

## Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)'nda Curcuminin Bazı Antioksidan Parametreler Üzerine Etkisi

Serpil MİŞE YONAR, M. Enis YONAR, Yassir YÖNTÜRK

Fırat Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, 23119, Elazığ, Türkiye.  
serpilmise@gmail.com

(Geliş/Received: 05.07.2013; Kabul/Accepted: 14.02.2014)

### Özet

Bu çalışmada; curcuminin gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nda bazı antioksidan parametrelere etkisi incelendi. Curcuminin 10, 20 ve 40 mg/kg yem miktarları 21 gün süreyle balıklara verildi. Deneme sonunda balıklardan karaciğer, böbrek ve dalak örnekleri alındı. Bu dokularda malondialdehit (MDA) ve redükte glutatyon (GSH) düzeyi ile glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon S-transferaz (GST) enzim aktiviteleri incelendi. Curcumin uygulanan balıklarda MDA düzeyinin düştüğü, GSH-Px, GR ve GST aktiviteleri ile GSH düzeyinin ise arttığı belirlendi ( $p<0.05$ ).

**Anahtar Kelimeler:** Gökkuşığı alabalığı, Curcumin, Oksidatif stres, Antioksidan sistem.

## The Effect of Curcimin on Some Antioxidant Parameters in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)

### Abstract

In this study, the effect of curcumin on some antioxidant parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were examined. The amounts of 10, 20 and 40 mg curcumin for per kg diet were given to fish for 21 days. At the end of this period, liver, kidney and spleen samples were taken from the fish. Malondialdehyde (MDA) and reduce glutathione (GSH) level, glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GR) and glutathione S transferase (GST) enzyme activities were investigated in these tissues. It was found that the MDA level decreased, while the GSH-Px, GR and GST enzyme activities and the GSH level increased in the fish applied curcumin ( $p<0.05$ ).

**Key Words:** Rainbow trout, Curcumin, Oxidative stress, Antioxidant system.

### 1. Giriş

Curcumin; Hindistan, Çin ve Güney Doğu Asya'da yaygın olarak bulunan *Zingiberaceae* familyasına ait *Curcuma longa* bitkisinin köklerinden elde edilen zerdeçal (hint safranı veya turmerik)'in ana bileşenidir. Son yıllarda zerdeçal ve onun ekstraktlarının biyolojik aktiviteleri ile farmakolojik etkilerini belirlemek için çok sayıda çalışma yapılmış, bu çalışmalar sonucunda curcumin (diferuloilmetan)'in güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu *in vivo* ve *in vitro* olarak belirlenmiştir [1]. Curcumin serbest oksijen radikallerinin bir temizleyicisi olarak etki göstermektedir [2]. Curcumin aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin üretimini azaltmakta [3], süperoksit anyon radikalleri, hidroksil radikalleri [4] ve nitrojen dioksit radikalleri [5,6] gibi birçok reaktif oksijen

türlerini güçlü bir şekilde temizleyebilmektedir. Ayrıca lipid peroksidasyonu azaltmakta, bu etkisini ise antioksidan enzimlerin aktivitelerini koruyarak gerçekleştirmektedir [7].

Diğer yüksek omurgalı canlılarda olduğu gibi balıklarda da lipid peroksidasyonun bir ürünü olan MDA, doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşur ve hücrenel bileşenlerde meydana gelen oksidatif stresin en önemli göstergelerinden biridir [8]. 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 süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon-S-transferaz (GST) ile enzimatik

olmayan redükte glutatyon (GSH), A, E ve C vitaminleri gibi maddelerden oluşurlar [9,10].

Bu çalışmada farklı dozlarda curcumin uygulanan gökkuşağı alabalığının karaciğer, böbrek ve dalak dokusundaki lipid peroksidasyon (MDA) ve redükte glutatyon (GSH) düzeyi ile glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon S-transferaz (GST) enzim aktivitelerindeki değişimlerin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

Çalışmada, Elazığ' daki özel bir işletmeden temin edilen, ortalama ağırlığı  $238.25 \pm 15.13$  g olan alabalıklar kullanıldı. Üç tekrarlı yürütülen bu çalışmada her gruba 20 balık olmak üzere her bir tekrar için 80, toplamda 240 balık kullanıldı. Deneysel çalışmaya başlamadan balıklar önceden hazırlanmış 540 litre hacimli fiberglas tanklara stoklanarak 15 gün süreyle adapte edildi. Adaptasyon süresince balıklara günde iki kere alabildikleri kadar ticari alabalık yemi verildi. Bu tanklardan iki tanesi kontrol grubu, diğer altı tanesi ise curcuminin 3 farklı dozunun uygulanacağı deney grubu olarak belirlendi. Çalışma süresince tanklardaki su sıcaklığı  $13,9$  °C, oksijen  $8,0$  mg/Lt, pH  $7,4$  olarak ölçüldü ve bu değerlerde önemli herhangi bir değişiklik görülmedi.

Curcuminin  $10$  mg/kg yem (C10),  $20$  mg/kg yem (C20) ve  $40$  mg/kg yem (C40) şeklinde ayarlanan dozları toz haline getirilen ticari bir alabalık yemiyle homojen olarak karıştırıldı. Hazırlanan bu yemler balıklara 21 gün boyunca günde iki kez vücut ağırlıklarının % 2' si oranında oral yolla uygulandı. Kontrol grubundaki balıklara ise curcumin ilave edilmeyen normal alabalık yemi verildi.

Deneme sonunda balıklar benzokain ile bayıltılarak karaciğer, böbrek ve dalak örnekleri alındı. 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  $+4$  °C'de  $10$  dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alındı ve lipid peroksidasyonun bir göstergesi olarak malondialdehit (MDA) konsantrasyonu [11], GSH-Px aktivitesi [12], GR aktivitesi [13] ve GST aktivitesi [14] ile GSH düzeyi [15] belirlendi. Protein tayini ise Lowry ve diğ. [16]'nin bildirdiği metoda göre yapıldı.

Denemede elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri SPSS 10 paket istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol ve deneme grubu balıklarının incelenen parametrelerinde meydana gelen değişimler  $p<0.05$  düzeyinde tek yönlü varyans analizi (ONEWAY-ANOVA) ile test edildi.

## 3. Bulgular

Kontrol ve deneme grubu balıklarının karaciğer, böbrek ve dalak dokusunda MDA konsantrasyonu, GSH düzeyi ile GSH-Px, GR ve GST aktiviteleri Tablo 1' de verilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla curcuminin farklı dozlarının uygulandığı grupların karaciğer, böbrek ve dalak dokusunda MDA konsantrasyonunun düştüğü, GSH-Px, GR ve GST aktiviteleri ile GSH düzeyinin ise arttığı belirlendi ( $p<0.05$ ).

## 4. Tartışma ve Sonuç

Oksidatif stres, oksidan ve antioksidan denge arasındaki değişiklikler sonucunda meydana gelmekte ve reaktif oksijen türleri lehindeki artışlar oksidatif hasar olarak görülebilmektedir [17,18]. Serbest radikaller yüksek aktivitelerinden dolayı hücre zarında bulunan doymamış yağ asitleri ile etkileşerek lipid peroksidasyonunu başlatabilmektedir. Oluşan lipid peroksitler kolaylıkla yıkımlanarak başta MDA olmak üzere birçok sekonder ürünler meydana getirebilmektedir [19]. Bu nedenle bu çalışmada oksidatif stresin bir göstergesi olarak MDA konsantrasyonundaki değişimler araştırılmıştır.

**Tablo 1.** Kontrol ve deneme grubu balıklarının karaciğer, böbrek ve dalak dokusunda MDA konsantrasyonu, GSH düzeyi ile GSH-Px, GR ve GST aktiviteleri ( $\pm$  standart sapma).

Dokular	Gruplar	MDA (nmol/g protein)	GSH-Px (U/mg protein)	GR (U/mg protein)	GST (U/mg protein)	GSH ( $\mu$ mol/g protein)
Karaciğer	Kontrol	6.98 $\pm$ 1.85 <sup>a</sup>	3.61 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>	1.75 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	100.45 $\pm$ 17.42 <sup>a</sup>	196.73 $\pm$ 19.52 <sup>a</sup>
	C10	4.32 $\pm$ 1.49 <sup>b</sup>	4.48 $\pm$ 0.97 <sup>b</sup>	2.38 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	141.29 $\pm$ 20.39 <sup>b</sup>	253.06 $\pm$ 26.17 <sup>b</sup>
	C20	4.26 $\pm$ 1.97 <sup>b</sup>	4.77 $\pm$ 1.31 <sup>b</sup>	2.33 $\pm$ 0.68 <sup>b</sup>	165.03 $\pm$ 24.18 <sup>c</sup>	261.80 $\pm$ 24.73 <sup>b</sup>
	C40	4.10 $\pm$ 1.26 <sup>b</sup>	4.69 $\pm$ 0.83 <sup>b</sup>	2.40 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>	182.20 $\pm$ 19.88 <sup>d</sup>	280.27 $\pm$ 22.41 <sup>c</sup>
Böbrek	Kontrol	10.57 $\pm$ 3.22 <sup>a</sup>	2.64 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	1.43 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	71.76 $\pm$ 14.29 <sup>a</sup>	65.79 $\pm$ 12.74 <sup>a</sup>
	C10	6.88 $\pm$ 2.45 <sup>b</sup>	3.55 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup>	1.82 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>	85.73 $\pm$ 12.05 <sup>b</sup>	81.33 $\pm$ 15.20 <sup>b</sup>
	C20	6.24 $\pm$ 1.88 <sup>b</sup>	3.49 $\pm$ 0.72 <sup>b</sup>	1.84 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup>	84.47 $\pm$ 13.61 <sup>b</sup>	93.62 $\pm$ 13.47 <sup>c</sup>
	C40	5.95 $\pm$ 2.22 <sup>b</sup>	3.70 $\pm$ 0.93 <sup>b</sup>	1.91 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>	96.65 $\pm$ 18.74 <sup>c</sup>	110.86 $\pm$ 20.14 <sup>d</sup>
Dalak	Kontrol	8.95 $\pm$ 3.06 <sup>a</sup>	2.38 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	1.33 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	83.51 $\pm$ 14.30 <sup>a</sup>	78.52 $\pm$ 16.27 <sup>a</sup>
	C10	6.44 $\pm$ 2.87 <sup>b</sup>	2.95 $\pm$ 0.67 <sup>b</sup>	1.51 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	96.33 $\pm$ 18.42 <sup>b</sup>	110.33 $\pm$ 15.38 <sup>b</sup>
	C20	5.98 $\pm$ 3.27 <sup>b</sup>	3.11 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup>	1.58 $\pm$ 0.53 <sup>b</sup>	94.22 $\pm$ 23.16 <sup>b</sup>	128.59 $\pm$ 25.04 <sup>c</sup>
	C40	6.13 $\pm$ 1.94 <sup>b</sup>	3.10 $\pm$ 0.42 <sup>b</sup>	1.60 $\pm$ 0.34 <sup>b</sup>	98.75 $\pm$ 20.73 <sup>b</sup>	149.46 $\pm$ 23.96 <sup>d</sup>

C10: 10 mg/kg yem oranında curcumin verilen grup, C20: 20 mg/kg yem oranında curcumin verilen grup, C40: 40 mg/kg yem oranında curcumin verilen grup.

<sup>a,b,c,d</sup>: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar birbirinden farklıdır (p<0.05).

Manju ve diğ. [20], % 0.5 ve 1 düzeyinde yeme katılan curcuminin 2. hafta sonunda karaciğer lipit peroksidasyon düzeyini önemli oranda azalttığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada da farklı oranlarda yeme katılan curcuminin incelenen tüm dokularda MDA konsantrasyonunu azaltması araştırmacının bulgularıyla benzer bulunmuştur.

Sitozolda yerleşik bir enzim olan GSH-Px tetramer yapıda 4 selenyum atomu içeren, hidrojen peroksit ve inorganik hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlayan antioksidan enzimdir [21]. GR ise NADPH' in varlığında okside glutatyon (GSSG)' u redükte glutatyon (GSH)' a indirgeyen dolayısıyla hücre içi GSH değişiminin dengelenmesinde rol oynayan bir enzimdir [22]. GST ise substrat olarak GSH' ı kullanan elektrofilik bileşiklerin ve GSH-Px ile

benzer şekilde lipit hidroperoksitlerin detoksifiye edilmesinde rol alan bir enzimdir [21]. Bu araştırmada curcuminin her üç dozunun uygulandığı gruplarda karaciğer, böbrek ve dalak GSH-Px, GR ve GST enzim aktivitelerinin arttığı belirlendi. Bu sonucun aksine Manju ve diğ. [20], curcuminin 2 hafta süreyle *in vivo* uygulandığı *Anabas testudineus* türü balıklarda GSH-Px ve GR enzim aktivitelerinin değişmediğini tespit etmişlerdir. Bu farklılığın nedeni balığın türü, curcuminin uygulandığı doz ve süreden kaynaklanabilir.

GSH serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan çok önemli bir antioksidandır. Genetik bilgiye ihtiyaç duyulmadan sentezlenebilen bir tripeptittir [23]. Glutatyon GST ve GSH-Px enzimleri tarafından substrat

olarak kullanılarak okside glutatyon (GSSG)'a yükseltgenir ve daha sonra NADPH'ı elektron kaynağı olarak kullanan GR enzimi ile yeniden GSH'a indirgenir. GSH düzeyindeki değişimler canlılığın detoksifikasyon yeteneğinin önemli bir indikatörü olabilir. Glutatyon oksijen radikali yakalayıcı olarak antioksidan savunmada önemlidir [24]. Bu çalışmada curcuminin artan dozuyla paralel olarak incelenen her üç dokuda da GSH düzeyinin arttığı belirlenmiştir. Bunun nedeni curcuminin hücre GSH sentezini arttırmasıyla açıklanabilir [25].

Sonuç olarak, güçlü bir antioksidan olan curcuminin dokularda antioksidan parametreleri stimüle ettiği ve serbest radikalleri temizlediği görülmektedir. Bu olumlu etkilerin hepsi bir bütün olarak değerlendirildiğinde; oksidatif strese karşı, curcuminin alabalıklarda antioksidan olarak kullanılabilmesi ve bu bulguların yapılacak yeni çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

## 5. Kaynaklar

1. Toda, S., Miyase, T., Arichi, H., Tanizawa, H., Takiyano, Y. (1985). Natural antioxidants, III: antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 33, 1725–1728.
2. Das, K.C., Das, C.K. (2002). Curcumin (diferuloylmethane), a singlet oxygen (1O<sub>2</sub>) quencher. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295, 62–66.
3. Joe, B., Lokesh, B.R. (1994). Role of capsaicin, curcumin and dietary n-3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1224, 255–263.
4. Reddy, A.C., Lokesh, B.R. (1994). Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 137, 1–8.
5. Sreejayan, Rao, M.N.A. (1997). Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *Journal of Pharmacology*, 49, 105–107.
6. Unnikrishnan, M.K., Rao, M.N. (1995). Curcumin inhibits nitrogen dioxide induced oxidation of hemoglobin. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 146, 35–37.
7. Reddy, A.C.P., Lokesh, B.R. (1994b). Effect of dietary turmeric (*Curcuma longa*) on iron-induced lipid peroxidation in the rat liver. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 279–283.
8. Morales, A.E., Pérez-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.
9. 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.
10. 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.
11. Placer, Z.A., Cushman, L. and Johnson, B.C. (1966). Estimation of products of lipid peroxidation (Malonyl dialdehyde) in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 16, 359–364.
12. Beutler, E. (1975). Red cell metabolism, A Manual of Biochemical Methods, Grune Strottan, New York.
13. Carlberg, I., Mannervik, B. (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 250, 5475–5480.
14. Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249 (71), 30–39.
15. Elman, G.L. (1959). Tissue sulphhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70–77.
16. Lowry, O.H., Rosenberough, N.J., Farr, A.L., Randal, R.J. (1951). Protein measurement with folinphenol reagent. *Journal of Biochemistry*, 193, 265–275.
17. Alsharif, N.Z., Hassoun, E.A. (2004). Protective effects of Vitamin A and Vitamin E succinate against 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-Induced bodywasting, hepatomegaly, thymic atrophy, production of reactive oxygen species and DNA damage in C57BL/6J mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 95, 131–138.
18. Bandyopadhyay, U., Das, D., Banerjee, R.K. (1999). Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Current Science*, 77(5), 658–666.
19. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical*

- Biochemistry, 95, 351–358.
20. Manju, M., Akbarsha, M.A., Oommen, O.V. (2012). In vivo protective effect of dietary curcumin in fish *Anabas testudineus* (Bloch). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38, 309–318.
  21. Piner, P., 2009. Lambda-cyhalothrinin *Oreochromis niloticus*'da karaciğerde piperonil bütoksit modülatörlüğünde oksidatif stres potansiyelinin belirlenmesi, stres proteinleri ve apoptozis üzerine etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
  22. Pena-Llopis, S., Pena, J.B., Sancho, E., Fernandez-Vega, C. and Ferrando, M.D., 2001. Glutathione-dependent resistance of the European eel *Anguilla anguilla* to the herbicide molinate, *Chemosphere*, 45, 671–681.
  23. Piner, P., 2005. Fenthion içeren ortamda BSO ve NAC'nin *Oreochromis niloticus*'da beyin dokusunda glutatyon metabolizması, lipid peroksidasyonu ve asetilkolinesteraz aktivitesine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
  24. Durmaz Pekmezci, H., 2010. Aşağı Seyhan Ovası Drenaj Sistemlerindeki Kirlilik Etmenlerinin *Clarias gariepinus*'da toksik etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
  25. Rinaldi, A.L., Morse, M.A., Fields, H.W., Rothas, D.A., Pei, P., Rodrigo, K.A., Renner, R.J., Mallery, S.R. (2002). Curcumin activates the aryl hydrocarbon receptor yet significantly inhibits (-)-Benzo(a)pyrene-7R-trans-7,8-dihydrodiol bioactivation in oral squamous cell carcinoma cells and oral mucosa. *Cancer Research*, 62, 5451–5456.