

Banyo yoluyla oksitetrasiklin uygulanan pullu sazan (*Cyprinus carpio*)' da paraoksonaz ve arilesteraz enzim aktivitelerindeki değişimlerin araştırılması

Investigation of changes in paraoxonase and arylesterase enzyme activities in scaly carp (*Cyprinus carpio*) applied oxytetracycline by bath

Ufuk Aker¹ • Serpil Mişe Yonar^{2*}

¹ İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Gölcük, Kocaeli

<https://orcid.org/0000-0003-4526-3966>

² Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, 23119, Elazığ

<https://orcid.org/0000-0003-2736-5731>

Corresponding author: serpilmise@gmail.com

Received date: 12.09.2019

Accepted date: 06.01.2020

How to cite this paper:

Aker, U. & Yonar, S.M. (2020). Investigation of changes in paraoxonase and arylesterase enzyme activities in scaly carp (*Cyprinus carpio*) applied oxytetracycline by bath. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37(2), 175-180. DOI: [10.12714/egejfas.37.2.08](https://doi.org/10.12714/egejfas.37.2.08)

Öz: Bu çalışmada, pullu sazan (*Cyprinus carpio*)'a farklı konsantrasyonlarda uygulanan oksitetrasiklinin paraoksonaz (PON) ve arilesteraz (ARE) enzim aktivitelerine etkisinin ortaya çıkarılması amaçlandı. Bu amaçla oksitetrasiklin 50 ve 75 mg/L konsantrasyonlarında 48 saat süreyle banyo tarzında balıklara uygulandı. Oksitetrasiklin uygulamasından sonraki 7., 14. ve 21. günlerde kontrol ve deneme grubunda balıklardan karaciğer ve serum örnekleri alındı. Alınan örneklerde PON ve ARE enzim aktivitelerindeki değişimler belirlendi. Oksitetrasiklin uygulanan grupların karaciğer ve serumundaki PON ve ARE enzim aktiviteleri kontrol grubuna kıyasla azaldı. Bu azalma 7., 14. ve 21. günlerde kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı bulundu.

Anahtar kelimeler: Arilesteraz, *Cyprinus carpio*, enzim, oksitetrasiklin, paraoksonaz

Abstract: In this study, it was aimed to reveal the effects on paraoxonase (PON) and arylesterase (ARE) enzyme activities of oxytetracycline applied in different concentrations in scaly carp (*Cyprinus carpio*). For this purpose, oxytetracycline at doses of 50 and 75 mg/L was applied by bathing for 48 hours. On the 7th, 14th and 21st days after the application of oxytetracycline, liver and serum samples were taken from the fish in the control and experimental groups. Changes in the PON and ARE enzyme activities were determined in the liver and serum samples which collected from the fish. The PON and ARE activities in the liver and serum decreased in the groups exposed to oxytetracycline compared to that of the control group. This reduction was statistically different from the control group on 7, 14 and 21 days.

Keywords: Arylesterase, *Cyprinus carpio*, enzyme, oxytetracycline, paraoxonase

GİRİŞ

Su ürünleri sektörü günümüzde önemli üretim sektörlerinden birisi olmakla birlikte entansif yetiştiricilikte balıkların yoğun stoklanması hastalık riskini ve problemlerini artırmaktadır. Hasta balıklar tedavi edilmediği takdirde balık ölümlerinden dolayı büyük ekonomik kayıplar oluşabilmektedir (Arda vd., 2005). Balık yetiştiriciliğinde hastalıklara karşı etkin tedavi yöntemlerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Bununla birlikte entansif yetiştiricilikte hastalık oluşuktan sonra balıkları tedavi etmek uzun ve yorucu bir çalışmayı gerektirmektedir. Ayrıca tedavide başarı da çoğunlukla mümkün olamamaktadır (Arda vd., 2005).

Balıklarda görülen ve önemli ekonomik kayıplara yol açan bu enfeksiyonların tedavisi için çok çeşitli kemoterapötik maddeler uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Bu kemoterapötikler arasında önemli bir yer tutan oksitetrasiklin ilk olarak 1949 yılında Finlav tarafından *Streptomyces rimosus* kültürlerinden elde edilmiş tetrasiklin türevi bir antibiyotiktir. Etki spektrumları son derece geniş olduğu için önemli yan etkileri

ve dirençli bakteri suşları ortaya çıkmış olmasına rağmen ülkemizde veteriner hekimlikte ve akuakültürde halen en çok kullanılan antibiyotikler arasındadır. Amfoter maddeler olduklarından dolayı asit ve bazlarla tuz oluşturabilirler. Tedavide asitlerle yaptıkları tuzları kullanılır ve en çok hidroklorür tuzu (terramisin) şeklinde bulunurlar. Renkleri açık sarı olup, kokusuz ve hafif acı bir tada sahiptirler (Kaya vd., 1997). Bakterilerde ribozomların 30S alt birimine bağlanan oksitetrasiklin ve diğer tetrasiklinler, aminoasit-tRNA'nın buraya bağlanmasını engelleyerek protein sentezini bozarlar. Böylece bakterinin üremesi ve gelişmesi yavaşlar ve oksitetrasiklin bakteriyostatik etki gösterir. Bunun yanı sıra hücre zarının yapısını değiştirip, nükleotit ve diğer bakteriyel yapıların hücreden dışarıya çıkmasını engelleyerek baskılayıcı etki gösterirler (Brander vd., 1982; Kayaalp., 1984; Kaya vd., 1997; Aktaş, 2016).

Geniş bir etki spektrumuna sahip olduğu için oksitetrasiklin neredeyse tüm bakteriyel balık hastalıklarının tedavisinde ilk akla gelen ve kullanılan ilaçtır. Vibriyoz, yersinyoz, furunkuloz,

streptokokkoz, mikobakterioz ve kolumnaris gibi birçok bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan oksitetrasiklin, balıklara enjeksiyon, oral ve immersiye yöntemleriyle uygulanabilmektedir. Oral yolla genellikle 75 mg/kg balık dozunda ve 10 gün süreyle yeme karıştırılarak uygulanan oksitetrasiklin enjeksiyon yöntemiyle çoğunlukla tek doz olarak verilmektedir. Oksitetrasiklin balıklara ayrıca daldırma yöntemi ile de uygulanabilir. Bu yöntemdeki oksitetrasiklin dozu 5-120 mg/L arasındadır (Treves-Brown, 2000).

İlk olarak 1946 yılında Abraham Maruz tarafından keşfedilen paraoksonaz (PON) enzimi, 1991 yılında insan serumundan saflaştırmış ve enzimin hem PON hem de arilesteraz (ARE) aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Mackness vd., 1987). PON/ARE enzim ailesinin üç formdan (paraoksonaz 1; PON1, paraoksonaz 2; PON2, paraoksonaz 3; (PON3) olduğu rapor edilmiştir (Gökçe, 2013). Kalsiyum bağımlı bir esteraz enzimi olan ve karaciğerde sentezlenen PON serumda yüksek dansiteli lipoprotein (HDL)'e bağlı olarak taşınır. Organofosfatları ve sinir gazlarını hidroliz edebilme kabiliyetindeki PON, bu özelliği nedeniyle toksikolojik çalışmalarda bir hayli değerlendirilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda PON enziminin yüksek bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve HDL ile düşük dansiteli lipoproteini (LDL) ve makrofajları oksidasyondan koruyarak ateroskleroz gelişimini önlediği, bakteri endotoksinlerine karşı koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (Gan vd., 1991; Li vd., 1993; Mackness vd., 1996; Mackness vd., 1997; Azarsız ve Sönmez, 2000; Gürsu ve Özdin, 2002).

Balık hastalıklarının tedavisinde yaygın şekilde kullanılan oksitetrasiklinin balıklar üzerindeki etkileri, farklı balık türlerinde farklı parametreler kullanılarak yapılan birçok araştırmada gösterilmiştir. Bu çalışmada ise PON ve ARE enzim aktiviteleri kullanılarak oksitetrasiklinin pullu sazan (*Cyprinus carpio*)'da oluşturabileceği muhtemel toksik etkilerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Ortalama ağırlıkları 40 ± 5 g olan 270 adet pullu sazan (*Cyprinus carpio*) bu çalışmada kullanıldı. Balıklar Elazığ ili Keban ilçesindeki DSİ IX. Bölge Müdürlüğü Keban Su Ürünleri Şube Müdürlüğü'nden canlı olarak Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'ne getirildi ve 540 L hacmindeki 3 farklı fiberglas tanka eşit olarak yerleştirildi. Tanka yerleştirilmeden önce balıklar makroskopik olarak muayene edildi ve 30 dakika için 250 ppm formalinde banyo ettirildi. Tanklar denemeye başlamadan önce dezenfekte edildi. Tankların üstü balıkların kaçmasını önlemek amacıyla balık ağı kullanılarak örtüldü. Hava kompresörü yardımıyla tanklar sürekli havalandırıldı.

Canlı olarak getirilen ve makroskopik analizleri yapılan balıklar 540 L hacmindeki fiberglas tanklardan alınarak, 33 x 100 x 60 cm ebatlarında ve ayarlanabilen termostatlı ısıtıcılarla su sıcaklığı 23 ± 1 °C'ye ayarlanmış 9 adet cam akvaryuma (her bir tekrar için 3 akvaryum) yerleştirildi. Akvaryumlar hava kompresörü yardımıyla sürekli olarak havalandırıldı.

Çalışmada balıklara 750 mg oksitetrasiklin baza eşdeğer oksitetrasiklin hidroklorür uygulandı. Oksitetrasiklin veteriner ilaçları satan ticari bir firmadan (Medicavet) temin edildi. Oksitetrasiklinin kullanılan dozları Treves-Brown (2000)'a göre seçildi. Çalışma üç tekrarlı yürütüldü ve her bir tekrar için 90, toplamda ise 270 balık kullanıldı. Deneme 21 gün sürdü. Çalışma Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (Protokol No: 2018/41).

On beş günlük adaptasyon süresinden sonra aşağıdaki deneme grupları oluşturuldu.

K: Kontrol grubu;

D1: 50 mg/L konsantrasyonunda 48 saat süreyle banyo yoluyla oksitetrasiklin uygulanan grup;

D2: 75 mg/L konsantrasyonunda 48 saat süreyle banyo yoluyla oksitetrasiklin uygulanan grup.

Oksitetrasiklin uygulamasından sonraki 7., 14. ve 21. günlerde her bir tekrardan 10 balık alınarak 25 mg/L konsantrasyonundaki benzokain yardımıyla anestezi edildi (San ve Yonar, 2017). Anestezi altındaki balıkların pedüncül bölgesi insize edildi ve ardından kaudal venadan kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri serumlarının çıkarılması için antikoagülant içermeyen jelli tüplere dolduruldu. Serumların elde edilmesi için kan örnekleri 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

Kan örneklerinin alınmasını takiben balıkların tekrar makroskopik muayeneleri yapıldı. Daha sonra Arda vd. (2005)'in bildirdiği şekilde usulüne uygun olarak otopsi yapılan balıkların karaciğeri ayrılarak çıkarıldı. 0,5 gram olacak şekilde tartılan karaciğer örneklerinden homojenatlar hazırlandı. Bunun için karaciğer örnekleri %1,15'lik potasyum klorür (KCl) ile 1:10 oranında sulandırıldı ve daha sonra homojenize edildi. Homojenatların 3200 rpm'de +4 °C'de 10 dakika süreyle 50 ml'lik propilen tüplerdeki santrifüjünü takiben süpernatantlar alındı ve süpernatantlar enzim aktivitelerini ölçmek için kullanıldı (Mişe Yonar vd., 2014).

PON ve ARE aktiviteleri serum ve karaciğer örneklerinde spektrofotometrik olarak belirlendi. PON aktivitesini ölçmek için substrat olarak paraokson, ARE enzim aktivitesini ölçmek için ise fenilasetat kullanıldı. Enzim aktivitelerinin ölçülmesi için 100 µl substrat çözeltisi (2 mM paraokson + 2 mM koenzim CaCl₂) 850 µl Tris-HCl tamponu (100 mM, pH:8) ve 100 µl homjenat karıştırıldı. Absorbansta 1 dakika süresince meydana gelen değişim 37 °C'de 412 nm dalga boyunda okundu (Dubravka vd., 2001). Enzim aktivitelerini hesaplamak için hazırlanan standart grafikten faydalandı.

İstatistiksel analizler için SPSS 15.0 istatistik programından yararlanıldı. Grupların PON ve ARE aktiviteleri tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırıldı. Gruplar arasındaki farklılığın belirlenmesi için ise Least Significant Difference (LSD) testi kullanıldı. Bağımlı gruplarda (günler için) istatistiksel farklılığı ortaya çıkarabilmek amacıyla tekrarlı ölçümlerde varyans analizi uygulandı.

BULGULAR

Adaptasyon ve deneme süresince balıklarda ölüm gerçekleşmedi. Balıklarda çalışma boyunca klinik olarak herhangi bir bulguya rastlanmadı. Kan alımını takiben otopsi edilen balıkların yapılan klinik muayenesinde bir bulguya karşılaşılmadı. Araştırma süresince sıcaklık, oksijen düzeyi ve pH' da önemli değişiklikler gözlemlenmedi. Bu değerler sırasıyla 23 ± 1 °C, $7,1 \pm 0,1$ ve $8,07 \pm 0,18$ mg/L olarak belirlendi. Farklı konsantrasyonlarda oksitetrasiklin uygulanan grupların karaciğer PON aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla zamana bağlı olarak meydana gelen değişimler **Tablo 1**' de sunulmuştur.

Tablo 1. Karaciğer PON aktivitesindeki değişimler (ortalama \pm standart hata)

Table 1. Changes in the liver PON activity (mean \pm standard error)

| Doku | Gruplar | Günler | | |
|-----------------|---------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| | | 7. gün | 14. gün | 21. gün |
| Karaciğer (U/g) | K | 35,42 \pm 4,34 ^{b, A} | 36,07 \pm 3,76 ^{b, A} | 35,89 \pm 3,55 ^{b, A} |
| | D1 | 28,67 \pm 5,21 ^{a, A} | 31,04 \pm 5,21 ^{a, B} | 34,67 \pm 4,32 ^{ab, C} |
| | D2 | 27,09 \pm 5,08 ^{a, A} | 30,19 \pm 4,37 ^{a, B} | 33,72 \pm 4,11 ^{a, C} |

a,b,c,d Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir (p < 0,05). A,B,C,D Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir (p < 0,05). K: Kontrol; D1: 50 mg/L oksitetrasiklin; D2: 75 mg/L oksitetrasiklin.

Kontrol grubuna göre D1 ve D2 gruplarının karaciğer PON aktivitesinin 7. günde sırasıyla %19,05 ve %23,51 oranında azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu (p < 0,05). Çalışmanın 14. gününde kontrol grubuna göre D1 ve D2 gruplarında karaciğer PON aktivitesinin sırasıyla %13,94 ve %16,30 oranında azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi (p < 0,05). Denemenin 21. gününde D1 ve D2 grupları için karaciğer PON aktivitesinin kontrol grubuna göre sırasıyla %3,39 ve %6,04 oranında azaldığı gözlemlendi. Bu azalma kontrol grubuna göre D1 grubunda istatistiksel olarak önemsiz bulunurken (p > 0,05) D2 grubunda istatistiksel olarak önemli bulundu (p < 0,05).

D1 grubunda, çalışmanın 7. gününe kıyasla 14. ve 21. günlerde karaciğer PON aktivitesinin arttığı ve bu artışın sırasıyla %8,26 ve %20,98 düzeyinde gerçekleşerek istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu (p < 0,05). D1 grubunda 14. güne kıyasla 21. günde karaciğer PON aktivitesinin %3,62 arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi (p < 0,05). D2 grubunda da 7. gününe kıyasla 14. ve 21. günlerde karaciğer PON aktivitesinin sırasıyla %11,44 ve %24,47 düzeyinde arttığı, bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü (p < 0,05). D2 grubunda 21. günde karaciğer PON aktivitesinin 14. güne kıyasla %3,52 oranında arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı (p < 0,05).

Tablo 2. Serum PON aktivitesindeki değişimler (ortalama \pm standart hata)

Table 2. Changes in the serum PON activity (mean \pm standard error)

| Doku | Gruplar | Günler | | |
|--------------|---------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | | 7. gün | 14. gün | 21. gün |
| Serum (U/ml) | K | 33,85 \pm 2,79 ^{c, A} | 33,56 \pm 2,96 ^{c, A} | 34,10 \pm 3,05 ^{b, A} |
| | D1 | 25,39 \pm 3,17 ^{b, A} | 29,75 \pm 4,02 ^{b, B} | 32,20 \pm 2,13 ^{a, C} |
| | D2 | 21,66 \pm 3,52 ^{a, A} | 26,04 \pm 2,73 ^{a, B} | 31,84 \pm 3,22 ^{a, C} |

a,b,c,d Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir (p < 0,05). A,B,C,D Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir (p < 0,05). K: Kontrol; D1: 50 mg/L oksitetrasiklin; D2: 75 mg/L oksitetrasiklin.

Kontrol grubuna kıyasla farklı konsantrasyonlarda oksitetrasiklin uygulanan grupların serum PON aktivitesinde zamana bağlı olarak meydana gelen değişimler **Tablo 2**' de gösterilmiştir.

Denemenin 7. gününde kontrol grubuna kıyasla D1 ve D2 gruplarının serum PON aktivitesinin sırasıyla %24,99 ve %36,01 oranında azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu (p < 0,05). Çalışmanın 14. gününde kontrol grubunun serum PON aktivitesiyle kıyaslandığında D1 ve D2 grupları için serum PON aktivitesinin sırasıyla %11,35 ve %22,40 oranında azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi (p < 0,05). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında D1 ve D2 grupları için serum PON aktivitesinin 21. günde sırasıyla %5,57 ve %6,62 oranında azaldığı gözlemlendi. Bu azalma kontrol grubuna göre D1 ve D2 gruplarında istatistiksel olarak önemli bulundu (p < 0,05).

D1 grubunda, çalışmanın 7. gününe kıyasla 14. ve 21. günlerde serum PON aktivitesinin arttığı ve bu artışın sırasıyla %17,17 ve %26,82 düzeyinde gerçekleşerek istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü (p < 0,05). D1 grubunda 14. güne kıyasla 21. günde serum PON aktivitesinin %8,23 arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi (p < 0,05). D2 grubunda da 7. gününe kıyasla 14. ve 21. günlerde serum PON aktivitesinin sırasıyla %20,22 ve %46,99 düzeyinde arttığı, bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü (p < 0,05). D2 grubunda 21. günde serum PON aktivitesinin 14. güne kıyasla %22,27 oranında arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı (p < 0,05).

Farklı konsantrasyonlarda oksitetrasiklin uygulanan grupların karaciğer ARE aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla zamana bağlı olarak meydana gelen değişimler **Tablo 3**' de gösterilmiştir.

Tablo 3. Karaciğer ARE aktivitesindeki değişimler (ortalama \pm standart hata)

Table 3. Changes in the liver ARE activity (mean \pm standard error)

| Doku | Gruplar | Günler | | |
|-----------------|---------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | | 7. gün | 14. gün | 21. gün |
| Karaciğer (U/g) | K | 140,22 \pm 12,89 ^{c, A} | 143,08 \pm 10,76 ^{c, A} | 141,87 \pm 11,57 ^{b, A} |
| | D1 | 115,01 \pm 9,13 ^{b, A} | 124,43 \pm 10,76 ^{b, B} | 132,91 \pm 13,06 ^{a, C} |
| | D2 | 104,26 \pm 13,66 ^{a, A} | 118,14 \pm 10,75 ^{a, B} | 130,25 \pm 12,58 ^{a, C} |

a,b,c,d Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir (p < 0,05). A,B,C,D Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir (p < 0,05). K: Kontrol; D1: 50 mg/L oksitetrasiklin; D2: 75 mg/L oksitetrasiklin.

Çalışmanın 7. gününde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında D1 ve D2 gruplarının karaciğer ARE aktivitesinin sırasıyla %17,97 ve %25,64 oranında azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p < 0,05$). Çalışmanın 14. gününde kontrol grubunun karaciğer ARE aktivitesiyle kıyaslandığında D1 ve D2 gruplarının karaciğer ARE aktivitesinin sırasıyla %13,03 ve %17,43 oranında azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($p < 0,05$). D1 ve D2 grupları için karaciğer ARE aktivitesinin 21. günde kontrol grubuna göre sırasıyla %6,31 ve %8,19 oranında azaldığı gözlemlendi. Bu azalma kontrol grubuna göre D1 ve D2 gruplarının her ikisinde de istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0,05$).

D1 grubunda, çalışmanın 7. gününe kıyasla 14. ve 21. günlerde karaciğer ARE aktivitesinin arttığı ve bu artışın sırasıyla %8,19 ve %15,56 düzeyinde gerçekleşerek istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p < 0,05$). D1 grubunda 14. güne kıyasla 21. günde karaciğer ARE aktivitesinin %6,81 arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($p < 0,05$). D2 grubunda da 7. gününe kıyasla 14. ve 21. günlerde karaciğer PON aktivitesinin sırasıyla %13,31 ve %24,93 düzeyinde arttığı, bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü ($p < 0,05$). D2 grubunda 21. günde karaciğer ARE aktivitesinin 14. güne kıyasla %10,25 oranında arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p < 0,05$).

Farklı konsantrasyonlarda oksitetrasiklin uygulanan grupların serum ARE aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla zamana bağlı olarak meydana gelen değişimler Tablo 4' de gösterilmiştir.

Denemenin 7. gününde kontrol grubuna kıyasla D1 ve D2 gruplarında serum ARE aktivitesinin sırasıyla %16,88 ve %22,14 oranında azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü ($p < 0,05$). Çalışmanın 14. gününde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında serum ARE aktivitesinin D1 ve D2 grupları için sırasıyla %12,62 ve %13,52 oranında azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($p < 0,05$). D1 ve D2 grupları için 21. günde serum ARE aktivitesinin kontrol grubuna göre sırasıyla %5,70 ve %7,37 oranında azaldığı gözlemlendi. Bu azalma istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0,05$).

D1 grubunda, çalışmanın 7. gününe kıyasla 14. ve 21. günlerde serum ARE aktivitesinin arttığı ve bu artışın sırasıyla %6,58 ve %14,45 düzeyinde gerçekleşerek istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü ($p < 0,05$). D1 grubunda 14. güne kıyasla 21. günde serum ARE aktivitesinin %7,37 arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($p < 0,05$). D2 grubunda da 7. gününe kıyasla 14. ve 21. günlerde serum ARE aktivitesinin sırasıyla %12,60 ve %20,01 düzeyinde arttığı, bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu görüldü ($p < 0,05$). D2 grubunda 14. güne kıyasla 21. günde serum PON aktivitesinin %6,58 oranında arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p < 0,05$).

Tablo 4. Serum ARE aktivitesindeki değişimler (ortalama \pm standart hata)

Table 4. Changes in the serum ARE activity (mean \pm standard error)

| Doku | Gruplar | Günler | | |
|--------------|---------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | | 7. gün | 14. gün | 21. gün |
| Serum (U/ml) | K | 124,41 \pm 11,27 ^{c, A} | 126,13 \pm 10,41 ^{c, A} | 125,50 \pm 12,34 ^{b, A} |
| | D1 | 103,40 \pm 9,91 ^{b, A} | 110,21 \pm 13,02 ^{b, B} | 118,34 \pm 10,51 ^{a, C} |
| | D2 | 96,86 \pm 10,06 ^{a, A} | 109,07 \pm 8,37 ^{a, B} | 116,25 \pm 12,58 ^{a, C} |

^{a,b,c,d} Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

^{A,B,C,D} Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

K: Kontrol; D1: 50 mg/L oksitetrasiklin; D2: 75 mg/L oksitetrasiklin

TARTIŞMA

Pullu sazan, ülkemizde yetiştiriciliği yapılan ve de doğal ortamda geniş dağılım gösteren önemli bir balık türüdür ve laboratuvar ortamına kolayca adapte olabilmektedir. Bununla birlikte bu balık türü değişik koşullara kolayca uyum gösterebilmesi, yetiştirilme ve beslenmesindeki kolaylık, doğal sularda bolca bulunması, ekonomik değerlerinin yüksek olması gibi özellikleri nedeniyle *in vivo* çalışmalarda oldukça fazla kullanılmaktadır. Bu çalışmada da PON ve ARE enzim aktivitelerindeki değişimler kullanılarak oksitetrasiklinin etkilerinin ortaya çıkarılması amacıyla Cyprinidae familyasına ait pullu sazan (*Cyprinus carpio*) tercih edilmiştir.

Çalışma süresince hem kontrol hem de deneme grubu balıklarında ölüm olayı gözlemlenmemiştir. Balıkların yem alımlarında herhangi bir olumsuzluk görülmemiştir. Oksitetrasiklin uygulaması sırasında balıklarda klinik olarak herhangi bir bulguya rastlanmamış, bu balıkların rutin davranışlar sergilediği izlenmiştir. Bu bulgular uygulanan oksitetrasiklin dozlarının herhangi bir olumsuz etkiye sebep olmadığını, güvenilir bir şekilde belirtilen doz ve sürelerde balıklarda kullanılabileceğini göstermiştir. Fakat karaciğer ve serumda PON ve ARE aktivitesinde görülen değişiklikler bu dozların balıklarda toksik etkiler oluşturduğunu göstermektedir. Nitekim elde edilen sonuçlar bu bulguyu doğrular niteliktedir.

Bu çalışmada oksitetrasiklin uygulamasından sonra PON ve ARE aktivitesindeki değişimlerin belirlenmesi için karaciğer ve serum örnekleri kullanılmıştır. Balıklarda toksik maddelerin etkilerinin araştırıldığı çalışmaların çoğunda güçlü antioksidan aktivite göstermeleri ve toksik maddelerden en fazla bu organların etkilenmesi nedeniyle karaciğer ve kan dokusu seçilmektedir (Ritola vd. 2000). Diğer taraftan PON enzimi memelilerde karaciğerde sentezlenmekte, HDL' ye bağlı olarak serumda bulunmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada da doku olarak karaciğer ve serum seçilmiştir.

Balıklarda PON ve ARE enzimi aktivitesiyle ilgili birkaç çalışma yapılmıştır. Folly vd. (2001) PON aktivitesinin varlığını ve bu enziminin HDL ile ilişkisini *Piaractus mesopotamicus* türü balıklarda göstermişlerdir. Bastos vd. (2004) *Hypostomus punctatus*, *Piaractus mesopotamicus*, *Brycon cephalus* ve *Salminus brasiliensis* türü neotropikal balıklarda PON enzim aktivitelerini serumda sırasıyla 1,5, 6,1, 6,6 ve 35,2 nmol x min⁻¹ x ml⁻¹ olarak bulmuşlardır. Karataş ve Kocaman

(2012) normal ve albino gökkuşağı alabalıklarında serum PON aktivitesini kültür şartlarında yetiştirilenlerde daha yüksek tespit etmişlerdir. Bu farklılığın sebebi olarak da tür farklılığı, baskınlık ve büyüklük durumu gösterilmiştir. Aynı araştırmacılar başka bir çalışmada ise PON enzim aktivitesi ile PON/HDL oranını doğadan yakalananlara göre kültür altındaki kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*)'nda daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir (Karataş ve Kocaman, 2014). Antioksidan ve immunostimulan özelliklere sahip polenin uygulandığı gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) serum PON ve ARE aktivitesindeki değişimler araştırılmıştır (Yöntürk ve Yonar, 2018). 21 gün süreyle %1, %2 ve %4 oranında polen içeren yemlerin uygulandığı alabalıkların paraoksonaz ve arylesteraz aktivitelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel herhangi bir farklılık görülmemiştir. PON ve ARE enzim aktivitelerinin serum ve karaciğerde tespit edildiği bu çalışmada da her iki enzimin varlığı sazanlarda belirlenmiş, serum ve karaciğerde her iki enzim düzeyinin farklı olduğu saptanmış ve yine oksitetrasiklinin uygulanmasıyla bu iki enzim aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir.

Balıklar için toksik oldukları bilinen metallerin PON aktivitesine etkisini araştıran çalışmalar da mevcuttur ve bu çalışmalarda PON ve ARE aktivitesindeki değişiklikler incelenerek toksik maddelerin vücutta oluşturduğu negatif etkiler belirlenmeye çalışılmıştır. Beyaztaş vd. (2007) bakır, civa, kadmiyum ve kobalt metallerinin sazanlarda PON enzim aktivitesinde farklı oranlarda inhibisyona neden olduğunu bulmuşlardır. Sayın vd. (2012) tarafından *Scyliorhinus canicula* balıklarında gerçekleştirilen ve (Ni^{2+}), (Cd^{2+}), (Hg^{2+}) ve (Cu^{2+}) metallerinin kullanıldığı başka bir çalışmada, PON enzim aktivitesine bu metallerin inhibitör etkisi *in vitro* olarak kanıtlanmış, Cu^{2+} tarafından en güçlü inhibitör etkisinin oluşturulduğu belirlenmiştir. Ayrıca adı geçen araştırmacılar yaptıkları çalışmada PON enzimini saflaştırmış, serum PON total aktivitesini 11788,8 U/ml olarak spesifik aktiviteyi ise 344,701 olarak bulmuşlardır. Çinko sülfat ($ZnSO_4$) formundaki çinkonun kullanıldığı başka bir çalışmada da 10 gün süresince 5 ve 10 mg/L konsantrasyonlarındaki çinkonun *Capoeta capoeta*'da plazma PON1 aktivitesini düşürdüğü ve PON1 aktivitesinin metallere karşı çok duyarlı olduğu belirtilmiştir (Deveci vd., 2015). Benzer bir sonuç Yonar vd. (2012) tarafından gösterilmiş 28. gün sonunda 15, 30 ve 60 ppb konsantrasyonlarındaki kromun serum PON ve ARE aktivitesini sazanlarda (*C. carpio*) düşürdüğü belirlenmiştir. Oksitetrasiklinin farklı konsantrasyonlarının uygulandığı bu çalışmada da PON ve ARE enzim aktivitesinin balıklarda oksidatif strese neden olduğu bilinen oksitetrasiklin uygulamasıyla (Yonar vd., 2011; Yonar, 2012; Mişe Yonar vd., 2014) azaldığı görülmüştür.

Metallerin yanı sıra balıklarda PON veya ARE enzim aktivitesine bazı pestisitlerin etkisinin araştırıldığı çalışmalar da yapılmıştır. Örneğin; gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nda karbosulfanın mutajenik, genotoksik ve enzim inhibitör etkisi araştırılmıştır (Altınok vd., 2012). Sonuç olarak

birinci ayda her hafta, ikinci ayda ise 15 günde bir yapılan örnekleme sonucunda plazma PON aktivitesinin $12,01 \pm 1,65$ U/L ve $9,05 \pm 0,89$ U/L arasında değiştiği, PON aktivitesindeki inhibisyonun istatistiki olarak önemsiz olduğu, inhibisyonun 1. haftada %7,36, 8. haftada ise %16,67 şeklinde gerçekleştiği belirlenmiştir. Malathion kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise deneme başlangıcındaki PON aktivitesinin 0,25, 0,5 ve 1 mg/L konsantrasyonundaki malathion uygulamasıyla önemli oranda azaldığı fakat bu aktivitenin deneme sonunda kontrol grubuna yakın bir değer aldığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte malathion uygulamasının balıklarda strese neden olduğu ifade edilmiştir (Kılıç ve Yonar, 2017). Benzer bir şekilde bu çalışmada da 50 ve 75 mg/L konsantrasyonunda oksitetrasiklin verilen grupların karaciğer ve serum PON ve ARE aktivitesinde kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir azalma belirlenmiştir. Bu sonuç oksitetrasiklinin pullu sazanda strese neden olduğunu göstermektedir.

Oksitetrasiklinin balıklarda strese yol açtığını kanıtlayan farklı çalışmalarda yapılmıştır. Yonar vd. (2011), 14 gün boyunca 100 mg/kg balık dozunda oral yolla oksitetrasiklin uygulanan gökkuşağı alabalığında kan, karaciğer, böbrek, dalak ve kalp dokusunda oksidatif stresin bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeyinin arttığını ifade etmiştir. Oksidatif streste artış oksitetrasiklinin alabalığa 50 mg/L konsantrasyonunda 48 saat süreyle uygulandığı ve karaciğer, böbrek, dalak ve solungaç MDA düzeyinin yükseldiği çalışmada da görülmüştür (Mişe Yonar vd., 2014). Rat ve insanlar üzerinde son yıllarda yapılan araştırmalarda PON aktivitesiyle oksidatif stres arasında karşılıklı bir ilişki olduğu bulunmuştur (Aviram vd., 1999). Bu çalışmada da oksitetrasiklin uygulaması sonucunda PON ve ARE aktivitesindeki azalma uygulamanın oksidatif stresin artışına neden olduğunu göstermektedir. Bu durum birçok antibiyotik türünün uygulanması sırasında, hayvan deneylerinde ortaya çıkmaktadır.

Sonuç olarak; artan oksitetrasiklin konsantrasyonuna bağlı olarak PON ve ARE aktivitesinin denemenin ilk günlerinde azaldığı, denemenin 21. gününde bu enzimlerin aktivitelerinin artmasına rağmen yine de kontrol grubundan düşük olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç oksitetrasiklinin her iki konsantrasyonunun da *C. carpio*'nun serum ve karaciğerinde toksik etki oluşturduğunu dolayısıyla oksitetrasiklinin balıklarda strese sebep olduğunu göstermiştir. Ancak denemenin 21. gününde enzim aktivitelerinde belirlenen artış, oksitetrasiklinin yol açtığı oksidatif stresi vücudun fizyolojik olarak serbest radikalleri elemine etme çabası şeklinde açıklanabilir. Ancak PON ve ARE aktivitelerinin halen daha kontrol grubundan düşük olması bunun tam olarak başarılmadığını göstermektedir. Buna göre oksitetrasiklin ve diğer kemoterapötiklerin toksisitesini belirlemede PON ve ARE aktivitesinin ölçülmesi biyobelirteç olarak kabul edilebilir. Fakat farklı balık türlerinde, farklı süre ve konsantrasyonlarda oksitetrasiklin uygulamalarının sonuçlarına ihtiyaç olduğu da görülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma; Yüksek Mühendis Ufuk AKER' in yüksek lisans tezinden özetlenmiş ve Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)

Yönetim Birimi tarafından SÜF.18.04. nolu proje olarak desteklenmiştir.

KAYNAKÇA

- Aktaş, İ. (2016). Kilis keçilerinde geleneksel ve uzun etkili oksitetrasiklin müstahzarlarının farmakokinetiği. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Altınok I., Capkın, E. & Boran, H. (2012). Mutagenic, genotoxic and enzyme inhibitory effects of carbosulfan in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102, 61-67. DOI: [10.1016/j.pestbp.2011.10.011](https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.10.011)
- Arda, M., Seçer, S. & Sarıyüpeoğlu, M. (2005). Balık Hastalıkları. Ankara: Medisan Yayınevi.
- Aviram, M., Rosenbalt, M., Billecke, S., Erogul, J., Sorenson, R., Bisgaier, C.L., Newton, R.S. & La Du, B. (1999). Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 892-904. DOI: [10.1016/S0891-5849\(98\)00272-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00272-X)
- Azarsız, E. & Sönmez E.Y. (2000). Paraoksonaz ve klinik önemi. *Türk Biyokimya Dergisi*, 25, 109-119.
- Bastos, V.L.F.C., Alves, M.V., Bernardino, G., Ceccarelli, P.S. & Bastos, J.C. (2004). Paraoxonase Activity in Sera of Four Neotropical Fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72, 798-805. DOI: [10.1007/s00128-004-0315-2](https://doi.org/10.1007/s00128-004-0315-2)
- Beyaztaş, S., Türker, D., Sinan, S. & Arslan, O. (2007). *Cyprinus carpio* paraoksonaz enziminin bazı ağır metallerle inhibisyon etkisinin incelenmesi. 21. Ulusal Kimya Kongresi, 23-27 Ağustos, Malatya.
- Brander, G.C., Pugh, D.M. & Bywater, R.J. (1982). *Veterinary Applied Pharmacology and Therapeutics*. London: Bailliere Tindall.
- Deveci, H.A., Kaya, İ., Yılmaz, M. & Karapehlivan, M. (2015). Effect of zinc sulphate on the levels of plasma paraoxonase activity, total oxidant and high density lipoprotein of transcaucasian barb (*Capoeta capoeta* Guldenstaedt, 1773). *Fresenius Environmental Bulletin*, 24(9), 2732-2735.
- Dubravka, J., Milena, T., Branka, R., Vrea, S.R., Elsa, R. & Martin, B. (2001). Serum paraoxonase activities in the hemodialyzed uremic patients: Cohort study. *Clinical Science*, 42, 146-150.
- Folly, E., Bastos, V.L.C., Alves, M.V., Bastos, J.C. & Atella, G.C. (2001). A high density lipoprotein from *Piaractus mesopotamicus*, pacu, (Osteichthyes, Characidae), is associated with paraoxonase activity. *Biochimie*, 83, 945-951. DOI: [10.1016/S0300-9084\(01\)01342-6](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(01)01342-6)
- Gan, N., Smolen, A., Eckerson, W. & La Du B.N. (1991). Purification of human serum paraoxonase/arylesterase, Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metabolism and Disposition*, 19, 100-106.
- Gökçe, K. (2013). Karbazol β-laktam türevlerinin paraoksonaz enzimi üzerine etkilerinin araştırılması. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir.
- Gürsu, M.F. & Özdin, M. (2002). Sigara içenlerde serum paraoksonaz (PON1) aktiviteleri ile malondialdehit düzeylerinin araştırılması. *Fırat Tıp Dergisi*, 7, 732-737.
- Karataş, T. & Kocaman, E.M. (2012). Comparison of Paraoxonase Activity, Malondialdehyde and High-Density Lipoprotein Levels in Cultivated Normal and Albino Rainbow Trout Reared in the Same Conditions. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(1), 87-90. DOI: [10.9775/kvfd.2011.4971](https://doi.org/10.9775/kvfd.2011.4971)
- Karataş, T. & Kocaman, E.M. (2014). Susceptibility to oxidative damage in wild and cultured brook trout (*Salvelinus fontinalis* Mitchell, 1815). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 2(1), 180-183.
- Kayaalp, O. (1984). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Ulucan Matbaası.
- Kaya, S., Piriñçi, İ. & Bilgili, A. (1997). Veteriner Uygulamalı Farmakoloji. Ankara: Medisan Yayınevi.
- Kılıç, T. & Yonar, M.E. (2017). Malathionun pullu sazan (*Cyprinus carpio*)'da paraoksonaz ve arilesteraz enzim aktivitelerine etkisinin araştırılması. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 31(2), 87-92.
- Li, W.F., Costa, L.G. & Furlong, C.E. (1993). Serum paraoxonase status: A major factor in determining resistance to organophosphates. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 40, 337-346. DOI: [10.1080/15287399309531798](https://doi.org/10.1080/15287399309531798)
- Mackness, M.I., Arrol, S.I., Mackness, B. & Durrington, P.N. (1997). Allo-enzymes of paraoxonase and effectiveness of high density lipoproteins in protecting low density lipoprotein against lipid peroxidation. *Lancet*, 349, 851-852. DOI: [10.1016/S0140-6736\(05\)61755-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)61755-2)
- Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., Connelly, P.W. & Hegele, R.A. (1996). Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Current Opinion Lipidology*, 7, 69-76. DOI: [10.1097/00041433-199604000-00004](https://doi.org/10.1097/00041433-199604000-00004)
- Mackness, M.I., Walker, C.H. & Carson, L.A. (1987). Low 'A'-esterase activity in serum of patients with fish-eye disease. *Clinical Chemistry*, 3, 587-588. DOI: [10.1093/clinchem/33.4.587](https://doi.org/10.1093/clinchem/33.4.587)
- Mişe Yonar, S., Yonar, M.E., Yöntürk, Y. & Sarıyüpeoğlu, M. (2014). Oksitetrasiklinin Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)' nda Oksidatif Stres ve Bazı Antioksidan Parametrelere Etkisinin Araştırılması. *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 29(1), 37-45.
- Ritola, O., Lyytikäinen, T., Pylkkö, P., Mölsä, H. & Lindström-Seppä, P. (2000). Glutathione-dependent defence system and monooxygenase enzyme activities in Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.) exposed to ozone. *Aquaculture*, 185, 219-233. DOI: [10.1016/S0044-8486\(99\)00355-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00355-5)
- San, A. & Yonar, M.E. (2017). Determination of oxidative stress in scaly carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) exposed to deltamethrin in different water temperature. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 34(3), 281-286. DOI: [10.12714/egejfas.2017.34.3.06](https://doi.org/10.12714/egejfas.2017.34.3.06)
- Sayın, D., Türker Çakır, D., Gençer, N. & Arslan, O. (2012). Effects of some metals on paraoxonase activity from shark *Scyliorhinus canicula*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27(4), 595-598. DOI: [10.3109/14756366.2011.604320](https://doi.org/10.3109/14756366.2011.604320)
- Treves-Brown, K.M. (2000). *Applied Fish Pharmacology*, Netherland, Dordrecht: Kluwer Academic Publisher. DOI: [10.1007/978-94-017-0761-9](https://doi.org/10.1007/978-94-017-0761-9)
- 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. DOI: [10.1016/j.fsi.2011.05.019](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.05.019)
- 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](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.02.012)
- Yonar, M.E., Mişe Yonar, S., Çoban, M.Z. & Eroğlu, M. (2012). The effect of propolis on serum paraoxonase and arylesterase enzyme activities in *Cyprinus carpio* during chromium exposure. *Fresenius Environmental Bulletin*, 21(6), 1399-1402.
- Yöntürk, Y. & Yonar, M.E. (2018). Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)' nda arı polenin paraoksonaz ve arilesteraz enzim aktivitelerine etkisinin araştırılması. *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 30(2), 23-27.