

Linuron Uygulanan Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Yavrularında Lipid Peroksidasyon ve Bazı Antioksidan Parametrelerdeki Değişimlerin Araştırılması

*M. Enis YONAR¹ Muammer KIRICI² Ünal İSPİR¹

¹Fırat Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Hastalıklar Bilim Dalı, 23119, Elazığ.

²Bingöl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Su Ürünleri Bölümü, Bingöl.

meyonar@gmail.com

(Geliş/Received: 20.03.2012; Kabul/Accepted: 08.05.2012)

Özet

Bu çalışmada linuron uygulanan yavru gökkuşığı alabalıklarında oksidatif stres ve bazı antioksidan parametrelerdeki değişimler araştırıldı. Linuronun farklı konsantrasyonları balıklara 96 saat süreyle uygulandı. Uygulama süresince alınan örneklerde malondialdehit (MDA) ve redükte glutasyon (GSH) düzeyleri ile katalaz (CAT) aktivitesindeki değişimler araştırıldı. Linuron uygulamasıyla MDA düzeyinin önemli oranda arttığı ($p < 0,05$), CAT aktivitesi ile GSH seviyesinin ise azaldığı belirlendi ($p < 0,05$). Sonuçta linuronun balıklarda oksidan/antioksidan dengesi bozarak oksidatif strese neden olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Linuron, Pestisit, Oksidatif stres, Lipit peroksidasyon, Antioksidan sistem.

The Investigation of Changes in Lipid Peroxidation and Some Antioxidant Parameters in Fry Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to Linuron

Abstract

In this study, changes in oxidative stress and some antioxidant parameters in fry rainbow trout applied linuron were investigated. Fish were exposed to different concentrations of linuron for 96 hours. Changes in malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) levels and catalase (CAT) activity were investigated in samples taken during the experiment. Results obtained showed that linuron significantly ($p < 0,05$) increased the level of MDA. The level of GSH and CAT activity were significantly ($p < 0,05$) reduced in rainbow trout fry exposed to linuron. Linuron was found to cause oxidative stress by disturbing oxidant/antioxidant balance.

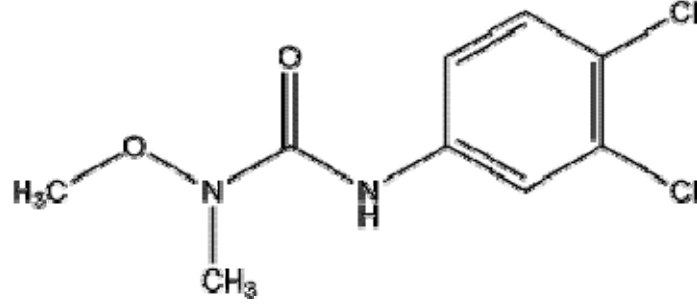
Keywords: Linuron, Pesticide, Oxidative stress, Lipid peroxidation, Antioxidant system.

1. Giriş

Pestisitler genellikle daha fazla ürün elde etmek amacıyla tarım ürünlerine zarar veren böceklerin ve hastalık etkeni olan çeşitli vektörlerin kontrolünde kullanılan bileşiklerdir [1]. Pestisitlerin tarım alanlarındaki gelişigüzel kullanımları sonucunda bozulan ekolojik denge sebebiyle, ticari önemleri büyük olan balıkları da içine alan birçok hedef dışı organizma zarara uğramaktadır [2]. Pestisitler yağmur ve drenaj suları, yüzey akışları ve sulama suları yoluyla, su kanallarında yaşayan bitkilere karşı kullanılmasıyla ve sulara yapılan direkt uygulamalar sonucunda sulara karışmakta ve

balıkları etkilemektedir. Balıklarda toplu ölümlere neden olabileceği gibi büyümelerinde azalma, hastalıklara karşı duyarlı hale gelme gibi sonuçlar doğurarak strese yol açmakta ve balık popülasyonlarını olumsuz etkilemektedir. Ayrıca pestisitler balık vücudunda birikerek insanlara kadar ulaşabilmektedirler [3,4].

$C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$ kimyasal formülüne sahip olan linuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methylurea) bir herbisit olup, tarımsal alanda geniş şekilde kullanılmakta ve etkisini fotosentezi engelleyerek göstermektedir. Akuatik habitatlarda $1 \mu l L^{-1}$ konsantrasyonlara kadar bulunabilmektedir [5]. Linuronun kimyasal yapısı Şekil 1' de gösterilmiştir.



Şekil 1. Linuronun kimyasal yapısı

Lipid peroksidasyon, membranda bulunan doymamış yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehytler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Lipidlerin oksidasyonu sonucu lipid peroksil radikali, lipid alkoksil radikali, alkil radikali, lipid aldehid gibi peroksidasyon ürünleri meydana gelir. Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak aktif olan aldehidler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından difuze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünü malondialdehit (MDA)' tir. Oluşan MDA hücre membranlarında iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiyobarbitürik asitle ölçülebilen MDA lipid peroksid seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir [6,7].

Organizmalar oluşan serbest oksijen radikallerinin hasarına karşı endojen koruyucu antioksidan savunma sistemlerine sahiptirler. Bütün aerobik organizmalar gibi balıklarda da oksidatif stresi ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri olarak bilinirler ve enzimatik karakterdeki süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ile enzimatik olmayan redükte glutatyon (GSH), A,

E, C vitaminleri, selenyum ve melatonin gibi maddelerden oluşurlar [8,9].

Bu çalışmada farklı linuron konsantrasyonlarının etkisinde kalan gökkuşuğu alabalığı yavrularında, MDA ve GSH düzeyleri ile CAT aktivitesinde oluşan değişimler ölçülerek meydana gelen oksidatif stresin irdelenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

Araştırmanın uygulama kısmı Bingöl Üniversitesi Ziraat Fakültesi' nde, laboratuvar bölümü ise Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi' nde gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan ortalama 0,5 g ağırlığındaki yavru gökkuşuğu alabalıkları, yerel bir işletmeden temin edilerek daha önceden hazırlanan 50 litre hacmindeki 4 farklı akvaryuma her birinde 20 balık olacak şekilde yerleştirildi. Balıklar deneye başlamadan önce bir hafta süreyle bu ortama adapte edildi. Çalışma iki tekrarlı olarak yürütüldü (her bir tekrar için 80, toplamda 160 balık). Linuronun ticari bir formülasyonu (Afolon dispersion, 450 g/L linuron) araştırmada kullanıldı. Linuronun stok solüsyonları denemenin yürütüldüğü akvaryum suyunda çözülerek hazırlandı ve bu solüsyonlar deneysel konsantrasyonların elde edilmesinde kullanıldı.

Akvaryumlardan biri kontrol grubu (K) olarak seçilirken diğer üç akvaryuma 1 µL (D1), 2 µL (D2) ve 4 µL (D3) konsantrasyonlarında linuron 96 saat süreyle uygulandı. Akvaryumlardan her 24 saate bir 5 balık bütün halinde alındı. Böylece 24., 48., 72. ve 96. saatlerde örnekleme yapıldı. Alınan örnekler folyolara sarıldı ve - 20 °C de saklandı. Deneme süresince balıklara yemleme yapılmadı. Test solüsyonları her gün yenilendi. Bu süre

içerisinde balıklarda herhangi bir ölüm olayı gözlenmedi. Çalışma süresince su sıcaklığı $14 \pm 2^\circ\text{C}$, çözülmüş oksijen düzeyi $8.1 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$ ve pH 7.1 ± 0.4 olarak ölçüldü.

Homojenatların hazırlanması için örnekler serum fizyolojik (% 0,09 NaCl) ile yıkandı. İki süzgeç kağıdı arasında suyu alındıktan sonra %1.15'lik KCl içinde 1:10 oranında sulandırılarak homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar 50 ml'lik propilen tüplerde soğutmalı santrifüjde 3200 rpm'de $+4^\circ\text{C}$ 'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alındı. Alınan örneklerin MDA düzeylerinde meydana gelen değişimler Placer ve diğ. [10]'den modifiye edilen yöntemle göre spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kan ve dokulardaki CAT aktivitesi Aebi [11]'e göre tayin edildi. Protein tayini ise Lowry [12]'nin bildirdiği metoda göre belirlendi. GSH düzeyi Elman [13] tarafından bildirilen metotla yapıldı.

Denemede elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri SPSS 10 istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol ve deneme grubu balıklarının incelenen parametrelerinde meydana gelen değişimlerin istatistiksel analizi

varyans ve Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlendi.

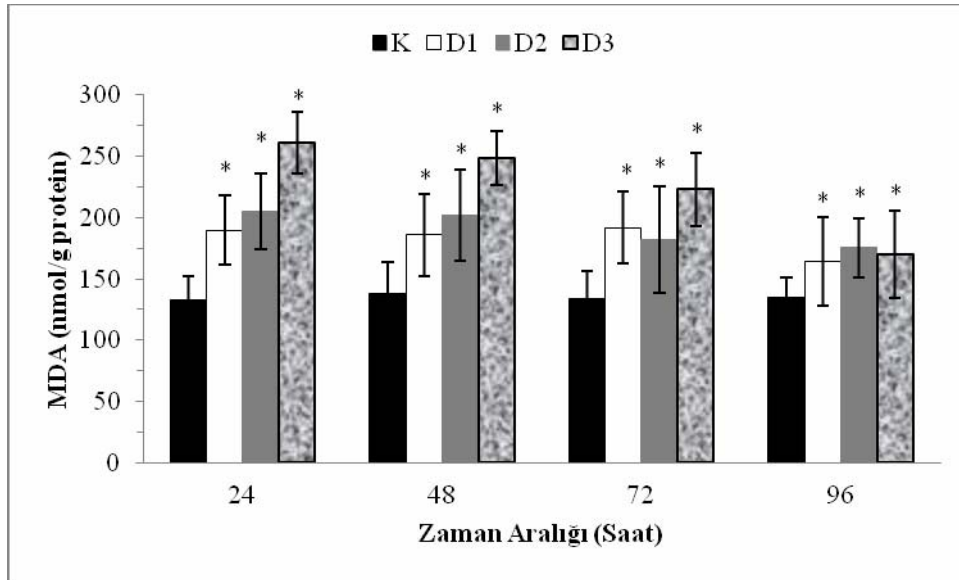
3. Bulgular

Kontrol grubuna göre deneme grubu balıklarının MDA ve GSH düzeyi ile CAT aktivitesindeki değişimler Şekil 2, 3 ve 4' de verilmiştir.

MDA düzeyi 24., 48., 72. ve 96. saat sonunda kontrol grubundan istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p < 0,05$).

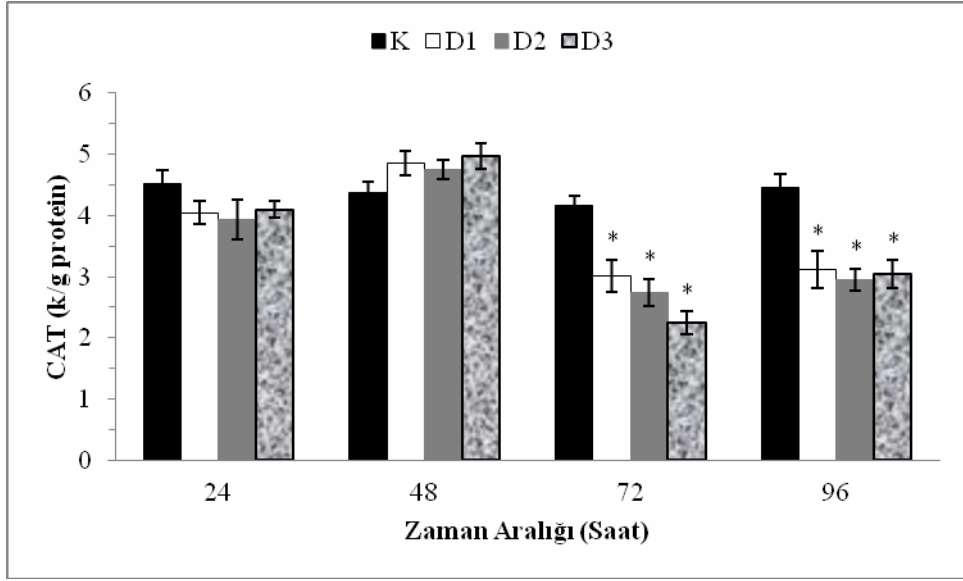
Kontrol grubu ile deneme gruplarının CAT aktiviteleri karşılaştırıldığında 24. ve 48. saatte CAT aktivitesinde gözlemlenen değişimlerin istatistiksel olarak herhangi bir farklılık göstermediği ($p > 0,05$) fakat 72. ve 96. saatte bu aktivitede belirlenen azalmanın önemli olduğu tespit edildi ($p < 0,05$).

Uygulama süresince her üç deneme grubunda da GSH düzeyinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli oranda azaldığı saptandı ($p < 0,05$).

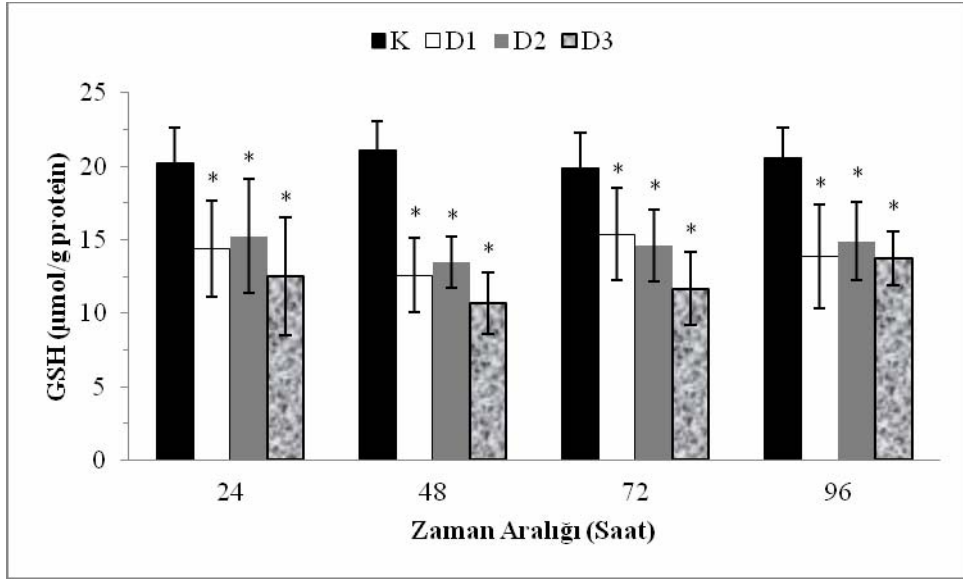


Şekil 2. Kontrol ve deneme grubu balıklarının MDA düzeyindeki değişimler.

*: Kontrol grubundan farkı göstermektedir ($p < 0,05$).



Şekil 3. Kontrol ve deneme grubu balıklarının CAT aktivitesindeki değişimler.
*: Kontrol grubundan farkı göstermektedir (p < 0,05).



Şekil 4. Kontrol ve deneme grubu balıklarının GSH düzeyindeki değişimler.
*: Kontrol grubundan farkı göstermektedir (p < 0,05).

4. Tartışma ve Sonuç

Oksidatif stres, oksidan ve antioksidan denge arasındaki değişiklikler sonucunda meydana gelmekte ve reaktif oksijen türleri lehindeki artışlar oksidatif hasar olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller yüksek aktivitelerinden dolayı hücre zarında bulunan doymamış yağ asitleri ile etkileşerek lipid

peroksidasyonu başlatabilmektedir. Oluşan lipid peroksitler kolaylıkla yıkılarak başta MDA olmak üzere birçok sekonder ürünler meydana getirebilmektedir [14-17].

Pestisitler serbest radikal oluşumuna yol açarak veya serbest radikalleri inhibe eden antioksidan enzimleri etkileyerek oksidatif strese neden olmaktadır [18]. Lipid peroksidasyon pestisitlerin neden olduğu toksik etkilerden

biridir [19]. Farklı araştırmacılar tarafından yürütülen çalışmalarda herbisitlerin balıklarda oksidatif stres oluşturduğu ifade edilmiştir. Örneğin; Özcan Oruç ve diğ. [19] 2,4-D ve azinophosmethyl' in tilapia ve sazanların farklı dokularında lipid peroksidasyon düzeyini arttırdığını ifade etmişlerdir. Miron ve diğ., [20] ise clomazone, quinclorac ve metsulfuron methyl herbisitlerinin balıklarda oksidatif strese yol açtığını belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise linuron uygulanan balıklarda MDA düzeyinin önemli düzeyde arttığı dolayısıyla balıklarda oksidatif strese neden olduğu belirlenmiştir.

CAT oksidatif strese karşı savunmada antioksidan sistemin öncelikli bir komponentidir. CAT ($H_2O_2:H_2O_2$ oksidoredüktaz, EC 1.11.1.6) yapısında 4 tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Görevi H_2O_2 'i oksijen ve suya parçalamaktır [11]. Önemli bir antioksidan enzim olan CAT pestisitlerin toksik etkilerine karşı farklı reaksiyonlar gösterebilmektedir [18]. Moraes ve diğ. [21] clomazone ve propanil herbisitlerinin etkisi altındaki balıkların karaciğer dokusunda CAT aktivitesinin arttığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde, Pereira Maduenho ve Martinez [22] de clomazone uygulanan balıkların karaciğerinde CAT aktivitesinin yükseldiğini saptamışlardır. Diğer taraftan Crestani ve diğ. [23], clomazone maruz

kalan balıklarda ise CAT aktivitesinin azaldığını ifade etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre de uygulamanın 72. ve 96. saatlerinde CAT aktivitesinde önemli bir azalma tespit edilmiştir.

GSH, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan, endojen ve enzimatik olmayan, çok önemli tripeptit karakterinde bir antioksidandır. Ayrıca protein yapısındaki sülfhidril gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu engellemektedir [24]. Yavru gökkuşığı alabalıklarının linuronun farklı konsantrasyonlarının etkisinde bırakıldığı bu çalışmada GSH düzeyi uygulama süresince kontrol grubundan düşük bulunmuştur. Modesto ve Martinez. [25] ise bir herbisit olan Roundup uygulanan balıklarda redükte glutatyon düzeyinin uygulamanın 6. saati ile 24. saatinde azaldığını fakat 96. saatinde ise düştüğünü belirlemişlerdir.

Yapılan bu araştırmanın sonuçları bir bütün olarak değerlendirildiğinde linuronun yavru gökkuşığı alabalıklarında CAT aktivitesi ile GSH düzeyini düşürdüğü MDA düzeyini ise arttırdığı, oksidan/antioksidan dengeyi bozarak oksidatif strese neden olduğu sonucuna varılmıştır.

5. Kaynaklar

1. Abdollahi, M., Mostafalou, S., Pournourmohammadi, S., Shadnia, S. (2004). Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comp. Biochem. Phys. C*, **137**, 29-34.
2. Oruç, E.Ö. and Üner, N. (1999). Effects of 2,4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*. *Environ. Pollut.*, **105**, 267-272.
3. Atamanalp, M. and Yanık, T. (2001). Pestisitlerin Cyprinidae'lere toksik etkileri. *EÜ Su Ürün. Derg.*, **18**, 555-563.
4. Karasu Benli, A.Ç. and Gülen, Z. (2009). Fenitrothion'un etkisinde bırakılan tilapia'da (*Oreochromis niloticus* L.) sekonder stres indikatörleri hematokrit ve plazma glukoz seviyesinin değişimi. *YYÜ Tar. Bil. Derg.*, **19**, 19-22.
5. Crago, J. and Klaper, R. (2012). A mixture of an environmentally realistic concentration of a phthalate and herbicide reduces testosterone in male fathead minnow (*Pimephales promelas*) through a novel mechanism of action. *Aquat. Toxicol.*, **110-111**, 74-83.
6. Yılmaz, S. and Bahçecioğlu, I.H. (2000). Karbontetraklorür ile siroz oluşturulmuş ratlarda lipid peroksidasyonu, antioksidant enzim ve pirüvat kinaz aktiviteleri. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **24**, 25-28
7. Benzer, F. and Temizer OZAN, S. (2003). Fasciola hepatica ile enfekte koyunlarda lipid peroksidasyonu, antioksidant enzimler ve nitrik oksit düzeyleri. *Turk J Vet Anim Sci.*, **27**, 657-661
8. Dautremepuits, C., Betoulle, S. and Vernet, G. (2003). Stimulation of antioxidant enzymes levels in carp (*Cyprinus carpio* L.) infected by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Fish Shellfish Immun.*, **15**, 467-471.
9. Trenzado, C., Carmen H.M., Gallego, M.G., Morales, A.E., Furne, M., Domezain, A., Domezain, J. and Sanz, A. (2006). Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon

- Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture*, **254**, 758-767.
10. Placer, Z.A., Cushman, L. and Johnson, B.C. (1966). Estimation of products of lipid peroxidation (Malonyl dialdehyde) in biological fluids. *Anal. Biochem.*, **16**, 359-364.
 11. Aebi, H. (1984). Catalase. *In vitro. Method Enzymol.*, **105**, 121-126.
 12. Lowry, O.H., Rosenberough, N.J., Farr, A.L. and Randal, R.J. (1951). Protein measurement with folinphenol reagent. *J. Biochem.*, **193**, 265-275.
 13. Elman, G.L. (1959). Tissue sulphhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77.
 14. Bird, R.P. and Draper, H.H. (1984). Comparative studies of different methods of malondialdehyde determination. *Methods Enzymol.*, **105**, 299-305.
 15. Jain, S.K. (1988). Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **937**, 205-210.
 16. Bandyopadhyay, U., Das, D. and Banerjee, R.K. (1999). Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr. Sci.*, **77**, 658-666.
 17. Ateşşahin, A., Yılmaz, S., Karahan, İ., Pirinççi, İ. and Taşdemir, B. (2005). The effects of vitamin E and selenium on cypermethrin-induced oxidative stress in rats. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **29**, 385-391.
 18. Özcan Oruç, E. and Usta, D. (2007). Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environ. Toxicol. Phar.*, **23**, 48-55.
 19. Özcan Oruç, E., Sevgiler, Y. and Uner, N. (2004). Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comp. Biochem. Phys. C*, **137**, 43-51.
 20. Miron, D., Crestani, M., Schetinger, R.M., Morsch, M.V., Baldisserotto, B., Tierno, A.M., Moraes, G. and Vieira, P.L.V. (2005). Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **61**, 398-403.
 21. Moraes, B.S., Loro, V.L., Glusczak, L., Pretto, A., Menezes, C., Marchezan, E. and Machado, S.O. (2007). Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere*, **68**, 1597-1601.
 22. Pereira Maduenho, L. and Martinez, C.B.R. (2008). Acute effects of diflufenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. C*, **148**, 265-275.
 23. Crestani, M., Menezes, C., Glusczak, L., dos Miron, S.D., Lazzari, R., Duarte, F.M., Morsch, M.V., Pippi, L.A. and Vieira, P.V. (2006). Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **65**, 48-55.
 24. Hayes, J.D. and McLellan, L.I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.*, **31**, 273-300.
 25. Modesto, K.A. and Martinez, C.B.R. (2010). Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, **78**, 294-299.