



Enfekte Gökkuşığı Alabalıklarının Böbrek Dokusu Kolinergik Sistem Enzimlerinin Değişimi

Aslı Çilingir Yeltekin^{1*}

^{1*} Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Van, Türkiye, (ORCID: 0000-0003-0071-7434), aslicilingir@yyu.edu.tr

(İlk Geliş Tarihi Aralık 2020 ve Kabul Tarihi Ocak 2021)

(DOI: 10.31590/ejosat.842539)

ATIF/REFERENCE: Çilingir Yeltekin, A. (2021). Enfekte Gökkuşığı Alabalıklarının Böbrek Dokusu Kolinergik Sistem Enzimlerinin Değişimi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (22), 258-262.

Öz

Besin maddeleri arasında su ürünlerinin önemi her geçen gün artmakta ve buna bağlı olarak da balık yetiştiriciliği hızla gelişmektedir. Balık yetiştiriciliğinde artan üretime paralel olarak hastalık problemleri de ortaya çıkmaktadır. Yüksek stoklama yoğunluğu, bakteriyel hastalıkların yaygın olarak görülmesine ve bu durumda balık metabolizmasında bozulmalara sebep olmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada; alabalık çiftliklerinde enfeksiyon oluşturan başlıca bakteriyel ajanların bulunduğu gökkuşığı alabalıkları tespit edilmiş ve PCR ile bu bakteri türleri (*Staphylococcus epidermidis*, *Lactococcus garvieae* ve *Bacillus subtilis*) belirlenmiştir. Çalışmada bakteri ile enfekte oldukları belirlenen alabalıkların böbrek dokularında kolinergik sistemin santral ve periferik sinir sistemi hücreleri arasında uyarıların taşınmasında görevli Asetilkolin esteraz (AChE) ve Bütirikolin esteraz (BChE) enzim düzeyleri araştırılmış olup, sağlıklı balıklar ile karşılaştırılarak belirlenen değişimler değerlendirilmiştir. Her üç bakteri ile enfekte olan alabalıkların kolinergik sistemin enzim seviyelerinin kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir (p<0.005).

Anahtar Kelimeler: AChE, Bakteri, BChE.

Kidney Tissue of Infected Rainbow Trout Changes in Cholinergic System Enzymes

Abstract

The importance of seafood among nutrients is increasing day by day and fish farming is developing accordingly. Disease problems arise in parallel with the increasing production in fish farming. High stocking density causes widespread bacterial diseases and thus impairment in fish metabolism. Therefore, in this study; Rainbow trout containing major bacterial agents causing infection in trout farms in our province were identified and these bacterial species (*Staphylococcus epidermidis*, *Lactococcus garvieae* ve *Bacillus subtilis*) were determined by PCR. It was investigated how Acetylcholine esterase (AChE) and Butyrylcholine esterase (BChE) enzyme levels in the kidney tissues of the trout determined to be bacterial in the cholinergic system to carry the impulses between central and peripheral nervous system cells compared to healthy fish. It was determined that the enzyme levels of the cholinergic system decreased in all three types of bacteria compared to the control group (p <0.005).

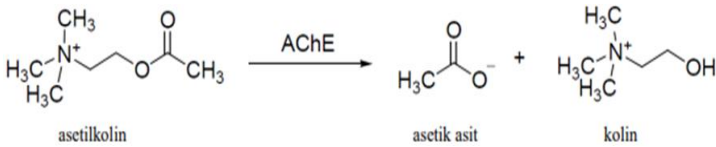
Keywords: AChE, Bacteria, BChE.

* Sorumlu Yazar: aslicilingir@yyu.edu.tr

1. Giriş

Nüfusun hızla artması besin üretiminin de hızla gelişen bir endüstri dalı olmasına sebep olmuştur. Su ürünleri alanında da artan bu üretim endüstriyel bir sanayi dalı olarak yoğun üretim yapan çiftliklere dönüşmüştür. Bunun sonucu olarak yoğun balık yetiştiriciliği yapılan çiftliklerde enfeksiyona sebep olan bakteriyel hastalıkların görülme sıklığı artmıştır. Özellikle zoonoz bakteri türleri ile enfeksiyon durumu insan sağlığı açısından ayrıca bir önem arz etmektedir. Balık üreticileri açısından da bakteriyel enfeksiyonlar büyük ekonomik önem arz etmektedir (Aydın, 2009).

Canlı dokularında bakteriyel enfeksiyonlar hem gelişmede gecikmeye hemde bağışıklık sisteminde, savunma mekanizmalarında ve enzim sistemlerinde olumsuz etkilere sebep olmaktadır (Aydın, 2009). Enzimler, çoğunluğu protein yapısında olan ve canlılardaki biyokimyasal tepkimeleri gerçekleştiren biyokatalizörlerdir. Enzimler reaksiyonların hızlarını artırmalarına ilaveten hücrelerde metabolik yollar için önemli birçok reaksiyonun hızını düzenlerler. Merkezi kolinerjik sistem, hücre gövdelerinin ve dendritlerin karmaşık bir bileşendir. Hayvan kolinesterazları, kolinerjik ve kolinerjik olmayan dokularda, ayrıca plazma ve diğer vücut sıvılarında bulunan yaygın enzimlerdir (Massoulié ve ark., 1992; Chatonnet ve Lockridge, 1989; Yeltekin ve ark. 2018). Kolinasetiltransferaz (ChAT), asetilkolin (ACh), kolinesterazlar (Asetilkolinesteraz (AChE E.C. 3.1.1.7) ve butiril kolinesteraz (BChE E.C. 3.1.1.8)), kolinerjik reseptörler (muskarinik reseptörler (MR) ve nikotinik reseptörler (NR)) kolinerjik sistemin bileşenleridir. Bu enzimler substrat özgüllüklerine, aşırı substrattaki davranışlarına ve inhibitörlere duyarlılıklarına göre ayrılmışlardır. AChE, nörotransmitter asetilkolini (ACh) kolinerjik sinapslarda ve nöromusküler sinapslarda hızla koline ve asetata hidrolize eden ve böylece kolinerjik sinir iletimde önemli bir rol oynayan, sinir sisteminin en etkili enzimlerinden biridir (Şekil 1). AChE, asetilkolini diğer kolinörlerden daha hızlı hidrolize eder ve butiril kolin üzerinde daha az etkindir. Aksine, BChE tercihen butiril kolin üzerine etki eder, fakat aynı zamanda asetilkolin'i hidrolize eder (Chatonnet ve Lockridge, 1989; Ekholm, 2001). AChE'nin aşırı substrat tarafından inhibe edilmesi, onu BChE'den ayıran temel özelliklerden biridir. BChE substratı aşırı substratta aktivasyon sergilemektedir. ACh'nin AChE tarafından hidrolizi, asetilasyon ve deasetilasyon işlemlerinin dahil olduğu bir reaksiyon sonucunda oluşmaktadır (Tougu, 2001).



Şekil 1. Asetilkolinin asetilkolinesteraz tarafından hidrolizi

Çeşitli in vivo ve in vitro çalışmalar AChE enziminin çeşitli morfolojik süreçlerde, sinir sistemindeki hücre farklılaşması ve sinaptojenezde, hücre adezyonunda ve göçünde, apoptotik yollarda etkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, Farklı bakteriler ile enfekte olan *Oncorhynchus mykiss* balıklarının böbrek dokusu asetilkolinesteraz ve butiril kolinesteraz düzeylerinin değişiminin araştırılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

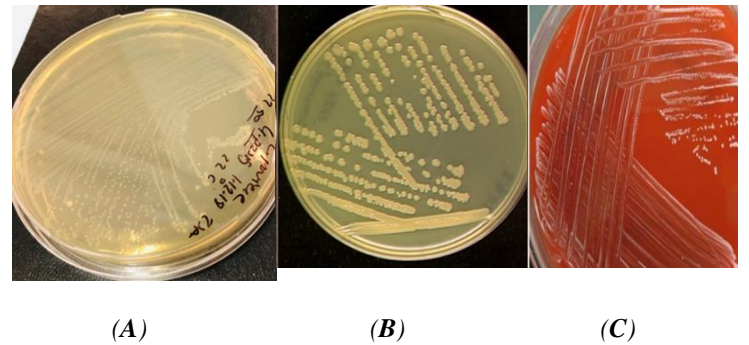
2.1. Balık

Bu çalışmada 45 adet 200-250 g'lık alabalıklar ticari olarak üretim yapan alabalık üretim çiftliklerinden temin edilmiştir. Hasta oldukları gözlemsel olarak tespit edilen Gökkuşuğu Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792), bakteriyel hastalıkları tespit edilmek üzere laboratuvar ortamına getirilmiştir. Laboratuvar ortamında bakteriyel analiz için çalışılacak dokulardan örnekler alındıktan sonra biyokimyasal analiz için böbrek dokuları ayrılmıştır.

2.2. Bakteriyel Hastalıkların Tespiti ve İzolasyonları

Çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 31.01.2019 tarih ve 2019/01 sayılı kararı ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan gökkuşuğu alabalıkları Van ilinde bulunan ve yavru üretimi yapan işletmelerden seçilmiştir. Bu amaçla 5 farklı işletmeden 9'ar adet olmak üzere toplam 45 adet alabalık satın alınmıştır. Örneklemeye yapılan balıklarda dış semptom olarak hareketlerde yavaşlama, ayrı yüzmeye, renkte kararma, bilateral ekzoftalmus ve asites gibi semptomlar başta olmak üzere yüzmeye bozukluğu, yüzgeç erimesi gibi belirtiler gösteren balıklar seçilmiştir.

Bakteri izolasyonları ve moleküler tabanlı çalışmalar Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezine ait laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Örneklemeye yapılan balıklardan bakteri izolasyonlarını gerçekleştirilmesi amacıyla Tryptic Soy Agar (TSA) besi yerine böbrek ve semptomlu yüzgeç dokularından ekimler swap yardımı ile gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik inkübasyon periyodunun ardından gelişen koloniler tekrar saflaştırılmıştır. Saflaştırılan izolatların besiyeri görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 1). 5 farklı çiftlikten 3 çeşit bakteri türü gelişimi gözlenmemiştir. Çiftliklerden sırasıyla 10 adet *L. garvieae*, 9 adet *S. epidermidis* ve 8 adet *B. Subtilis*, etkenleri izole edilmiştir.



Şekil 2. Gökkuşuğu alabalığı işletmelerinden izole edilen bakteriyel hastalık etkenleri (A: *L. garvieae*, B: *B. subtilis*, C: *S. epidermidis*) (Kurt, 2019).

2.3. Bakterilerin İdentifikasyonu ve Real-Time PCR Analizi Sonuçları

Bakterilerin identifikasyonları için 27F-1492R universal primeler kullanılarak Real-Time PCR uygulanmıştır. Bu amaçla bakterilerden DNA izolasyonları Mericon bacterial DNA kiti (Qiagen) ile gerçekleştirilmiştir. DNA'ların saflıkları Nanospektrofotometre (Thermo) ile ölçülmüştür. Real-Time

PCR bakterilerden izole edilen DNA'lar ve universal primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan Real-Time protokolü aşağıda verilmiştir (Tablo 1).

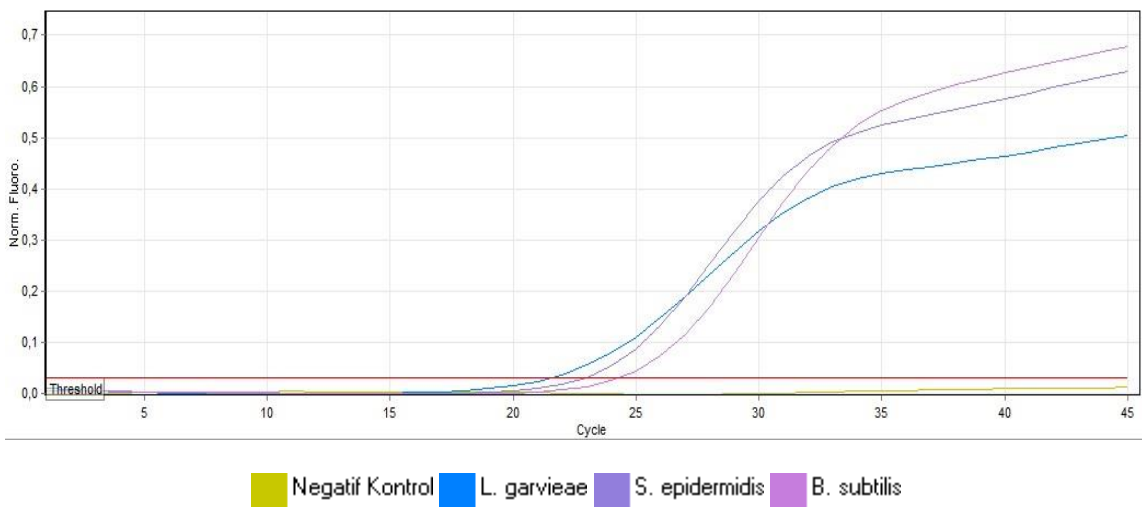
Tablo 1. Real-Time PCR aşamasında kullanılan protokol (Kurt,

	Sıcaklık (°C)	Zaman (dk, *sn)
Ön-denatürasyon	95	10
Denatürasyon	94	45*
Bağlanma	56	30*
Uzama	72	45*
Son uzama	72 °C	7

2019)

İzole edilen bakteriyel etkenlerden elde edilen DNA'lar Real-Time PCR'da template olarak kullanılmıştır. İzolatların PCR

tanımlanması amacıyla Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Universal (27F-1492R) primerler ile gerçekleştirilen Real-Time PCR sonucu aşağıda verilmiştir (Şekil 3). Real-Time PCR sonuçları doğrultusunda bakteriyel DNA'ların Universal primerler ile örtüşerek bağlanma meydana getirdiği SYBRGreen tabanlı florasan ışımada pozitif sonuçlar verdikleri gözlenmiştir.



Şekil 3. Çalışmada izole edilen bakteriyel DNA'lar ile gerçekleştirilen Real-Time PCR görüntüsü (Sigmoidal eğriler pozitif, Eşik değerinin altından kalan negatif kontrol örneği) (Kurt, 2019).

2.4. Biyokimyasal Analizler

Bakteriyel alabalıklardan ve kontrol grubu alabalıklarından alınan böbrek dokuları fosfat tamponu (50 mM KH₂PO₄ ve 10 mM EDTA) ile homojenize edilmiştir. Homojenizatör ile homojen hale getirilen doku örneklerinin santrifüjleme işleminden sonra üstte kalan sıvı kısım alınıp biyokimyasal analizler için kullanılmıştır (Yeltekin ve Oğuz, 2018; Yeltekin, 2018).

Çalışmada Asetilkolinesteraz ve Butirilkolinesteraz aktivite analizleri Ellman ve ark. (1961)'nin kolorimetrik metoduna göre belirlenmiştir. Kolinesterazlar, asetiltiyokolinin tiyokolin ve asetata parçalanma reaksiyonunu katalize etmektedir DTNB'nin ürün olarak açığa çıkan tiyokolin oranı ile reaksiyonu sonucu sararan 5-tio-2-nitrobenzoik asitler oluşmaktadır. Oluşan ürünlerin renklerinin konsantrasyona göre değişiminden yararlanarak spektrofotometrede ölçümleri yapılmıştır. Hazırlanan karışımların absorban değerleri iki tekrarlı olmak üzere spektrofotometre ile 412 nm dalga boyunda okunarak ölçümler yapılmıştır. Aynı örnek için yapılan ölçümler arasındaki korelasyona bakılarak ölçümler tekrarlanmıştır. Daha sonra böbrek dokusu edilen AChE ve BChE düzeyler (EU/mg) enzim aktivitesi olarak hesaplanmıştır.

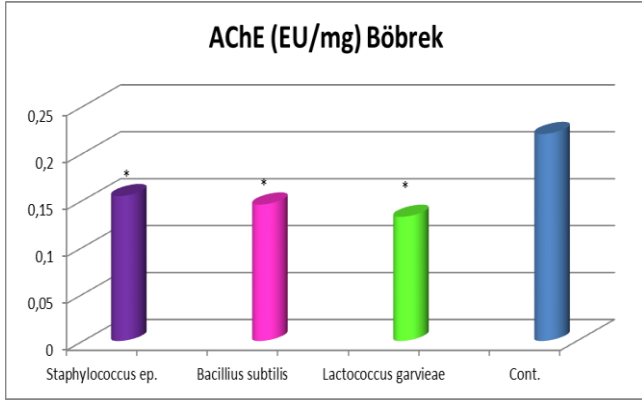
2.5. Verilerin istatistiksel analizi

Analizler sonucunda elde edilen değerler ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. Farklı örnekleme alanlarından ortaya çıkan değerlerinin çoklu karşılaştırmaları için ANOVA testi ve gruplar arasındaki farklılığın belirlenmesi için Tukey testi kullanılmıştır. Değerler arasındaki fark 0.05'e göre yapılmıştır.

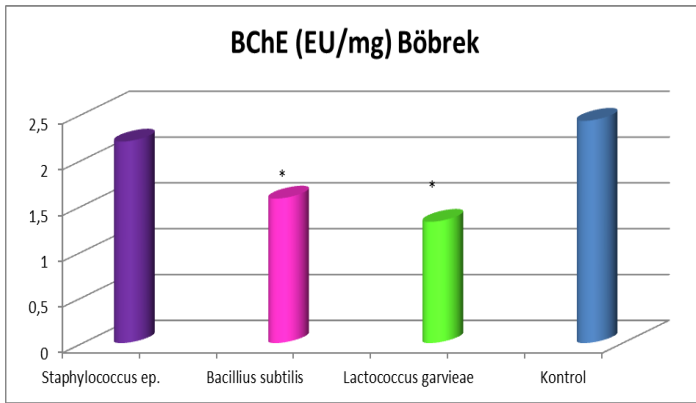
3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

3.1. Bulgular

S. epidermidis, *L. garvieae* ve *B. subtilis* bakterileri ile enfekte olan Gökkuşluğu alabalıklarının böbrek dokusu Asetilkolin esteraz düzeyleri kontrol grubu asetilkolin esteraz düzeyleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak her üç bakteri grubunda da anlamlı azalış olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.005$) (Şekil 4). Bakteriler ile enfekte olan Gökkuşluğu alabalıklarının böbrek dokusu Butirilkolin esteraz düzeyleri kontrol grubu butirilkolin esteraz düzeyleri ile karşılaştırıldığında *B. subtilis* ve *L. garvieae* bakterileri ile enfekte olan alabalık gruplarında istatistiksel olarak anlamlı azalışların olduğu belirlenmiştir ($p < 0.005$) (Şekil 5). Özellikle *L. garvieae* bakterileri türü ile enfekte olan alabalık grubu düzeylerinin belirgin bir seviyede düştüğü gözlenmiştir.



Şekil 4. Farklı bakteriler ile enfekte Gökkuşluğu alabalıklarının böbrek dokusu AChE aktivite düzeylerinin değişimi.



Şekil 5. Farklı bakteri türleri ile enfekte Gökkuşluğu alabalıklarının böbrek dokusu BChE aktivite düzeylerinin değişimi.

3.2. Tartışma

Balıklar su içerisinde içerisinde de sürekli olarak mikroorganizmalar ile temas halindedir. Bu sebeple bakterilerden kaynaklı enfeksiyon durumu balık çiftlikleri için büyük ekonomik kayıplara, neden olmaktadır (Tanrıkul ve ark., 1997). Türkiye’de tatlı su ve deniz balıklarındaki parazitlerle ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, ilk olarak kupez balığından metazoon bir parazit olan *Ceratomyxa sp*’nin bildirildiği ve daha sonra çeşitli araştırmacılar tarafından da tatlı su, deniz ve çeşitli akvaryum balıklarının parazit faunalarının çalışıldığı görülmüştür (Öktener, 2003). Enfeksiyöz hastalıkların ortaya çıkmasında konakçı, patojenin virülans ve çevre arasında bir ilişki söz konusudur. Çevre şartlarındaki olumsuz değişiklikler strese neden olurken hastalık etkeninin virülans ve miktarı da hastalığın çıkmasında önemli bir faktördür (Çağırğan, 1993). İlk zamanlarda 15-20 bakteri türünün balıklar için patojenik olduğu düşünülmeye rağmen daha sonra yapılan çalışmalarda balıklardan 70’e yakın bakteri türü izole edilmiştir (Austin ve Austin, 1993).

Metabolizmada Asetilkolin bir nörotransmitter olarak kullanılır. Balıklarda da, bu nörotransmitter ile bağlantılı fonksiyonların bazıları şunlardır: optik devrelerin görsel yanıtı; tat alma sırasında bilgi işleme besleme ve motor bilgilerinin işlenmesi besleme sırasında tat bilgisi işleme ve motor bilgilerinin işlenmesi gibi (Clemente ve ark., 2004). *Aeromonas caviae*, balıklarda nadiren bulunan bir bakteri türüdür ancak

enfekte olan balıklarda yüksek oranda ölüm görülmektedir. Bu bakteri ile enfekte olan Gümüş yayın balıklarının (*Rhamdia quelen*), böbrek dokusunda sağlıklı balıklara göre Asetilkolin esteraz ve bütirilkolin esteraz enzim düzeylerinin azalışı gösterdiği tespit edilmiştir (Baldissera, ve ark., 2018). *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, ve *Pseudomonas* bakterileri ile enfekte olan İskine balıklarını (*Sciaenops ocellatus*) enzim sistemlerinin değişiminin araştırıldığı bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada bakterilerin balıkların enzim sistemlerini tahribata uğrattığı ve bu tür kültür balıkçılığı için verimi olumsuz etkileyen bir durum olduğu belirtilmiştir (Tarnecki ve ark., 2018). *Streptococcus agalactiae* ile enfekte olmuş Gümüş yayın balıklarının (*Rhamdia quelen*), bakteri enfeksiyonu durumunda metabolizmada stres oluşumunu belirlemeye yönelik bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada bakterili balıkların stres düzeylerinin kontrol grubuna göre belirgin bir düzeyde artış gösterdiği tespit edilmiştir (Souza ve ark., 2017). *Aeromonas hydrophilla* özellikle su ortamlarında bulunan bir bakteridir. *Aeromonas hydrophilla* ile enfekte olan yavru Hint balıklarının (*Cirrhinus mrigala*) bağışıklık sistemlerinin araştırıldığı bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada bakteri ile enfekte olan yavru balıkların bağışıklık sisteminin zayıfladığı tespit edilmiştir (Kumar ve ark., 2018). Sunduğumuz çalışmanın sonuçları da bu literatürler ile uyumlu olarak enfeksiyon durumunda Asetilkolin esteraz ve Bütirilkolin esteraz düzeylerinin azaldığı gözlenmiştir.

4. Sonuç

Sonuç olarak; *S.epidermidis*, *L. garvieae* ve *B. subtilis* bakteri ile enfekte olan gökkuşluğu alabalıklarının kolinerjik sistem enzimlerinden Asetilkolin esteraz ve Bütirilkolin esteraz düzeylerinin olumsuz olarak etkilendiği tespit edilmiştir. Bu durum mevcut bakterilerin alabalıkların kolinerjik sistem enzimlerinin salgı metabolizmasında inhibisyona ya da denatürasyona sebep olmasından kaynaklanmış olabilir. Bu nedenle bu çalışma ile balık yaşam alanlarının temizliğinin, hasta balık izolasyonunun, su kaynaklarının ve yemlerin kalitesinin önemine dikkat etmenin işletmeler için daha az canlı kaybı ve daha sağlıklı besin üretimi sağlanması bakımından önem arz edeceği ortaya konulmuştur. Ayrıca bakterili balıkların kolinerjik sistem üzerine etkileri hakkında çok sınırlı sayıda çalışma mevcuttur bu nedenle bu çalışmanın literatüre önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Kaynakça

- Aydın, F. (2009). Salar Linnaneus, Salmo., A.Ü. Alabalık Biyolojisi ve Yetiştirme Teknikleri
- Austin, B. & Austin, D.A. (1999). *Bacterial Fish Pathogens Disease of Farmed and Wild Fish*, Third (Revised) Edition, Praxis Publishing Chichester, U.K., 457.
- Baldissera, M.D., Souza, C. F., Doleski, P.H., Júnior, G.B., de Vargas, A.C., & Baldisserotto, B., (2016). Involvement of cholinergic and purinergic systems during the inflammatory response caused by *Aeromonas hydrophilla* in *Rhamdia quelen*. *Microbial Pathogenesis*, 99, 78-82.
- Çağırğan, H., (1993). Kültürü yapılan çipura ve levrek balıklarında görülen bakteriyel hastalıkların teşhis ve tedavileri. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi, İzmir.

- Chatonnet A. & Lockridge O. (1989) Comparision of butyrylcholinesterase and Acetylcholin esterase. *Biochemical Journal*, 260, 625- 634.
- Ekhholm, M. (2001). Predicting relative binding free energies as substrate and inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 572, 25-34.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D. & Andres, V.J., (1961). A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- Kumar, P.Jainb . K.K. & Sardar, P., (2018). Effects of dietary synbiotic on innate immunity, antioxidant activity and disease resistance of *Cirrhinus mrigala* juveniles, *Fish and Shellfish Immunology*. 80, 124–132.
- Kurt, F., (2019). Farklı Bakteriyel Hastalık Etkenlerine Maruz Kalmış Gökkuşığı Alabalıklarında Oluşan DNA Hasarı ve Antioksidan Düzeylerindeki Değişimlerin İncelenmesi Yüksek Lisans Tezi. Yüzüncü Yil Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı. Aralık 2019, 77.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E. & Valette, F.M. (1992). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Neurobiology*, 41, 31-91.
- Öktener, A. (2003). A Checklist of Metazoan Parasites Recorded in Freshwater Fish from Turkey. *Zootaxa*, 394, 1–28.
- Souza, C.F., Baldissera, M.D., Santos, R.C.V., Raffin, R.P. & Baldisserotto, B., (2017). Nanotechnology improves the therapeutic efficacy of *Melaleuca alternifolia* essential oil in experimentally infected *Rhamdia quelen* with *Pseudomonas aeruginosa*. *Aquaculture*, 473, 169-171.
- Tanrikul, T., Çağırğan, H. & Tokşen, E., (1997). Bacterial Fish Diseases. *Journal of the Veterinary Control and Research Institute*, Bornova, 20, 105- 27.
- Tarnecki, A.M., Rhody, N.R., Walsh, C.J., (2018). Health Characteristics and Blood Bacterial Assemblages of Healthy Captive Red Drum: Implications for Aquaculture and Fish Health Management. *Journal of Aquatic Animal Health*, 30, 339–353.
- Tougu V. (2001). Acetylcholinesterase: Mechanism of catalysis and inhibition. *Curr. Journal of Medicinal Chemistry*, 1, 155-170.
- Yeltekin, A.Ç. & Oğuz, A.R. (2018). Antioxidant responses and DNA damage in primary hepatocytes of Van fish (*Alburnus tarichi*, Gldenstadt 1814) exposed to nonylphenol or octylphenol. *Drug and Chemical Toxicology*, 41, 415.
- Yeltekin, A.Ç. (2018). Comparison of Toxic Metal, Trace Element and Macro Element Levels in Trout Cultivated in Latvia and Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27 (10), 7039-7044.
- Yeltekin, A. Ç. , Karapinar, Z., & Mis, L., (2018). The changes in the levels of elements in sheep with Contagious Ecthyma. *Indian Journal Of Animal Research*, 52: 56-60.