

## Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)' nda Arı Poleninin Paraoksonaz ve Arilesteraz Enzim Aktivitelerine Etkisinin Araştırılması

Yassir YÖNTÜRK, M. Enis YONAR\*

Fırat Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü

\* e-mail: meyonar@firat.edu.tr

(Geliş/Received: 16.01.2018; Kabul/Accepted: 11.07.2018)

### Özet

Bu çalışmada; gökkuşığı alabalığında paraoksonaz (PON) ve arilesteraz (ARE) enzim aktivitelerine arı polenin etkisi araştırıldı. Araştırmada; ortalama ağırlığı  $100 \pm 10$  g olan toplam 120 adet gökkuşığı alabalığı kullanıldı. % 1 (D1), % 2 (D2) ve % 4 (D3) oranında polen içeren yemler 21 gün süreyle balıklara verildi. Deneme sonunda balıklardan alınan serum örneklerinde PON ve ARE enzim aktiviteleri analiz edildi. Kontrol grubuna göre polen uygulanan grupların PON ve ARE aktivitelerinde istatistiksel herhangi bir farklılık bulunmadı. Kontrol grubuyla kıyaslandığında, PON aktivitesi D1 ve D3 gruplarında daha yüksek bulunurken ARE aktivitesi D2 grubunda daha yüksek bulundu.

**Anahtar Kelimeler:** Arilesteraz, Balık, Enzim, Paraoksonaz, Polen.

### Investigation of Effect of Bee Pollen on Paraoxonase and Arylesterase Enzyme Activities in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

#### Abstract

In this study, effects of bee pollen on paraoxonase (PON) and arylesterase (ARE) enzyme activities in rainbow trout (*O. mykiss*) were investigated. In the research, total 120 rainbow trout that averagely weighted  $100 \pm 10$  g were used. Diets containing % 1 (D1), % 2 (D2) and % 4 (D4) pollen were given to the fish for 21 days. Serum samples were collected at the end of the experiment and analysed to determine PON and ARE enzyme activities. No statistically significant change in the PON and ARE activities was observed between the pollen-treated groups and the control group. Compared with the control group, PON activity was higher in the D1 and D3 groups, while ARE activity was higher in the D2 group.

**Key Words:** Arylesterase, Enzyme, Fish, Paraoxonase, Pollen.

#### 1.Giriş

Aynı gen tarafından kodlanan ve karaciğerde sentezlenen paraoksonaz, arildialkilfofostafaz sınıfı bir ester hidrolaz enzimidir. Kolinesterazların güçlü bir inhibitörü olan paraoksonaz, hem arilesteraz (ARE; E.C. 3.1.1.2) hem de paraoksonaz (PON; E.C.3.1.8.1) aktivitesi gösterir [1]. PON organik fosforlu bileşikler ile tabun, sarin gibi sinir gazlarının, çeşitli karbamatların ve daha birçok aromatik karboksilik asit esterlerinin hidrolizini katalizlemektedir. Başlangıçta sadece organofosfatlı bileşiklerin hidrolizini katalizlediği düşünülen bu enzimin daha sonra ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıklarda, vasküler disfonksiyon ve endotel hasarının önlenmesinde

etkili olduğu yapılan çalışmalarla açığa çıkarılmıştır [2].

İlk olarak 1953 yılında Aldridge tarafından insan kan serumunda PON' un varlığı belirlenmiştir. PON' un aktivitesinden sorumlu genin multigen ailesinin bir üyesi olduğu, insanlarda ve farelerde aynı kromozom üzerinde birbirine komşu üç ayrı PON geni (PON1, 2, 3) bulunduğu 1996 yılında tespit edildiği için sırasıyla PON1, PON2 ve PON3 olarak adlandırılmıştır. PON1 aktivitesi genel olarak PON aktivitesi olarak kabul edilmektedir. PON polimorfizm gösteren bir enzim olup bu polimorfizmin nedeni molekülün 192. pozisyonundaki amino asit farklılığıdır. PON polimorfik değişim göstermesine rağmen ARE enzimi genetik polimorfik bir değişim

göstermemektedir. Diğer taraftan her iki enzimin doğal substratları farklı olmasına karşın PON enzimi ARE'nin doğal substratı olan fenil asetatı da hidroliz edebilme yeteneğindedir. LDL'yi oksidasyondan koruyan özelliği ve hidrojen peroksit de dahil diğer serbest radikalleri nötralize etme kabiliyetinden dolayı PON enzimi antioksidan etki de göstermektedir [1,3].

Çiçek tozu anlamına gelen polen, bitkilerin çiçeklenme dönemleri boyunca görülen sarı, kırmızı, mor, yeşil ve siyaha kadar değişen farklı renklerde olabilen çok çekirdekli haploit kromozoma sahip dişi organın tozlaşmasını sağlayan çiçekli bitkilerin erkek üreme organında oluşan erkek gametofitlerdir [2,4,5]. Polenin yapısında esas olarak yüksek oranda protein ve karbonhidrat bulunmakla birlikte yağ asitleri, vitaminler, mineral maddeler, enzimler ve aminoasitler yapılan analizler sonucunda belirlenmiştir. Ayrıca polende karotenoidler, steroidler, flavonoidler ve renk maddelerinin varlığı da kanıtlanmıştır [6]. Polen antibakteriyel, antifungal, antikarsinojenik ve antioksidan özelliklere sahip immunomodulator yapıda bir madde olup, içerdiği besin maddeleri nedeniyle son zamanlarda oldukça fazla dikkat çekmektedir [6-9].

Bu araştırmada immunostimulan ve antioksidan özellikteki arı polenin, gökkuşluğu alabalığında PON ve ARE enzim aktivitelerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

Çalışma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Başkanlığı tarafından onaylanmıştır (Protokol No: 2014/10-102).

Araştırmada kestane (*Castanea sativa*) poleni kullanıldı. Polen örnekleri, Zonguldak yöresinde sabit arıcılık yapan arıcılardan kestane balının üretim sezonunda kovanların önüne polen tuzağı takılarak elde edildi. Polen örneklerinin palinolojik olarak identifikasyonu Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi' nden Prof. Dr. Sibel SİLİCİ tarafından yapıldı.

Çalışmada kullanılan polen örnekleri % 1, % 2 ve % 4 oranında tartıldı ve 1' er litre su içerisinde çözüldü. Polen içeren yemlerin hazırlanması için, özel bir firmadan (Ecobio) alınan pelet yemler önce toz haline getirildi. Toz haline getirilen yemler polen içeren 1' er litrelik

sularla hamur haline getirildi. Hamur haline getirilen karışım kıyma makinesinden geçirilerek pelet haline dönüştürüldü. Hazırlanan peletler tepsilere yerleştirilip yem fırınında kurutuldu. Yemler soğutulduktan sonra, kullanılıncaya kadar koyu renkli cam muhafaza kapları içerisinde ve 4 °C' de muhafaza edildi.

Araştırmada kullanılan ve ortalama ağırlığı 100 ± 10 g olan 120 adet gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), yerel bir işletmeden temin edilerek 80 x 75 x 90 cm boyutlarında 4 farklı fiberglas tanka, her birinde 10 adet olacak şekilde yerleştirildi. Deneysel çalışmaya başlamadan önce balıklar hazırlanmış olan bu ortama 15 gün süreyle adapte edildi. Adaptasyon süresince balıklara günde iki kere alabildikleri kadar ticari alabalık yemi verildi. Çalışma 3 tekrarlı olarak yürütüldü ve her bir tekrar için 40 adet olmak üzere toplamda 120 balık kullanıldı.

Adaptasyon süresi sonunda balıklar **K** (Kontrol grubu; polen içermeyen ticari yemin uygulandığı grup), **D1** (% 1 oranında polen ilave edilen yemin uygulandığı grup), **D2** (% 2 oranında polen ilave edilen yemin uygulandığı grup) ve **D3** (% 4 oranında polen ilave edilen yemin uygulandığı grup) olmak üzere 4 farklı gruba ayrıldı.

Deneme 21 gün sürdü. Çalışmanın sonunda benzocain (25mg/L) ile anestezi edilen balıklar, kan örneklerinin alınması için kavdal pedüncül bölgesinden ensize edildi. Kan örnekleri antikoagülant içermeyen jelli tüplere dolduruldu. Jelli tüplere alınan kan örneklerinin 3500 rpm' de 10 dakika santrifüjünden sonra serumları çıkarıldı. Elde edilen bu serumlarda paraoksonaz (PON) ve arilesteraz (ARE) enzim aktiviteleri spektrofotometrik olarak belirlendi.

Bunun için 850 µl Tris-HCl tamponu (100 mM, pH:8), 100 µl substrat çözeltisi (2 mM paraokson + 2 mM koenzim CaCl<sub>2</sub>) ve 100 µl enzim çözeltisi sırasıyla karıştırıldı. Daha sonra 412 nm dalga boyunda ve 37 °C'de 1 dakika zaman diliminde absorbansta meydana gelen değişme spektrofotometrede okundu. ARE enzim aktivitesinde aynı prensiple ölçüldü fakat substrat olarak fenilasetat kullanıldı [10].

Denemede elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri SPSS 12.0 istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. PON ve ARE enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler tek

yönlü varyans analizi (ONEWAY – ANOVA) ile test edildi.

### 3. Bulgular

Kontrol grubuna göre her üç deneme grubunda da PON ve ARE enzim aktivitelerinin

istatistiksel olarak herhangi bir farklılık göstermediği belirlendi. Yine yalnız polenin uygulandığı D1, D2 ve D3 grupları karşılaştırıldığında da benzer bir şekilde gruplar arasında istatistiksel herhangi bir farklılık bulunmadı ( $p > 0,05$ , Tablo 1).

**Tablo 1.** Kontrol ve deneme grubu balıklarının serum PON ve ARE aktivitesindeki değişimler (Ortalama  $\pm$  standart hata).

	Deneme Grupları			
	K	D1	D2	D3
PON (U/mL)	80,81 $\pm$ 8,43 <sup>a</sup>	81,20 $\pm$ 11,29 <sup>a</sup>	79,63 $\pm$ 10,57 <sup>a</sup>	81,86 $\pm$ 9,68 <sup>a</sup>
ARE (U/mL)	313,86 $\pm$ 19,59 <sup>a</sup>	310,22 $\pm$ 25,43 <sup>a</sup>	315,89 $\pm$ 22,65 <sup>a</sup>	312,77 $\pm$ 20,19 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Aynı satırda yer alan farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

### 4. Tartışma ve Sonuç

Balıklarda PON ve ARE enzim aktivitesi ile ilgili farklı teoriler vardır. Bazı araştırmacılar balıklarda bu enzim aktivitelerinin olmadığını iddia ederken bazı araştırmacılar ise bu enzim aktivitelerinin balıklarda görüldüğünü ifade etmişlerdir [1,11,12]. Balıklardaki çalışmalar ise bu enzimlerin yalnızca saflaştırması ve düzeyinin belirlenmesi yönünde olmuştur [13-15]. Örneğin; Folly vd. [16] *Piaractus mesopotamicus* türü balıklarda PON aktivitesinin varlığını göstermiş ve bu enzimin balıklarda high density lipoprotein (HDL) ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Diğer taraftan aynı koşullarda yetiştirilen normal ve albino gökkuşuğu alabalıklarının PON aktivitesi araştırılmış ve sonuçta kültür gökkuşuğu alabalığında serum PON aktivitesi daha yüksek bulunmuştur. Bu farklılığın nedeni tür, büyüklük ve baskınlık durumuna bağlanmıştır [17]. Aynı araştırmacılar tarafından yapılan başka bir çalışmada ise doğadan yakalanan ve kültür altındaki kaynak alabalığı (*Salvelinus fontinalis*)'nda PON enzim aktivitesi ile PON/HDL oranı araştırılmıştır. Sonuç olarak PON aktivitesi ve PON/HDL oranı kültür altındaki kaynak alabalığında doğadan yakalananlara göre daha yüksek bulunmuştur [18]. Bastos vd. [19] neotropikal dört balık türü *Piaractus mesopotamicus*, *Brycon cephalus*, *Hypostomus*

*punctatus*, *Salminus brasiliensis*' in serumunda PON enzim aktivitelerini sırasıyla 6,1, 6,6, 1,5 ve 35,2 nmol x min<sup>-1</sup> x ml<sup>-1</sup> olarak belirlemişlerdir. Bunun yanı sıra son zamanlarda balıklarda PON aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmaların hemen hemen tamamında, ağır metallerin [15,20-22] ve bazı pestisitlerin [23] bu enzim üzerine etkileri araştırılmıştır.

Polenin balıklarda PON ve ARE enzim aktivitesine etkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Buna karşın *N*-nitro-L-arjinin-metil ester (L-NAME) ile hipertansif yapılan sıçanlarda propolis, kafeik asit fenil ester (CAPE) ve polen uygulamasının paraoksanaz (PON1) aktivitesi, toplam antioksidan seviye (TAS), toplam oksidan seviye (TOS), oksidatif stres indeksi (OSİ), asimetric dimetilarginin (ADMA) ve nükleer faktör kappa B (NF- $\kappa$ B) seviyeleri ve kan basıncında meydana gelen değişimler araştırılmıştır (Gülhan, 2014). Sonuç olarak polen uygulanan gruplarda PON1 aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Bu çalışmada ise kontrol grubuna göre her üç deneme grubunda da PON ve ARE enzim aktivitelerinin istatistiksel olarak herhangi bir farklılık göstermediği, yine yalnız polenin uygulandığı D1, D2 ve D3 grupları karşılaştırıldığında da benzer bir şekilde gruplar arasında istatistiksel herhangi bir farklılığın bulunmadığı tespit edilmiştir.

## Teşekkür

Bu çalışma; Yüksek Mühendis Yassir YÖNTÜRK' ün yüksek lisans tezinin bir bölümünden özetlenmiş ve Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Yönetim Birimi tarafından SÜF.17.03. nolu proje olarak desteklenmiştir. Polen örneklerinin identifikasyonu için Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Sibel SİLİCİ' ye teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

1. Başkol, G. ve Köse, K. (2004). Paraoksonaz: Biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemi. *Erciyes Tıp Derg.*, **26(2)**: 75-80.
2. Gülhan, M.F. (2014). Nitrik oksit sentaz blokajı ile hipertansiyon oluşturulan sıçanlarda propolis, cape ve polen'in kan basıncı, adma, NF-KB ve paraoksanaz düzeylerine etkileri. Doktora Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 129s.
3. Türkoğlu, S., Gülcü Bulmuş, F., Parmaksız, A., Özkan, Y. ve Gürsu, F. (2008). Metabolik Sendromlu Hastalarda Paraoksonaz 1 ve Arilesteraz Aktivite Düzeyleri. *Fırat Tıp Derg.*, **13(2)**: 110-115.
4. Tümerdem, Ç. (2016). Beypazarı ballarında polen analizi. *Yüksek Lisans Tezi*, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 91s.
5. Fişne, A., 2016. Trabzon yöresi ballarında polen analizi. *Doktora Tezi*, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 255s.
6. Abbass, A.A., El-Asely, A.M. and Kandiel, M.M.M. (2012). Effects of Dietary Propolis and Pollen on Growth Performance, Fecundity and Some Hematological Parameters of *Oreochromis niloticus*. *Turk. J. Fish. Aquat. Sc.*, **12**: 851-859.
7. Yang, X., Guo, D., Zhang, J. and Wu, M. (2007). Characterization and anti-tumor activity of pollen polysaccharide, *Int. Immunopharmacol.*, **7(3)**: 401-408.
8. Eraslan, G., Kanbur, M. and Silici, S. (2009). Effect of carbaryl on some biochemical changes in rats: The ameliorative effect of bee pollen. *Food Chem. Toxicol.*, **47**: 86-91.
9. Xu, X., Sun, L., Dong, J. and Zhang, H. (2009). Breaking the cells of rape bee pollen and consecutive extraction of functional oil with superficial carbon oxide. *Innov Food Sci Emerg.*, **10**: 42-46.
10. Dubravka, J., Milena, T., Branka, R., Vrea, S.R., Elsa, R. and Martin, B. (2001). Serum paraoxonase activities in the hemodialyzed uremic patients: Chort study. *Clin Sci.*, **42**: 146-150.
11. Mackness, M.I., Mackness, B., Durrington, P.N., Connelly, P.W. and Hegele, R.A. (1996). Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins, *Curr Opin Lipidol.*, **7**: 69-76.
12. Durrington, P.N., Mackness, B. and Mackness, M.I. (2001). Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **21**: 473-480.
13. Bastos, V.L.F.C., Folly, E., Rossini, A., Ceccarelli, P.S., Senhorini, J.C. and Bastos, J.C. (1998a). Paraoxonase activity in liver of Pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Characidae). *Rev Bras Zool.*, **15(5)**: 677-685.
14. Bastos, V.L.F.C., Rossini, A., Alves, M.V., Ceccarelli, P.S., Ferraz de Lima, J.A. and Bastos, J.C. (1998b). Paraoxonase activity in sera from *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (Characidae) and *Hypostomus punctatus* Valenciennes (Siluridae). *Rev Bras Zool.*, **15(3)**: 665-675.
15. Beyaztaş, S., Türker, D., Sinan, S. ve Arslan, O. (2007). *Cyprinus carpio* paraoksonaz enziminin bazı ağır metallerle inhibisyon etkisinin incelenmesi, 21. Ulusal Kimya Kongresi, 23-27 Ağustos, Malatya.
16. Folly, E., Bastos, V.L.C., Alves, M.V., Bastos, J.C. and Atella, G.C. (2001). A high density lipoprotein from *Piaractus mesopotamicus*, pacu, (Osteichthyes, Characidae), is associated with paraoxonase activity. *Biochimie*, **83**: 945-951.
17. Karataş, T. and 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 Univ Vet Fak.*, **18(1)**: 87-90.
18. Karataş, T. and Kocaman, E.M. (2014). Susceptibility to oxidative damage in wild and cultured brook trouts (*Salvelinus fontinalis* Mitchill, 1815). *Int J Fish Aquat.*, **2(1)**: 180-183.
19. Bastos, V.L.F.C., Alves, M.V., Bernardino, G., Ceccarelli, P.S. and Bastos, J.C. (2004). Paraoxonase Activity in Sera of Four Neotropical Fish. *B Environ Contam Tox.*, **72**: 798-805.
20. Deveci, H.A., Kaya, İ., Yılmaz, M and 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). *Fresen Environ Bull.*, **24(9)**: 2732-2735.
21. Sayın, D., Türker Çakır, D., Gençer, N. and Arslan, O. (2012). Effects of some metals on paraoxonase activity from shark *Scylliorhinus canicula*. *J Enzyme Inhib Med Chem.*, **27(4)**: 595-598.

- 22.** Yonar, M.E., Mişe Yonar, S., Çoban, M.Z. and Erođlu, M. (2012). The Effect of Propolis on Serum Paraoxonase and Arylesterase Enzyme Activies in *Cyprinus carpio* During Chromium Exposure. *Fresen Environ Bull*, **21(6)**: 1399-1402.
- 23.** Altinok I., Capkın, E. and Boran, H. (2012). Mutagenic, genotoxic and enzyme inhibitory effects of carbosulfan in rainbow trout *Orconhynchus mykiss*. *Pestic Biochem and Phys.*, **102**: 61-67.