

## ACTA BIOLOGICA TURCICA

© 1950-1978 Biologi, Türk Biologi Dergisi, Türk Biyoloji Dergisi, Acta Biologica  
E-ISSN: 2458-7893, http://www.actabiologicturcica.info

## The effects of different temperature on the antioxidant (GSH) levels of the kidney tissue of *Oreochromis niloticus*

Ahmet Turan ALADAĞ\*

Biyoloji Bölümü, Fen Edebiyat Fakültesi, Marmara Üniversitesi, Göztepe Yerleşkesi, İstanbul, Turkey.

\*Corresponding author: ahmetaladag@hotmail.com

**Abstract:** It is known that increasing seasonal environment temperature affects negatively on the physico-chemical structure of the living. In this study, changes in antioxidant levels were examined in renal tissues of *Oreochromis niloticus* at different temperatures (15 and 25°C). The antioxidant levels of glutathione (GSH) were analyzed by analysis with spectrophotometric methods at 24<sup>th</sup>, 48<sup>th</sup> and 72<sup>nd</sup> hours. GSH levels firstly decrease compared with control fish and then increased. This reduction was about 33% at 24 hours and then it was observed that GSH levels increased at the level to the control fish at the end of 72 hours. This study showed that GSH levels were sensitive and affected depending on the temperature in the kidney tissue of *O. niloticus* species.

**Keywords:** Glutathione, Antioxydant, Oxidative stress.

### Farklı su sıcaklıklarının *Oreochromis niloticus* türünde böbrek dokusundaki antioksidan (GSH) düzeyleri üzerine etkileri

**Özet:** Mevsimsel olarak değişiklik gösteren ortam sıcaklığının canlıların fiziko-kimyasal yapılarını olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Bu çalışmada *Oreochromis niloticus*'un böbrek dokusunda farklı sıcaklığa (15 ve 25°C) bağlı olarak antioksidan düzeyindeki değişimler incelenmiştir. Böbrek dokusundan 24., 48. ve 72'inci saatlerde alınan örneklerin spektrofotometrik yöntemlerle analizi yapılarak Glutatyon (GSH) düzeyi belirlenmiştir. Böbrek dokusundaki GSH düzeylerinin, kontrol grubu balıklarına göre süreye bağlı olarak önce azalma daha sonra da artış göstermiş olduğu belirlenmiştir. Bu azalma 24'üncü saatte yaklaşık %33 olarak gerçekleşmiş olup 72 saatin sonunda GSH düzeylerinin kontrol grubunun düzeyine yakın bir miktara geldiği gözlenmiştir. Sonuç olarak; *O. niloticus* türünde böbrek dokusunda GSH düzeylerinin sıcaklığa bağlı olarak etkilendiği ve hassas olduğu gözlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Glutatyon, Antioksidan, Oksidatif stress.

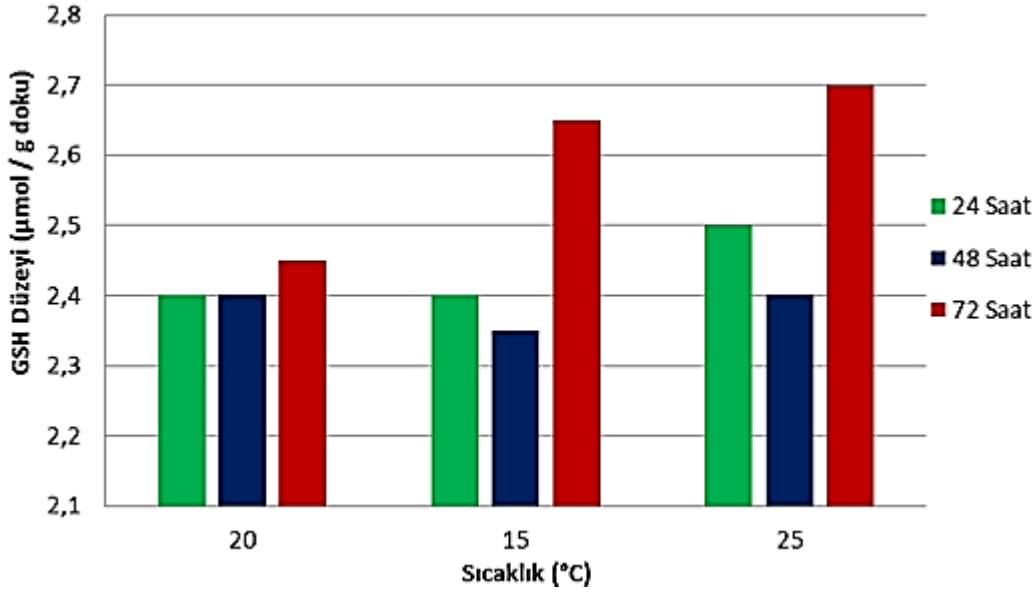
#### Giriş

Çevre şartlarında oluşan her değişim canlıların davranışları ve fizyolojileri üzerinde değişikliklere sebep olmaktadır. Bu değişiklikler ister sucul ister karasal organizmalar için olsun oksidatif stres ile ilişkilendirilebilir. Hassas organizmalar olan balıkların, çevresel şartlar nedeniyle oluşan streslere (sıcaklık, oksijen seviyesi, tuzluluk, pH, mevsimsel ritim değişiklikleri, metaller, pestisitler ve petrol türevleri) (Kaymak ve ark., 2014) karşı geliştirdikleri oksidatif stres adaptif yanıtları mevcuttur.

Sıcaklık değişimleri, su organizmalarının fizyolojik süreçleri üzerinde çok önemli etkilere sahiptir (Brett ve Groves, 1979). Ortam sıcaklığının artması ya da azalması oksidatif stresini tetikleyerek balıklarda metabolik

faaliyetleri etkilemektedir. Sucul ortam sıcaklığının yükselmesi ile Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) üretimi artar ve organizmalarda oksidatif strese karşı gelişen bazı savunma amaçlı adaptif yanıtlar görülür (Maderia ve ark., 2013; Kaymak ve ark., 2014). Morales ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada, bu yanıtların malondialdehit (MDA) ve doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluştuğunu ve ayrıca oksidatif stresin önemli bir göstergesi olduğunu bildirmişlerdir.

Balıklar oksidatif stresini ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutlarında birçok savunma mekanizması geliştirmişlerdir. Bu savunma mekanizmalarının, yapılarında A, E, C vitaminleri, selenyum ve melatonin gibi maddeler bulunan süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ile



**Figure 1.** Farklı ortam sıcaklığında *Oreochromis niloticus* böbrek dokusunda süreye bağlı GSH düzeyleri.

enzimatik olmayan glutatyondan oluştuğu bildirilmiştir. (Dautremepuits ve ark., 2003; Trenzado ve ark., 2006; Yonar ve Sakin, 2010; Harlıoğlu ve ark., 2011).

Çalışma için seçilen *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) balık türü Afrika kökenli bir tür olup, tropik ve subtropik iklim kuşaklarındaki tatlı sularda yaygın olarak hem yetiştiriciliği yapılmakta hem de besin olarak tüketilmektedir. *Oreochromis niloticus* balıklarının hayatta kalabilmeleri için gerekli olan çevresel sıcaklığın 11-42°C dereceleri arasında olduğu belirtilmiştir (FAO, 2012).

Ortam sıcaklığındaki ani değişimlerin, antioksidan Glutasyon (GSH) düzeyi üzerine olan etki çalışmaları sınırlı olduğundan, bu araştırmada sürekli 20°C sabit su sıcaklığında tutulan *O. niloticus* türü balıkların farklı ortam sıcaklıklarında (15 ve 25°C) 24., 48. ve 72. saatlerde böbrek dokusundaki GSH düzeylerindeki değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

### Materyal ve Metot

Çalışma materyali olan *O. niloticus* bireyleri, Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi yetiştirme havuzlarından alınmış ve 3 ay süre ile 40×100×40 cm boyutlarındaki 6 stok akvaryum içerisinde tutularak uygun boy-ağırlığa ulaşmaları ve laboratuvar koşullarına adaptasyonları sağlanmıştır. Deneylede kullanılan akvaryumlar merkezi havalandırma sistemi ile havalandırılmış ve balıklar günde 2 kez olmak üzere ağırlıklarının %1'i kadar pelet yem (Ticari Alabalık Yemi)

ile beslenmişlerdir. Çalışmada kullanılacak olan 60 adet balık, 3 aylık süre sonunda ortalama 17,52±0,21 cm boy ve 35,23±2,32 g ağırlığına ulaşan balıklardan rastgele seçilmiştir.

Deneylede 40×100×40 cm boyutlarında, 100'er litrelik 3 cam akvaryum kullanılmıştır ve her birinin içerisine 18 balık konmuştur. Su sıcaklığı birinci akvaryumda 15°C, ikinci akvaryumda 25°C ve üçüncü akvaryumda ise 20°C'ye ayarlanmış olup, 24-48 ve 72 saat süreyle üç farklı uygulama yapılmıştır. Üçüncü akvaryum (20°C) kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Her ortam sıcaklığı ve her süre için deneyler 3 tekrarlı olarak yürütülmüş ve her tekrarda 2 balık kullanılmıştır (3 tekrar×2 balık).

Deney süreleri bitiminde akvaryumdan kepçe ile alınan balıklar önce çeşme suyu ile iyice yıkanmış ve sonrasında kurutma kâğıdı ile yüzeylerinde bulunan su damlacıkları alınmıştır. Daha sonra balıkların böbrek dokusunun diseksiyonu yapılmıştır. Alınan doku örneklerinden homojenatların hazırlanması için örnekler 0,3 g olarak tartılmıştır. Süzgeç kağıtları arasında suyu alındıktan sonra %1,15'lik KCl içinde 1:10 oranında sulandırılarak homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar 50 ml'lik propilen tüplerde soğutmalı santrifüjde 3200 rpm'de +4°C'de 10 dakika süre ile santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alınmıştır (Yonar ve Sakin, 2010).

GSH tayini, Elman (1959) tarafından bildirilen metotla spektrofotometrik yöntemlerle analiz edilmiştir.

Deneylerden elde edilen verilerin istatistik analizleri “Regresyon Analizi” ve “Student-Newman Keul’s Test (SNK)” testleri uygulanarak yapılmıştır (Rohlf ve Sokal, 1969; Sokal ve Rohlf, 1969).

### Bulgular ve Tartışma

Deney süresi boyunca akvaryumlarda balık ölümleri olmamıştır. Ortama adaptasyon süresince balıklarda herhangi bir stres oluşumu olmamış ve beslenme ile ilgili olarak da bir problem saptanmamıştır.

Böbrek dokusundaki GSH düzeyleri kontrol grubu balıklarına göre süreye bağlı olarak önce azalmış daha sonra da artış göstermiştir. Bu azalma 24’üncü saatte yaklaşık %33 olarak hesaplanmıştır. Süre bitiminde 72’inci saatte ise GSH düzeylerinin kontrol grubu balıklarındaki düzeye yakın bir düzeye geldiği gözlenmiştir (Şekil 1; SNK;  $P < 0,05$ ). Daha önce maruz kalınan yüksek sıcaklık balıkta oksidatif strese sebep olmakta (Martinez-Alvarez ve ark., 2005), sürenin uzamasıyla da balığın antioksidan enzim aktivitesinde azalmaya sebep olmaktadır (An ve Choi, 2010). Bu azalma muhtemelen yüksek sıcaklıkta protein bozulması ya da enzimin denatüre olmasından kaynaklanabilir (Heise ve ark., 2006; An ve Choi, 2010).

Birçok çalışmada, omurgalı (Abele ve ark., 1998; 2002) ve omurgasız canlılarda (Keller ve ark., 2004) termal stres olarak adlandırılan çevre ısısının antioksidan düzeylerini etkilediği rapor edilmiştir. Çevresel sıcaklıktaki artışların birçok sucül organizmada oksidatif stres oluşumuna yol açtığı da bilinmektedir (Parihar ve Dubey, 1995; Heise ve ark., 2006; Bagnyukova ve ark., 2007). Çevresel sıcaklıktaki azalmalar ise oluşan oksidatif stres riskini düşürebilmektedir. Ancak çevresel sıcaklığın azalmasının balıklarda ve *Balanus balanoides*’te oksidatif strese neden olabileceği de belirlenmiştir (Niyogi ve ark., 2001; Malek ve ark., 2004). Abele ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada *Mia arenaria* türü midyenin dokularında farklı ortam sıcaklıklarında yüksek düzeyde oksidatif stres gözlemişlerdir. Bu çalışmada da benzer şekilde farklı su sıcaklıklığı değerlerinin *O. niloticus* türünde oksidatif strese neden olduğu gözlenmiştir.

Canlı hücrelerdeki birçok biyolojik proseste görev yapan, bol miktarda sülfidril içeren ve bir tiyol olan GSH, canlının ortam stres faktörlerine karşı savunmasında rol oynayan önemli bir antioksidandır (Viarengo ve ark., 1997). Bu çalışmada, böbrek dokusundaki GSH düzeylerinde değişimlerin olması, canlıların ortam

sıcaklığında oluşan değişimlere karşı ilk hücrel savunma yanıtı olarak düşünülmektedir (Sies, 1999). Yapılan birçok çalışmada ortamda bulunan kirleticilerin etkisi altındaki balıklarda GSH düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir (Brett ve Groves, 1979; Haspieler ve ark., 1994; Lushchak ve Bagnyukova, 2006).

Sıcaklık değişimleri, balıklarda SOD ve CAT gibi antioksidan aktivitelerini etkilemektedir (Martinez-Alvarez ve ark., 2005; Cao ve ark., 2010). Birçok canlı türünde oksidatif hasarı önlemek için, yüksek sıcaklık stresine yanıt olarak antioksidan enzim aktivitelerinin arttığı bilinmektedir (Martinez-Alvarez ve ark., 2005). Bu çalışmada da *O. niloticus* bireylerinde böbrek GSH düzeylerinin 72. saatte her iki sıcaklık faktöründe de artmış olduğu tespit edilmiştir. *Carassius auratus* türü üzerinde yapılan benzer bir çalışmada SOD aktiviteleri ısı strese maruz kaldığında indüklenmiş artan oksidatif strese yanıt vermiş olduğu rapor edilmiştir (Lushchak ve Bagnyukova, 2006). Bu yanıt enzimatik antioksidan kaybı protein sentezinde ya da ısı ile uyarılan antioksidan enzim bozuklukları ile ilişkili olabilir (Heise ve ark., 2006). Balıklar, ortamda yüksek sıcaklık stresi olduğu zaman antioksidan savunma sistemini onarabilme yeteneğine sahiptir (Martinez-Alvarez ve ark., 2005; Lushchak ve Bagnyukova., 2006).

Bu çalışma ile çevresel sıcaklık değişimlerinin *O. niloticus* böbrek dokusundaki GSH düzeylerini etkilediği tespit edilmiştir.

### Kaynaklar

- An M.I., Choi C.Y. 2010. Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: Effects on hemolymph and biochemical parameters. Comparative Biochemistry and Physiology - Part B, 155: 34-42.
- Abele D., Burlando B., Viarengo A., Pörtner H.O. 1998. Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. Comparative Biochemistry and Physiology - Part B, 120: 425-435
- Abele D., Heise K., Pörtner H.O., Puntarulo S. 2002. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. Journal of

- Experimental Biology, 205: 1831-1841.
- Bagnyukova T.V., Danyliv S.I., Zin'ko O.S., Lushchak V.I. 2007. Heat shock induces oxidative stress in rotan *Perccottus glenii* tissues. Journal of Thermal Biology, 32: 255-260.
- Brett J.R., Groves T.D.D. 1979. Physiological energetics. In: W.S. Hoar, D.J. Randall, J.R. Brett (Eds.). Fish Physiology. Bioenergetics and Growth, vol. 8. Academic Press, New York. pp: 279-352.
- Cao L., Huang W., Liu J., Yin X., Dou S. 2010. Accumulation and oxidative stress biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium exposure. Comparative Biochemistry and Physiology - Part C, 151: 386-392.
- Dautremepuits C., Betoulle S., Vernet G. 2003. Stimulation of antioxidant enzymes levels in carp (*Cyprinus carpio* L.) infected by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). Fish and Shellfish Immunology, 15: 467-471.
- Elman G.L. 1959. Tissue sulphydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics, 82: 70-77.
- FAO 2005-2012. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Oreochromis niloticus*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Rakocy, J. E. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome.
- Harlıoğlu M.M., Köprücü K., Yılmaz Ö., Çakmak M.N., Aksu Ö., Yonar S.M., Harlıoğlu A.G., Duran T.Ç., Aydın S., Özcan S. 2011. Kerevit Yemine Katılan n-3 Serisi Yağ Asitlerinin Pleopodal Yumurta, Hepatopankreas ve Kas Dokusunda Lipid Peroksidasyon ve Glutasyon Düzeylerine Etkisi. Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi / The Black Sea Journal of Science ISSN: 1309-4726 FABA 2011 Symposium Special Issues Yıl/Year:3. 2 (5): 8-16.
- Hasspieler B.M., Behar J.V., Di Giulio R.T. 1994. Glutathione-Dependent Defence in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) and Brown Bulhead (*Ameiurus nebulosus*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 28(1): 82-90.
- Heise K., Puntarulo S., Nikinmaa M., Abele D., Pörtner H.O. 2006. Oxidative stress during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus* L. Journal of Experimental Biology, 209: 353-363.
- Lushchak V.I., Bagnyukova T.V. 2006. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. Comparative Biochemistry and Physiology - Part C, 143: 36-41.
- Kaymak G., Akbulut C., Esmer H.E., Kayhan F.E., Yön N.D. 2014. Sucul Organizmalarda Çevresel Şartlara Karşı Geliştirilen Oksidatif Stres Mekanizmaları ve Adaptif Yanıtlar. Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 11; 4(4): 154-169.
- Keller M., Sommer A.M., Pörtner H.O., Abele D. 2004. Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes Journal of Experimental Biology, 207: 2529-2538.
- Maderia D., Narciso L., Cabral H.N., Vinagre C., Diniz M.S. 2013. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 166(2): 237-243.
- Martinez-Alvarez R.M., Morales A.E., Sanz A. 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 15: 75-88.
- Malek R.L., Sajadi H., Abraham J., Grundy M.A., Gerhard G.S. 2004. The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. Comparative Biochemistry and Physiology - Part C, 138: 363-373.
- Morales A.E., Pèrez-Jiménez A., Hidalgo M.C., Abellán E., Gabriel C.G. 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 139: 153-161.
- Niyogi S., Biswas S., Sarker S., Datta A.G. 2001. Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons. Marine Environmental Research, 52: 13-26.
- Parihar M.S., Dubey A.K. 1995. Lipid peroxidation and ascorbic acid status in respiratory organs of male and female freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to temperature increase. Comparative Biochemistry and Physiology - Part C, 112: 309-313.
- Rohlf J.F., Sokal R.R. 1969. Statistical Tables. W.H. Freeman and Company, San Francisco. 253p.
- Sies H. 1999. Glutathione and Its Role in Cellular

- Functionations. Free Radical Biology and Medicine, 27: 916-921.
- Sokal R.R., Rohlf J.F. 1969. "Biometry" W. H. And Freeman and Company, San Francisco. 776p.
- Trenzado C., Carmen H.M., Gallego M.G., Morales A.E., Furne M., Domezain A., Domezain J. Sanz A. 2006. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. Aquaculture, 254: 758-767.
- Viarengo A., Bettella E., Fabri R., Burlando B., Lafaurie M. 1997. Heavy metal inhibition of EROD activity in liver microsomes from the bass *dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: role of GSH in the reduction of heavy metal effects. Marine Environmental Research, 44(1): 1-11.
- Yonar S.M. ve Sakin F. 2010. Likopenin Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792)'nda Oksidatif Stres ve Bazı Antioksidan Parametreler Üzerine Etkisinin Araştırılması. Ecological Life sciences, 5(3): 241-249.