Genel ismi	Karbon Sayısı	Sıcaklık		
		8 °C	16 °C	28 °C
Palmitat	16:0	29,0	31,47	33,03
Stearat	18:0	9,4	14,2	11,46
Σ (Doymuş yağ asitleri)*		38,4 ^b	45,67 ^a	44,49 ^a
Palmitoleat	16:1 ω 7	-	-	4,94
Oleat	18:1 ω 9	9,83	10,84	13,91
Oleat ¹	18:1 ω 9 ¹	4,16	8,21	7,45
Σ (Tekli doymamış yağ asitleri)		13,99 ^c	19,04 ^b	26,3 ^a
Linoleat	18:2 ω 6	4,87	-	-
Araşidonat	20:4 ω 6	19,43	15,2	10,97
Dokosapentaenoik asit	22:5 ω 3	5,19	-	4,53
Dokosaheksaenoik asit	22:6 ω 3	18,1	20,09	13,71
Σ (Çoklu doymamış yağ asitleri)		47,59 ^c	35,29 ^b	29,21 ^a
Total Σ		99,98	100	99,89

¹yağ asidi izomeri

*Aynı satırda bulunan farklı üst simgeli ortalamalar birbirlerinden 0,05 seviyesinde önemlidir

aynı sıcaklık derecesinde EOF değerlerinde de artışların tespit edilmesi balıkların riskli bir ortamda bulduklarının göstergesi olarak kabul edilebilir. Başka bir ifade ile düşük sıcaklıklarda sazanların eritrosit membran dayanıklılığını tam olarak koruyamadıkları anlaşılmaktadır. Fakat, düşük sıcaklıklarda EOF değerlerinde gözlenen artışın eritrosit hücrelerine zarar vermemesi; sazan eritrositlerinin oldukça güçlü bir ozmotik rezistansa sahip olduklarını ve lizizden korunmak

için ek bir mekanizmaya ihtiyaç duymadıklarını göstermektedir.

Sonuç olarak, eritrositlerdeki parçalanmaların ölümlere sebebiyet verdiği göz önüne alındığında, düşük sıcaklık derecesinde tutulan sazan eritrositlerindeki yağ asidi kompozisyonlarının yüksek sıcaklık derecelerine göre daha değişik profil sergilediği ve eritrositlerin güçlü bir ozmotik dirence sahip oldukları ve ölmedikleri tespit edilmiştir.

Kaynaklar

1. Aras, N. M., Kocaman, E.M., Aras, M.S.: Genel Su Ürünleri ve Kültür Balıkçılığının Temel Esasları. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 216. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, Erzurum, 143-144, 2000.
2. Pottinger, T.G., Carrick, T.R.: A Comparison of Plasma Glucose and Plasma Cortisol as Selection Markers for High and Low Stress-responsiveness in Female Rainbow Trout. Aquaculture. 1999; 175: 351-363.
3. Roche, H., Boge, G.: Fish Blood Parameters as a Potential Tool for Identification of Stress Caused by Environmental Factors and Chemical Intoxication. Marine Environ. Res. 1996; 41: 27-43.
4. Pough, H.F., Andrews, R.M., Cadle, J.E., Crump, M.L., Savitzky, A.H., Wells, K.D.: Temperature and Water Relations. In: Snively, S.L., Corey, P.F. Eds., Herpetology. Prentice-Hall, NJ, 1998; 137-172.
5. Martinez, I., Viscor, G., Palomeque, J.: Effects of Temperature, Oxygen and Carbon Dioxide on Osmotic Fragility of Carp, *Cyprinus carpio* L., Erythrocytes. J. Fish Biol. 1988; 32: 247-252.
6. Cossins, A.R.: Adaptation of Biological Membranes to Temperature. The Effect of Temperature Acclimation of Goldfish upon the Viscosity of Synaptosomal Membranes. Biochim. Biophys. Acta. 1977; 470: 395-411.
7. Lee, A.G., East, J.M., Froud, R.J.: Are Essential Fatty Acids Essential for Membrane Function? Prog. Lipid Res. 1986; 25: 41-46.
8. Aldrich, K., Saunders, D.K.: Comparison of Erythrocyte Osmotic Fragility among Ectotherms and Endotherms at Three Temperatures. J. Thermal Biol., 2001; 26: 179-182.

9. Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., Estevez, A.: Recent Developments in the Essential Fatty Acid Nutrition of Fish. *Aquaculture*. 1999; 177: 191-199.
10. Karp, G.: *Cell Biology*. McGraw-Hill Book Company, USA. 1984; 145-167.
11. Keha, E.E., Küfreviođlu, Ö.İ.: *Biyokimya*. Şafak Yayınevi, Erzurum, 1997; 183-184.
12. Blaxhall, P.C., Daisley, K.W.: Routine Haematological Methods for Use with Fish Blood. *J. Fish Biol.* 1973; 5: 771-781.
13. Kocabatmaz, M., Ekingen, G.: Değişik Tür Balıklarda Kan Örneği Alınması ve Hematolojik Metotların Standardizasyonu. *Dođa Bilim Derg.* 1984; 8: 149-159.
14. Harmening, D.M.: *Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis*. F.A. Davis Company, Philadelphia, 1997; 614-616.
15. MIDI: *Sherlock Microbial Identification System, Version 4 MIS Operating Manual*, Newark, DE, 2000.
16. Yıldız, N., Bircan, H.: *Uygulamalı İstatistik*. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 704. Atatürk Üniv. Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi, Erzurum, 1994; 120-154.
17. Cossins, A.R., Lee, J.A.C.: The Adaptation of Membrane Structure and Lipid Composition to Cold. In: Gilles, R. Ed., *Circulation, Respiration and Metabolism*. Springer, Berlin, 1985; 543-552.
18. Lands, W.E.M.: Dialogue between Membranes and Their Lipid Metabolising Enzyme. *Trans. Biochem. Soc.* 1980; 8: 25-27.
19. Thompson, G.A.: Regulation of Membrane Fluidity during Temperature Acclimation by *Tetrahymena pyriformis*. In: Kates, M., Kuksis, A.A., Eds., *Membrane Fluidity: Biophysical Techniques and Cellular Regulation*. Humana Press, Clifton, NJ, 381-397, 1980.
20. Melchior, D.L., Steim, J.M.: Control of Fatty Acid Composition of *Acholeplasma laidlawii* Membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1977; 466: 148-159.
21. Lie, Ø., Lied, E., Lambertsen, G.: Haematological Values and Fatty Acid Composition of Erythrocyte Phospholipids in Cod (*Gadus morhua*) Fed at Different Water Temperatures. *Aquaculture*. 1989; 79: 137-144.