

**ARI SÜTÜNÜN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*)  
DİYETLERİNDE BAZI BÜYÜME (GH ve IGF-I)  
VE İMMÜN SİSTEM (TGF- $\beta$ ) DOKU SPESİFİK GEN  
EKSPRESYONLARI ÜZERİNE OLAN ETKİSİ**

**Onur VURAL**

**Yüksek Lisans Tezi  
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı  
Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı  
Doç. Dr. Ercüment AKSAKAL**

**2015**

**Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ARI SÜTÜNÜN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) DİYETLERİNDE  
BAZI BÜYÜME (GH ve IGF-I) VE İMMÜN SİSTEM (TGF- $\beta$ ) DOKU  
SPESİFİK GEN EKSPRESYONLARI ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

Onur VURAL

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI  
Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM  
2015

Her hakkı saklıdır



ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

ARI SÜTÜNÜN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) DİYETLERİNDE BAZI  
BÜYÜME (GH ve IGF-I) ve İMMÜN SİSTEM (TGF- $\beta$ ) DOKU SPESİFİK GEN  
EKSPRESYONLARI ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

Doç. Dr. Ercüment AKSAKAL danışmanlığında, Onur VURAL tarafından hazırlanan bu çalışma 15/11/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı – Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Sibel SİLİCİ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Ercüment AKSAKAL

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Ahmet Necdet SİRKECİOĞLU

İmza:

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 03/12/2015 tarih ve 48/1629 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM  
Enstitü Müdürü

Bu çalışma TÜBİTAK-COST 2515 projesi kapsamında desteklenmiştir.  
Proje No:1140755

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ARı SÜTÜNÜN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) DİYETLERİNDE BAZI BÜYÜME (GH ve IGF-I) ve İMMÜN SİSTEM (TGF- $\beta$ ) DOKU SPESİFİK GEN EKSPRESYONLARI ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

Onur VURAL

Atatürk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı  
Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ercüment AKSAKAL

Bu çalışmada Zebra balığı (*Danio rerio*) diyetlerine farklı oranlarda (%0,0 (D1), %0,1 (D2), %0,4 (D3), %1,6 (D4) ve %6,4 (D5)) ilave edilen arı sütünün bazı büyüme (GH-I ve IGF-I) ve immün sistem (TGF- $\beta$ ) hormonları üzerine transkriptomik seviyede etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla 8 hafta boyunca beslenen balıklardan deneme başlangıcı ve sonunda kas, karaciğer ve böbrek doku örnekleri alınmıştır. Bu dokulardan RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Real time PCR uygulamaları ile büyüme hormonu (GH-I), insülin benzeri büyüme hormonu (IGF-I) ve transforme büyüme faktörü beta (TGF- $\beta$ ) gen ekspresyonları belirlenmiştir. Ayrıca; hepato somatik indeks, spesifik büyüme oranı, oransal büyüme, yem değerlendirme oranı ve yaşama gücü oranları belirlenmiştir.

Büyüme parametreleri bakımından diyet grupları arasında  $p>0,05$ 'e göre önemli bir farklılık görülmemiştir. Böbrek dokularındaki GH-I mRNA seviyesi gruplar arasında farklılık göstermemesine rağmen, kas dokusunda D4 ve karaciğer dokularında D5 grubunda en yüksek değerde olduğu belirlenmiştir. IGF-I mRNA seviyesi tüm dokularda en yüksek D5 grubunda tespit edilmiştir. TGF- $\beta$  kas dokusunda farklılık görülmezken, karaciğer dokusunda en yüksek D3 grubunda ve böbrek dokusunda da D1 grubunda görülmüştür. Tüm diyet gruplarına gen ekspresyonu açısından bakıldığında GH-I ile IGF-I arasında doğru bir orantı olduğu sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak, diyetlere artan oranda arı sütü ilavesinin Zebra balıklarında büyüme hormonlarına ait genleri (GH-I, IGF-I) önemli derecede artırdığı ve büyümeyi inhibe eden TGF- $\beta$ 'yi azaltarak transkriptomik seviyede olumlu etkilediği kanatine varılmıştır.

**2015, 74 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Arı sütü, zebra balığı, büyüme, immün sistem, gen ekspresyonu

## ABSTRACT

Master Thesis

### **EFFECT of ROYAL JELLY on SOME GROWTH (GH and IGF-I) and IMMUNE SYSTEM (TGF- $\beta$ ) TISSUE SPESIFIC GENE EXPRESSION in ZEBRA FISH (*Danio rerio*) DIET**

Onur VURAL

Atatürk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Agricultural Biotechnology  
Department of Animal Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ercüment AKSAKAL

In this study, effects of different level (0.0% (D1), 0.1% (D2), 0.4% (D3), 1.6% (D4) and 6.4% (D5)) of royal jelly in Zebra fish (*Danio rerio*) diets were investigated on some growth (GH-I and IGF-I) and immune system (TGF- $\beta$ ) hormones at transcriptomic level. For this purpose, muscle, liver and kidney tissue samples were obtained from fish which was feed during 8 weeks. Growth hormone (GH-I), insulin like growth factor (IGF-I) and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) gene expression were determined from these tissues by RNA isolation, cDNA synthesis and Real time PCR applications. Also, hepatosomatic index, specific growth rate, relative growth rate, feed conservation rate and survival were calculated. No significant difference was observed on growth parameters in diet groups ( $p>0.05$ ).

No significant differences were observed in the growth parameters between the dietary groups ( $p>0.05$ ). Although GH-I mRNA levels were no different on kidney among the groups, the highest value was determined on muscle tissue of D4 and on liver of D5 ( $p>0.05$ ). The highest level of IGF-I m RNA level was observed on D5 group in all tissue. The highest TGF- $\beta$  mRNA level was detected in liver tissue of D3 and kidney tissue of D1, while TGF- $\beta$  mRNA level in muscle tissue was no difference in all diet groups. It was concluded that a direct proportion between GH-I/IGF-I in all dietary groups.

At the and of experiment, higly supplemented royal jelly in zebrafish diets was increased growth hormone genes (GH-I, IGF-I) expression and was inhibited TGF- $\beta$  on transcriptomic level.

**2015, 74 pages**

**Keywords:** Royal Jelly, zebra fish, growth, immune system, gene expression

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunulan bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TUBİTAK) tarafından 1140755 nolu TUBİTAK-COST 2515 programı Araştırma Projesi kapsamında alınan destek ile Sayın Doç. Dr. Ercüment AKSAKAL yöneticiliğinde hazırlanmıştır. Bu tez kapsamında verdikleri destekten dolayı öncelikli olarak TUBİTAK-COST birimine teşekkür ederim.

Tez çalışmamın başlangıcından itibaren her aşamasında tecrübelerini benim ile paylaşan ve her alanda bana destek çıkan özgür ve düzeyli bir çalışma imkânı sunan danışmanım Sayın Doç. Dr. Ercüment AKSAKAL'a, çalışmalarımın en başından beri her türlü desteği sağlayan bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet Necdet SİRKECİOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca değerli katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Sibel SİLİCİ'ye, Doç. Dr. Harun BUDAK'a zebra balık yemlerinin yapımında yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Halil İbrahim HALİLOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. Murat ARSLAN'a zebra balık dokularının çıkarılmasında yardımcı olan Doç. Dr. Abdulkadir BAYIR'a, Yrd. Doç. Dr. Mehtap BAYIR'a, laboratuvar ve tez çalışmalarımda desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen her zaman yanımda olan değerli çalışma arkadaşlarım; Sayın Abdullah TUNÇ'a Sayın Elif BASTEM'e ve Sayın Esra GÜNAYDIN'a, çalışmalarımın en yoğun dönemlerinde bana moral ve motivasyon veren değerli dostlarım; Sayın Esmâ YİĞİDER'e, Sayın Yusuf Zekeriya BALIK'a, Sayın Mustafa YILGIN'a, Sayın Arş. Gör. Sibel TURAN'a ve Sayın Ahmet KARAKUŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreç boyunca maddi ve manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim babam Murat VURAL'a ve ailemin tüm bireyelerine gönülden teşekkür ederim.

**Onur VURAL**

**Kasım, 2015**

## İÇİNDEKİLER

|  |           |
|--|-----------|
| ÖZET.....  | i         |
| ABSTRACT .....   | ii        |
| TEŞEKKÜR.....  | iii       |
| SİMGELER DİZİNİ.....   | vii       |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....   | xi        |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....  | xiii      |
| <b>1. GİRİŞ.....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1. Zebra Balığı ( <i>Danio rerio</i> ) Hakkında Genel Bilgiler ..... | 3         |
| 1.2. Arı Sütü .....  | 4         |
| 1.3. Büyüme (GH-IGF) ve immün Sistem (TGF- $\beta$ ) hormonları .....  | 8         |
| <b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>  | <b>10</b> |
| <b>3. MATERYAL ve METOT .....</b>                                      | <b>21</b> |
| 3.1. Materyal.....   | 21        |
| 3.1.1. Araştırma yeri ve süresi.....                                   | 21        |
| 3.1.2. Balık materyali .....   | 21        |
| 3.1.3. Su materyali.....   | 21        |
| 3.1.4. Model organizma ünitesi .....                                   | 22        |
| 3.1.4.a. Sediment filtre .....   | 23        |
| 3.1.4.b. Karbon filtre .....   | 23        |
| 3.1.4.c. Granül aktif karbon filtre .....                              | 23        |
| 3.1.4.d. Blok karbon filtre .....                                      | 23        |
| 3.1.4.e. Membran filtre .....  | 23        |
| 3.1.4.f. Mineralli karbon filtre .....                                 | 23        |
| 3.1.4.g. Dinlendirme tankları.....                                     | 24        |
| 3.1.4.h. Araştırma tankları.....                                       | 24        |
| 3.1.4.i. Isıtma-soğutma ünitesi .....                                  | 24        |
| 3.1.4.i. Denge tankları .....  | 24        |
| 3.1.4.j. Pompalar.....   | 24        |
| 3.1.4.k. Oksijen jeneratörü .....                                      | 25        |

|  |    |
|--|----|
| 3.1.4.1. Akıllı oksijenmetre (Smartoxy).....                       | 25 |
| 3.1.4.m. Ortam soğutma ünitesi .....                               | 25 |
| 3.1.4.n. Torba Filtreler.....                                      | 25 |
| 3.1.4.o. UV reaktörü.....  | 25 |
| 3.1.4.ö. Biyolojik filtre .....                                    | 26 |
| 3.1.4.p. Bioball .....   | 26 |
| 3.1.4.r. Biyolojik elementler.....                                 | 26 |
| 3.1.4.s. Otomasyon panosu.....                                     | 26 |
| 3.1.4.t. Fotoperiyot .....   | 26 |
| 3.1.5. Yem materyali .....   | 27 |
| 3.2. Metot .....   | 28 |
| 3.2.1. Denemede kullanılan yemlerin hazırlanması .....             | 28 |
| 3.2.2. Aklimatizasyon, deneme dizaynı ve besleme çalışmaları ..... | 29 |
| 3.2.3. Büyüme performansının belirlenmesi .....                    | 29 |
| 3.2.3.a. Ortalama canlı ağırlık artışı .....                       | 30 |
| 3.2.3.b. Spesifik büyüme oranı.....                                | 30 |
| 3.2.3.c. Yem değerlendirme oranı .....                             | 30 |
| 3.2.3.d. Yaşama oranı .....  | 31 |
| 3.2.3.e. Hepatosomatik indeks değeri.....                          | 31 |
| 3.2.4. Balıklardan doku örneklerinin alınması .....                | 31 |
| 3.2.5. Total RNA izolasyonu.....                                   | 31 |
| 3.2.5.a. Robotta total RNA izolasyonu.....                         | 32 |
| 3.2.5.b. Manuel total RNA izolasyonu .....                         | 32 |
| 3.2.5.c. RNA'nın kantitatif tayini.....                            | 34 |
| 3.2.5.d. RNA'nın kalitatif tayini.....                             | 34 |
| 3.2.5.e. 500 ml DEPC hazırlanışı .....                             | 35 |
| 3.2.5.f. 20×MOPS solüsyonunun hazırlanışı (500 ml).....            | 35 |
| 3.2.5.g. 1×MOPS solüsyonunun hazırlanışı;.....                     | 36 |
| 3.2.5.h. RT-PCR ile cDNA sentezi .....                             | 36 |
| 3.2.5.i. Genlere spesifik primer ve TaqMan prob dizaynı.....       | 37 |
| 3.2.5.i. Real time PCR uygulamaları.....                           | 37 |
| 3.2.5.j. Gen ekspresyonu hesaplamaları .....                       | 38 |



|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.6. Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.....                   | 40        |
| <b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>  | <b>41</b> |
| 4.1. Bireysel Ortalama Canlı Ağırlık Değişimi .....                              | 41        |
| 4.2. RNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Değerleri.....                              | 42        |
| 4.3. Oransal Büyüme (OB).....  | 44        |
| 4.4. Spesifik Büyüme Oranı (SBO).....  | 45        |
| 4.5. Yem Değerlendirme Oranı ve Yaşama Oranı .....                               | 45        |
| 4.6. Hepatosomatik İndeks (HSİ) .....  | 46        |
| 4.7. Kas, Karaciğer ve Böbrek Dokularında GH-I mRNA Seviyesi .....               | 47        |
| 4.8. Kas, Karaciğer ve Böbrek Dokularında IGF-I mRNA Seviyesi .....              | 50        |
| 4.9. Kas, Karaciğer ve Böbrek Dokularında TGF- $\beta$ mRNA Seviyesi .....       | 52        |
| <b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>  | <b>55</b> |
| 5.1. Büyüme ve HSİ Değerlerine İlişkin Tartışma .....                            | 55        |
| 5.2. Büyüme Hormonlarının Transkriptomik Seviyede Karşılaştırılması.....         | 57        |
| 5.2.1. Kas, karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen GH-I mRNA seviyesi..... | 57        |
| 5.2.2. Kas, karaciğer ve böbrek dokularından IGF-I mRNA seviyesi .....           | 58        |
| 5.2.3. Kas, karaciğer ve böbrek dokularında TGF- $\beta$ mRNA seviyesi.....      | 59        |
| KAYNAKLAR .....  | 61        |
| ÖZGEÇMİŞ .....   | 74        |

## SİMGELER DİZİNİ

|                  |   |
|------------------|---|
| %                | Yüzde                                     |
| °C               | Santigrat Derece                          |
| µg               | Mikrogram                                 |
| µL               | Mikrolitre                                |
| µm               | Mikrometre                                |
| µM               | Mikromolar                                |
| ♀                | Erkek                                     |
| ♂                | Dişi                                      |
| 10-HDA           | 10-hidroksi-2-dekanoik asid               |
| 8-OHdG           | 8-hidroksi-2-deoksiguanozin               |
| 9-HDA            | 9-hidroksi-2E-dekonoik asit               |
| 9-ODA            | 9-oxo-2E-dekonoik asit                    |
| A <sub>260</sub> | 260 dalga boyu                            |
| A <sub>280</sub> | 280 dalga boyu                            |
| ALP              | Alkalen fosfataz                          |
| ALT              | Alanin Aminotransferaz                    |
| ARA              | Araşhidonik Asit                          |
| AST              | Aspartat Aminotransferaz                  |
| B1               | Tiyamin                                   |
| B2               | Riboflavin                                |
| B3               | Niyasin                                   |
| B5               | Pantotenik Asit                           |
| B6               | Piridoksin                                |
| B9               | Folik Asit                                |
| BAMBİ            | BMP ve Aktivin Membran Bağlayan İnhibitör |
| bç               | Baz Çifti                                 |
| BMP              | Kemik Morfolojik Protein                  |
| BTU              | İngiliz Isı Birimi                        |
| BUN              | Kan Üre Nitrojen                          |

|          |  |
|----------|--|
| CAT      | Katalaz  |
| cDNA     | Komplementer Deoksiribonükleik Asit              |
| CH3H/Hej | A chalcone 3-hydroxylase                         |
| cm       | Santimetre                                       |
| CMC      | Karboksi Metil Selüloz                           |
| CP       | Cisplatin  |
| Cu       | Bakır  |
| CYP1A1   | Sitokrom P450 1A1                                |
| ddH2O    | Deiyonize Distile Su                             |
| DEPC     | Dietil Pirokarbonat                              |
| DHA      | Dokosaheksaenoik Asit                            |
| dk       | Dakika   |
| DNA      | Deoksiribonükleik Asit                           |
| EDTA     | Etilendiamintetraasetik Asit                     |
| Elovl2   | Yağ Asidi Elangoz 2 Büyüme Farklılaşma Faktörü   |
| EPA      | Eikosapentaenoik Asit                            |
| Fabps    | Yağ asidi bağlayıcı protein                      |
| Fe       | Demir  |
| GH       | Büyüme Hormonu                                   |
| GHR      | Büyüme Hormonu Reseptörü                         |
| GM       | Genetik Modifiye                                 |
| gr       | Gram   |
| GSHPx    | Glutatyon Peroksidaz                             |
| HepG2    | Karaciğer Hepatosellüler Hücresi                 |
| hnRNA    | Heterojen nüklear RNA                            |
| HSP-70   | Isı şok proteini-70                              |
| HUFA     | Yüksek Doymamış Yağ Asidi                        |
| IGF-1R   | İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Tip 1 Reseptörü   |
| IGF-2R   | İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Tip 2 Reseptörü   |
| IGFBP    | İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein |
| IGFBPs   | Spesifik bağlayıcı proteinler                    |

|                |   |
|----------------|---|
| IGF-I          | İnsülin benzeri büyüme faktörü                  |
| K              | Potasyum  |
| kg             | Kilogram  |
| LA             | Linoleik Asit                                   |
| lt             | Litre   |
| mcc            | Metilkrotonil CoA Karboksilaz                   |
| MDA            | Malondialdehit                                  |
| Mg             | Magnezyum                                       |
| mg             | Miligram  |
| ml             | Mililitre                                       |
| mm             | Milimetre                                       |
| Mn             | Mangan  |
| MOPS           | Morfolinpropansülfonik Asit                     |
| mRNA           | Mesajcı / Haberci Ribonükleik Asit              |
| N              | Azot  |
| Na             | Sodyum  |
| ng             | Nanogram  |
| nm             | Nanometre                                       |
| NO             | Nitrik oksit                                    |
| O <sub>2</sub> | Oksijen   |
| OB             | Oransal Büyüme                                  |
| PACAP          | Hipofiz Adenilat Siklaz Aktive Edici Polipeptit |
| PAR            | Parasetamol                                     |
| PBDE-47        | 2,20,4,40-Tetrabromodi-Fenil Eter               |
| pcca           | Propionil Coa Karboksilaz-A                     |
| PCR            | Polimeraz Zincir Reaksiyonu                     |
| PNG            | Pljkdldhk                                       |
| PPAR           | Peroksizom Proliferatörü Aktive Eden Reseptör   |
| PRP            | Trombositten Zengin Plazma                      |
| PUFA           | Çoklu Doyamamış Yağ Asidi                       |
| RJ             | Arı Sütü  |
| RNA            | Ribonükleik Asit                                |

|                 |   |
|-----------------|---|
| rpm             | 1 Dakikadaki Rotor Devir Sayısı                         |
| rRNA            | Ribozomal Ribonükleik Asit                              |
| RT-PCR          | Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu        |
| SBO             | Spesifik Büyüme Oranı                                   |
| SOD             | Süperoksit Dismutaz                                     |
| TGF- $\beta$ BR | Dönüştürücü Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein            |
| TGF- $\beta$    | Dönüştürücü Büyüme Faktörü $\beta$                      |
| TM              | Testesteron Miktarları                                  |
| TSH- $\beta$    | Tirotropin Beta   |
| TTR             | Trioid hormon   |
| TUBİTAK         | Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu Türkiye |
| UV              | Ultraviyole   |
| V               | Volt  |
| VTG             | Vitellus Oluşumu  |
| Wi              | Deneme Başı Balık Ağırlığı                              |
| Ws              | Deneme Sonu Balık Ağırlığı                              |
| YDO             | Yem Değerlendirme Oranı                                 |
| YEPD            | Maya Özütü Peptonlu Dekstroz                            |
| YO              | Yaşama Oranı  |
| Zn              | Çinko   |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Şekil 3.1. Dişi (a) ve erkek (b) Zebra Balığı ( <i>Danio rerio</i> ) .....  | 21 |
| Şekil 3.2. Araştırmada kullanılan model organizma ünitesi .....   | 22 |
| Şekil 3.3. Araştırmada kullanılan yemlerin pelet haline getirilmesi, liyofilize edilmesi ve 1400µ, 1000µ,800µ'luk eleklerden geçirilmesi .....                            | 28 |
| Şekil 3.4. Araştırmada kullanılan 10 Lt Lik zebra balık tankları.....   | 29 |
| Şekil 3.5. Araştırmada RNA izolasyonunda kullanılan QIACUBE otomatik izolasyon robotu. Araştırmada dokuların parçalanmasında kullanılan Tissuelyser LT .....              | 33 |
| Şekil 3.6. Araştırmada kullanılan <sup>14</sup> Drop™ Plate nanodrop spektrofotometre.....  | 34 |
| Şekil 3.7. cDNA sentezi oluşturmada kullanılan PCR .....  | 37 |
| Şekil 4.1. Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı ( <i>Danio rerio</i> )'nın deneme süresince ortalama bireysel canlı ağırlık artışları (g)..... | 41 |
| Şekil 4.2. İzole edilen RNA'ların % 1'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri.....  | 44 |
| Şekil 4.3. Farklı oranlarda beslenen arı sütünün Zebra balığı ( <i>Danio rerio</i> ) deneme süresince oransal büyüme (OB) değerleri (%) .....                             | 45 |
| Şekil 4.4. Arı sütü ile beslenen Zebra balığı ( <i>Danio rerio</i> )'nın deneme sonunda hepatosomatik indeks değerleri (%). .....   | 47 |
| Şekil 4.5. Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı ( <i>Danio rerio</i> )'nın kas dokusu GH-I mRNA seviyesi.....                                  | 48 |
| Şekil 4.6. Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı ( <i>Danio rerio</i> )'nın karaciğer dokusu GH-I mRNA seviyesi. ....                           | 49 |
| Şekil 4.7. Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı ( <i>Danio rerio</i> )'nın böbrek dokusu GH-I mRNA seviyesi. ....                              | 49 |
| Şekil 4.8. Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı ( <i>Danio rerio</i> )'nın kas dokusu IGF-I mRNA seviyesi. ....                                | 51 |
| Şekil 4.9. Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı ( <i>Danio rerio</i> )'nın karaciğer dokusu IGF-I mRNA seviyesi.....                           | 51 |
| Şekil 4.10. Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı ( <i>Danio rerio</i> )'nın böbrek dokusu IGF-I mRNA seviyesi. ....                            | 52 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Şekil 4.11.</b> Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı<br>( <i>Danio rerio</i> )'nın kas dokusu TGF- $\beta$ mRNA seviyesi .....      | 53 |
| <b>Şekil 4.12.</b> Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı<br>( <i>Danio rerio</i> )'nın karaciğer dokusu TGF- $\beta$ mRNA seviyesi..... | 53 |
| <b>Şekil 4.13.</b> Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı<br>( <i>Danio rerio</i> )'nın böbrek dokusu TGF- $\beta$ mRNA seviyesi .....   | 54 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Çizelge 1.1. Zebra Balığının Özellikleri.....   | 3  |
| Çizelge 1.2. Arı sütünün içeriği .....  | 6  |
| Çizelge 1.3. Arı sütünün besinsel içeriği .....   | 6  |
| Çizelge 2.1. Hayvan ve hücre kültürü deneylerinde arı sütünün biyolojik ve farmakolojik etkileri .....  | 19 |
| Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan suyun kimyasal özellikleri .....  | 22 |
| Çizelge 3.2. Farklı oranlarda arı sütü ilave edilen araştırma diyetleri ile hazırlanan diyetlerin bileşimi, besin madde kompozisyonları .....   | 27 |
| Çizelge 3.3. RNA'nın kalitatif tayini için kullanılan kimyasallar .....   | 35 |
| Çizelge 3.4. Real time PCR karışımı .....   | 38 |
| Çizelge 3.5. Zebra balığı'nda kullanılacak primer ve problara ait dizilim bilgileri, ürün uzunluğu ve genbank erişim numaraları.....  | 39 |
| Çizelge 4.1. Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı ( <i>Danio rerio</i> )'nın deneme süresince ortalama bireysel canlı ağırlık artışları (g) ...                                  | 42 |
| Çizelge 4.2. Total RNA konsantrasyonları (ng/μL) ve 260/280 (nm) oranları .....   | 43 |
| Çizelge 4.3. Arı sütünün Zebra balığı ( <i>Danio rerio</i> )'nın deneme süresince oransal büyüme (OB), spesifik büyüme oranı (SBO), yem değerlendirme oranı (YDO) ve yaşama oranı (YO) değerleri (%). ..... | 46 |
| Çizelge 4.4. Kas, karaciğer ve böbrek dokularında IGF-I, GH-I ve TGF-β mRNA seviyesi değerleri .....  | 54 |



## 1. GİRİŞ

TÜBİTAK tarafından oluşturulan Vizyon 2023 Teknoloji Öngörü Çalışması raporunda biyoteknoloji, en kritik beş teknoloji faaliyeti arasında yer almış ve Türkiye'nin gelecekte biyoteknoloji alanında küresel bir güç haline gelme potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir. Son yirmi yılda, moleküler biyoloji ve gen teknolojileri alanlarındaki araştırmaların ivme kazanması ile beraber biyoteknoloji hızla gelişen bir bilim dalı olmuştur. Biyoteknoloji, dünyanın karşı karşıya kaldığı birçok sağlık, doğal kaynak ve ekosistemlerin sürdürülebilirliğine ilişkin sorulara teknolojik çözümler sunmakta ve farklı endüstrilerdeki kullanımları ile verimlilik artışına büyük katkılar sağlamaktadır. Tarım alanlarının yanlış değerlendirmeler sonucu giderek azalması insanoğlunun yüzünü alternatif olarak okyanuslardan elde edilen tüketime uygun veya herhangi bir hizmet amaçlı kullanılacak sucül organizmalara çevirmesine neden olmuştur (Anonim 2015).

Son yıllarda moleküler genetik alanındaki gelişmeler doğrultusunda, besin öğelerinin daha iyi tanınması ve beslenme bilincinin artmasıyla nutrigenomik bilimi, çok tartışılan ve ilgi çeken bir alan haline gelmiştir. Beslenme ile genetik yapı arasındaki ilişkilerin anlaşılması hayvan yetiştiriciliğinde maliyetin önemli bir kısmını kapsayan yemlerin öneminin kavranmasını ve hayvan besleme konusunda yeni besleme programlarının oluşturulmasını teşvik etmiştir. Genomik, proteomik, transkriptomik ve biyoinformatik teknolojilerindeki gelişmeler hayvanların beslenmesinde bu ilişkilerin temelinde yatan mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Bu teknolojiler sayesinde, daha dengeli rasyonlar hazırlanarak, ileride daha sağlıklı, ekonomik hayvansal ürünler geliştirmek ve hastalık risklerini azaltmak mümkün olabilecektir (İpçak vd 2015).

Gerek nüfus artışı gerekse refah seviyesinin yükselmesi sonucu su ürünlerine olan talep artışının ancak yetiştiricilik yoluyla takviye edilebileceği değerlendirilmektedir (Şahin 2003). Sucül organizmaların insan gıda tüketiminde kullanılmasına yönelik yapılan çalışmaların başında kültür balıkçılığı gelmektedir. Ülkemizde 1970'li yıllarda başlayan kültür balıkçılığı uygulamalarında hızlı bir gelişme kaydedilmesine rağmen henüz

gelişmiş ülkelerdeki yetiştiricilik potansiyeline ulaşamamıştır. Dolayısıyla bu konuda yapılacak çalışmaların önemi ve gereği ciddi bir ihtiyaç olarak ortaya çıkmaktadır (Yavuzcan vd 2010).

Son on yıl içerisinde, dünyadaki kültür balıkçılığı üretimi yüksek oranda artış göstermiştir. Ancak balık yemlerinde kullanılan balık kaynaklı hammaddeler üretimdeki artış talebini karşılayamayacak duruma gelmiştir. Yetiştiricilikteki bu artışın beklenen seviyede ve sürdürülebilir bir şekilde devam edebilmesi için ihtiyaç duyulacak yem hammaddelerinin nasıl ve nereden karşılanacağı konusu bilim insanlarınca ve özellikle balık besleme uzmanları tarafından cevap aranan önemli bir konudur. Bu kapsamda yetiştiriciliğin aynı hızda büyümesini sürdürmesi alternatif yem kaynaklarının araştırılmasına, yem ve besleme tekniklerinin geliştirilmesi ile ilgili Ar-Ge çalışmalarına ihtiyaç vardır (Ergün 1997).

Kültür balıkçılığının en yüksek girdisini %65-70 oranında balık yemi oluşturmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalar genellikle balık yemi endüstrisinde balık yağı ve ununa ikame olarak kullanılacak farklı yağ ve protein kaynaklarının araştırılması üzerine yapılmıştır. Bunların başında balık yağı üretimi bakımından daha dengeli ve daha ucuz bitkisel yağ kaynakları gelmektedir. Bitkisel kaynaklı yağlarla yapılan çalışmalar, bu yağ kaynaklarının kısmen veya tamamen balık yağının yerine balıkların büyüme performansını olumsuz yönde etkilemeden kullanılabileceğini göstermektedir (Dernekbaşı ve Karayücel 2010).

Kültür balıkçılığında, balıkların metabolizmalarında bulunan fakat istenmeyen bileşikler daha az ve doğal olarak sentezlenmeyen ancak insan tüketiminde önem arz eden bileşikler de daha fazla içermesi arzu edilmektedir. Farklı organizmalardan elde edilen ve bilimsel çalışmalarda etkinliği kanıtlanmış katkı maddeleri ya da farklı bileşikler, daha kısa sürede, istenilen büyüklükte ve olgunlukta balık elde edilmesi amacıyla diyetlerde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda kullanılan katkı maddelerine konjuge linoleik asit (Ramos *et al.* 2008; Kennedy *et al.* 2007), mısır gluteni (Sugiura *et al.* 1998), soya küspesi (Hertrampf and Pascual 2000), kanola tohumu yağı (Thiessen

2004) örnek verilebilir. Özellikle sağlık üzerine şaşırtıcı ölçüde olumlu etkilerinden dolayı son yıllarda arı sütü üzerine olan ilgi de oldukça yoğunluk kazanmıştır. Bal, arı poleni, arı sütü, propolis ve arı zehri gibi arı ürünleri besleyici özellikleri ve sağlık üzerine olumlu etkileri nedeniyle son yıllar da araştırmacıların ilgi odağı olmuştur.

### 1.1. Zebra Balığı (*Danio rerio*) Hakkında Genel Bilgiler

Zebra Balığı (*Danio rerio*) özellikle Güneydoğu Asya'da, Doğu Hindistan'ın Ganj Bölgesi'nde, Pakistan'da, Bangladeş'te, Nepal'de ve Myanmar'da görülmektedir. Suyun yavaş hareket ettiği yerlerde (havuzlar, göletler, göller, kanallar ve pirinç tarlaları) çok bulunmaktadır. Zebra balıkları sığ, oksijence zengin, berrak ve bitki örtüsünün sık olduğu sularda dağılım göstermektedir. Zebra balıkları sıcaklığı  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$  olan sularda sürü halinde yaşamaktadırlar (Delaney *et al.* 2002; Spence *et al.* 2006; Vargesson 2007).

**Çizelge 1.1.** Zebra Balığının Özellikleri (Fang 2003)

|                          |  |
|--------------------------|--|
| <b>Balık Türü</b>        | Zebra balığı   |
| <b>Familya</b>           | Cyprinidae   |
| <b>Latincesi</b>         | <i>Danio rerio</i>   |
| <b>İngilizcesi</b>       | Zebrafish  |
| <b>Morfolojik Yapısı</b> | Zebra balığı ismini vücudunun lateral bölgelerinde bulunan çizgilerden almaktadır. Vücut yapısı narin ve yanlardan basıktır. Ağızları üst konumludur. Dişi balıklar erkeklere nazaran daha iri ve daha belirgin karın çizgilerine sahiptir. Erkek balıklarda altın, dişi balıklarda ise sarımsı beyaz renk üzerinde parlak mavi bantlar vardır. Erginleşmemiş erkekler dişilere nazaran daha büyük anal yüzgeçlere sahiptir. |
| <b>Maximum Boy</b>       | 5 cm   |
| <b>Ortalama Boy</b>      | 2-3 cm   |
| <b>Maximum Ağırlık</b>   | 2 gr   |
| <b>Ortalama Ağırlık</b>  | 0,5 gr   |

Model organizma olarak Zebra Balığı (*Danio rerio*)'nın avantajları (Langenau *et al.* 2003);

- Ucuz olmaları,
- Yeterli kaynak birikiminin bulunması,
- Biyolojik safhalarının iyi bilinmesi,
- Dış dölllenmeyle üremeleri,
- Optimum fotoperiyod koşullarında çok sayıda yumurta vermeleri,
- Uygun koşullar altında bakımının kolay olması,
- Jenerasyonlar arası sürenin kısa olması,
- Embriyonik gelişiminin kolayca izlenebilmesi ve müdahale edilebilirliği,
- Kolay kültüre alınması,
- Deney manipülasyonlarına uygun olması,
- Etik açıdan herhangi bir sorun teşkil etmemesi
- İnsan genomu ile homolojisinin yüksek olması
- Genetik analizler için çalışılmasının kolay ve uygun olması
- Genomunun 1,7 milyar baz çiftine sahip olmasıdır.

## 1.2. Arı Sütü

Arı ürünleri arasında besin maddesi bakımından en zengin olan arı sütünün ilk kez 1623 yılında sadece ana arı için üretildiği belirlenmiştir. İngilizce’de krallara özgü anlamında “Gelatine Reale” sonraları “Royal Jelly” adı verilmiştir (Lannuzzi 1990). Arı sütü genç işçi arıların kafa içi salgı bezleri ile yutak bezi tarafından genç larva ve ergin ana arının beslenmesi için salgılanmaktadır. Arı sütü, kremi kıvamda homojen bir maddedir. Sarı, beyazımsı bir renge sahiptir. Ancak depo edildiğinde sarı renkte koyulaşma meydana gelmektedir. Fenolik bir kokuya ve ekşi bir tada sahiptir. Yoğunluğu yaklaşık 1,2 g/cm<sup>3</sup>tür (Lercker *et al.* 1992). Kolonide bulunan bütün arıların (ana arı, işçi arı ve erkek arı) larval döneminde ilk üç gün boyunca farklı içerikte olan arı sütleriyle beslendiği, fakat ana arı larvasının tüm hayatı boyunca beslenmesinde kullanılan arı sütü içeriğinin en kaliteli özelliğe sahip olduğu bulunmuştur. Bu nedenle ana arı aynı döllenmiş yumurtadan gelişmekle birlikte morfolojik, fizyolojik ve davranış özellikleri bakımından işçi arılardan farklılık gösterir. Örneğin işçi arıdan daha uzun vücut yapısına sahiptir, koloniyi birarada tutan feromonlar salgılar ve işçi arıların

yumurtalıkları gelişmemiştir. Bununla birlikte işçi arının ortalama ömür uzunluğu yaz aylarında 30-40 gün iken ana arı ortalama 5 yıl yaşayabilmektedir. Ayrıca sınıf farklılığının düzeyi ile üretilen arı sütü miktarı ve içeriği; koloni, hasat mevsimine ve sıklığına popülasyonunun büyüklüğüne, besleme şekline, arıların bulunduğu coğrafi koşullara, iklime, nektar kaynağına ve arı genotipine bağlı olarak değişebilmektedir (Kutluca vd 1998; Zheng *et al.* 2011). Koloni sayısının aşılması larva sayısı yükseldikçe, yüksek başına üretilen arı sütü miktarı azalmaktadır (Jianke *et al.* 1995). RJ protein (%12-15), şekerler (% 10-16), lipidler (%3-6), vitaminler ve serbest amino asitler den oluşmaktadır ve halk tıbbında besleyici özellikleri ile medical amaçlı kullanılmaktadır (Howe *et al.* 1985). Buna ilaveten vitaminler (biyotin, folik asit, inositol, niyasin, pantotenik asit, piridoksin, riboflavin, tiyamin, vitamin E) ve mineraller (bakır, çinko, demir, kalsiyum, manganaz, potasyum, sodyum) içermekte 10-HDA, antibakterial proteinler, üreme sistemi gelişimini stimüle eden faktör (350-kDa protein) ve monosit stimüle eden faktör gibi bileşenler de içermektedir (Lercker *et al.* 1981; Nagai and Inoue 2004). Arı sütündeki şeker içeriği önemli derecede glikoz ve fruktozdan, düşük seviyede de sakkarozdan oluşmaktadır (Lercker *et al.* 1982). Larvada kas gelişiminin tamamlanmasında arı sütü içeriğinde bulunan glikoz seviyesi büyük önem taşımaktadır. Genç ana arı larvalarının beslenmesinde kullanılan arı sütündeki şeker düzeyinin daha fazla olması, ana arıların diğer arı fertlerinden daha güçlü fiziksel özellikler kazanmasını sağlamaktadır. Arı sütünde bulunan karbonhidratlar, besleyici arılar için uyarıcı etki yapmakta ve daha çok arı sütü üretimini teşvik etmektedir (Piana 1996). Arı sütü kalitesi, içindeki 10-HDA oranına göre belirlenmekte ve kaliteli bir arı sütünde %1,4 ile %1,8 oranlarında bulunması istenmektedir. Bu miktar, arı sütünün bulunduğu bölgenin vejetasyonuna ve arı sütü hasadında yapılan uygulamalara göre farklılık arz etmektedir (Dogaroglu 1993; Sahinler vd 2005).

Arı sütü, genç larvalar ile ergin ana arıyı beslemek için genç işçi arıların hipofaringeal salgı bezlerinden salgılanan bir arı ürünüdür. Beyazdan sarıya dönen rengi, keskin, kendine has bir kokusu ve tadı vardır. Bu duyuşsal özellikler arı sütünün kalite kriteri olarak oldukça önemlidir. Arı sütü dondurulmuş bir şekilde depolanmalıdır (Bogdanov 2008). Arı sütünün besinsel içeriği Çizelge 1.2 ve Çizelge 1.3'te verilmiştir.

**Çizelge 1.2.** Arı sütünün içeriği (Sabatini 2009)

| İçerik (%)   | Taze arı sütü (%) | Liyofilize arı sütü (%) |
|--------------|-------------------|-------------------------|
| Su           | 60-70             | <5                      |
| Protein      | 9-18              | 27-41                   |
| Karbonhidrat | 7-18              | -                       |
| Yağ          | 3-8               | 8-19                    |
| Fruktoz      | 3-13              | -                       |
| Gulukoza     | 4-18              | -                       |
| Sakkaroz     | 0,5-2,0           | -                       |
| 10-HDA       | >1,4              | >3,5                    |
| pH           | 3.4-4.5           | 3.4-4.5                 |

**Çizelge 1.3.** Arı sütünün besinsel içeriği (Vecchi 1988)

| Mineraller    | Arı Sütü (mg/100 g) | Vitaminler          | Arı Sütü (mg/100 g) |
|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Potasyum (K)  | 200-1000            | Niyasin(B3)         | 4,5-19              |
| Kalsiyum (Ca) | 25-85               | Piridoksin (B6)     | 0,2-5,5             |
| Magnezyum(Mg) | 20-100              | Tiyamin (B1)        | 0,1-1,7             |
| Çinko (Zn)    | 0,7-8               | Riboflavin (B2)     | 0,5-2,5             |
| Demir (Fe)    | 1-11                | Pantotenik Asit(B5) | 3,6-23              |
| Bakır (Cu)    | 0,33-1,6            | Folik Asit (B9)     | 0,01-0,06           |

Arı sütünün kompozisyonu coğrafik ve botanik koşullara göre değişebilmektedir. Arı sütü güçlü biyolojik aktiviteleri nedeniyle geleneksel tıpta, apiterapide, kozmetikte ve ilaç sanayinde çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Arı sütünün antioksidatif özelliğinin, serbest radikallerin etkisiyle oluşabilecek bir takım rahatsızlıklara özellikle kanser, koroner ve inflamatuvar hastalıklar, nörolojik dejenerasyon ve yaşlanmaya karşı insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olduğu bildirilmektedir (Nagai *et al.* 2006; Buratti *et al.* 2007). Arı sütünün eşsiz özelliği C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub> hidroksi grubu ve dikarboksilik yağ asitlerinden kaynaklanmaktadır (Melliou and Chinou 2005; Isidorov *et al.* 2009). Arı sütünün temel doymamış yağ asidi olan 10-HDA antibiyotik (Melliou and Chinou 2005), antitümöral (Townsend *et al.* 1959, 1960; Nakaya *et al.* 2007), antioksidatif (Nagai *et al.* 2001; Nagai *et al.* 2006; Jamnik *et al.* 2007) ve hipoglisemik aktiviteleri (Kramer *et al.* 1977) gibi çeşitli farmakolojik etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Arı sütüne özgü olan 10-HDA, arı sütünün tazeliği, kalitesi ve özgünlüğünü ayırt etmek ve değerlendirmek için

kullanılmaktadır (Sabatini *et al.* 2009). Arı sütündeki 9-HDA işçi arılar tarafından üretilen 9-ODA'nın bir metaboliti olarak düşünülebilir (Noda *et al.* 2011). Bu bileşik, kraliçe arının tanınması ve balarısı kolonilerinde sınıf sisteminin korunması için işçi arıların yumurtalık gelişiminin engellenmesi gibi önemli fonksiyonlara sahip olan tanınmış bir semi-kimyasaldır (Butler 1954).

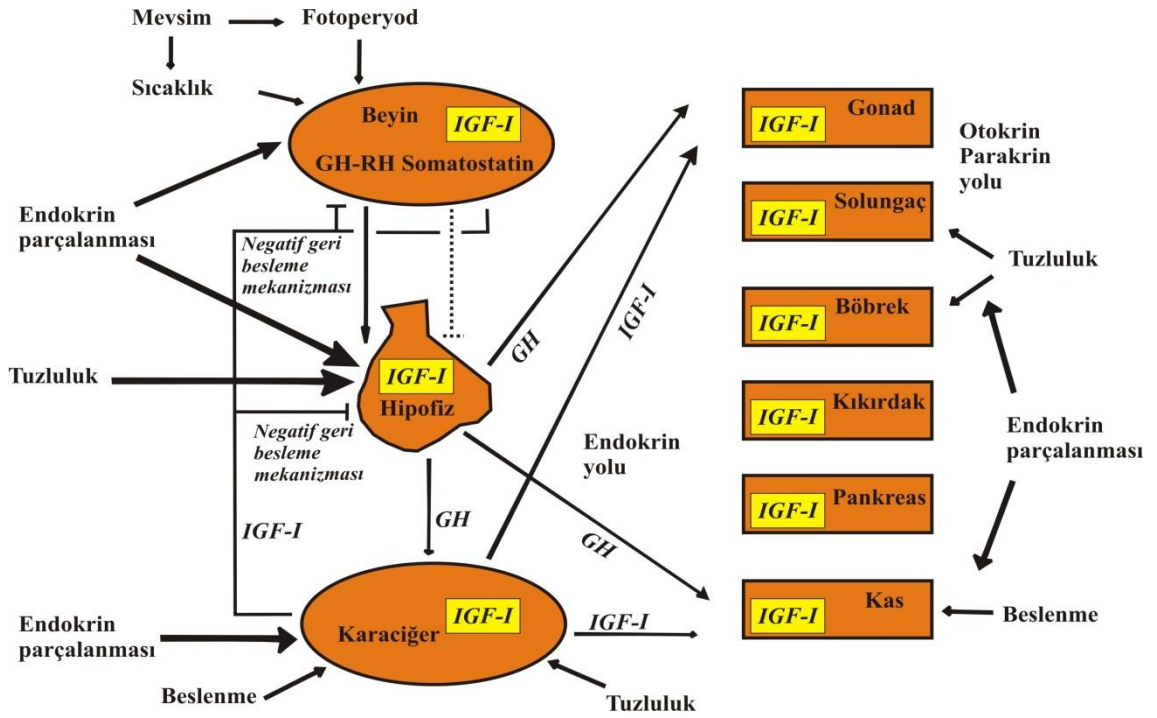
Arı sütünün en önemli komponenti olan proteinler arı sütünün kuru maddesinin yaklaşık % 50 sini oluşturur (Rembold 1987). Arı sütünün major proteinleri (MRJPs) cDNA klonlama ve sekanslama yoluyla karakterize edilmiştir (Klaudiny *et al.* 1994). Sekiz major arı sütü protein (MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4, MRJP5, MRJP6, MRJP7 ve MRJP8) karakterize edilmiştir (Albert *et al.* 1999). Bu proteinlerin bakıcı işçi arıların hipofaringeal salgı bezlerinde eksprese edildiği bulunmuştur (Kubo *et al.* 1996; Lensky and Rakover 1983). Arı sütü proteinlerinin yüksek antioksidan aktivite gösterdiği ve arı sütü hidrolizatlarından 14 antioksidatif peptid izole edildiğini göstermiştir (Guo *et al.* 2005). Arı sütünde bulunan 5,5 kDa protein olan royalisin in ve trans-10-hydroxy-2-decenoic asidin gram (+) ve (-) bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesi ispatlanmıştır (Fujiwara *et al.* 1990; Genç and Aslan 1999). MRJP lerden biri olan MRJP1 in ED50 100 mg/ml ile kültüre alınmış rat hepatositlerinin proliferasyonu ve canlılığını geliştirdiği gösterilmiştir (Kamakura *et al.* 2001; Kimura *et al.* 1995). Buna ilaveten gastrointestinal enzim hidrolizinin bir sonucu olarak MRJP1 den türevlenen peptidler spontan hipertensif ratlarda güçlü angiotensin-I converting enzim inhibitor aktivitesi göstermektedir (Matui *et al.* 2002). Bunun dışında arı sütünün çözünür fraksiyonlarının alerjik farelerin serumundaki antijen spesifik IgE seviyelerini düşürerek antialerjik aktivite gösterdiği ispatlanmıştır, ancak bu aktiviteyi gösteren arı sütü bileşikleri bilinmemektedir (Kataoka *et al.* 2001; Oka *et al.* 2001).

### 1.3. Büyüme (GH-IGF) ve immün Sistem (TGF- $\beta$ ) hormonları

IGF-I balıkların büyümesini, gelişmesini, farklılaşmasını teşvik eden ve balık dokuları arasında en çok karaciğerde eksprese olan bir bileşendir (Reinecke 2010; Siharath *et al.* 1995; Dickhoff *et al.* 1997; Plisetskaya *et al.* 1998; Duan *et al.* 1998). Serum ve hücre dışı sıvılarda IGF-I, spesifik bağlayıcı proteinlere (IGFBPs) bağlanmaktadır. (Siharath *et al.* 1995; Dickhoff *et al.* 1997; Plisetskaya *et al.* 1998). IGFBP'ler spesifik olarak IGF reseptörlerinin daha büyük veya eşit afiniteleri olan IGF-I ve IGF-II'ye bağlanan proteinlerin bir ailesidir. Bugüne kadar memeli türlerinde altı farklı IGFBP ailesi, IGFBP-1'den IGFBP-6'ya kadar belirlenmiş, izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Jones *et al.* 1995; Kelley *et al.* 1995). Bu proteinler, kan içinde taşıyıcı protein olarak görev yapmaktadır. IGF bağlayıcı proteinleri IGF reseptörleri ile etkileşime girerek IGF nin biyolojik aktivitesini düzenlemektedir.

Omurgalı hayvanlarda büyüme oranı ve sürecinin hızı, genetik ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir. (Cock 1969). GH, hipofiz bezinde sentezlenir, karaciğerde IGF-I salınımını uyarmakta ve kana verilmektedir. GH büyümeyi teşvik edici olarak IGF-I, IGF-II yapısal ve proinsülin ile ilgili 70-aa polipeptidin oluşmasını teşvik etmektedir. (Siharath 1995; Dickhoff 1997; Plisetskaya 1998; Duan 1998 ) Büyüme hormonu (GH), diğer omurgalılarda olduğu gibi hipofiz bezinin ön kısmından üretilen bir hormondur. GH tek geçişli transmembran reseptörlerine bağlanarak, hedef doku içinde GH reseptörü (GHR) olarak etki etmektedir (Pérez-Sánchez *et al.* 2002). Balıklarda GH, iyonik ve ozmotik denge, lipid, protein ve karbonhidrat metabolizması, iskelet, yumuşak doku büyümesi, üreme ve bağışıklık fonksiyonunun düzenlenmesi dahil vücuttaki hemen hemen bütün ana fizyolojik işlemlere katılmaktadır (Björnsson 1997).





**Şekil 1.1** Balıklarda GH, IGF-I sistemi (Shamblott *et al.* 1995; Vong *et al.* 2003; Aksakal 2013)

TGF- $\beta$ , çeşitli hücrel aktivitelelerin düzenlemede görev alan çok fonksiyonlu bir gendir. Memelilerde yumurtalık fonksiyonları da dahil olmak üzere üremeyi düzenlemektedir. Balıklar gibi alt omurgalılarda TGF- $\beta$ 'nın rolü tam olarak anlaşılammıştır. Zebra balığı'na ait TGF- $\beta$ 1 geninin olgun peptid bölgeleri, diğer türlerdeki TGF- $\beta$ 1 geni ile %70-75 oranında benzerlik göstermektedir. Balık türleri arasında ilk defa Zebra Balığı'nın Tip II reseptörünün cDNA sekansı çıkartılmıştır (Kohli 2003). TGF- $\beta$  ailesi yapısal olarak birbiriyle bağlantılı bir dizi büyüme faktöründen oluşmaktadır (Massague 1998; Kohli 2003). 30'dan fazla üyesi belirlenmiştir. Bu ailenin üyeleri üreme ile beraber birçok farklı gelişimsel ve fizyolojik süreçten sorumludur. TGF- $\beta$ 'nın üç değişik formunun memeli yumurtalıklarında eksprese olduğu bilinmektedir. Bunlar çeşitli türlerin yumurtalarında ve foliküler hücrelerinde tespit edilmiştir. TGF- $\beta$  folikül hücre büyümesinin baskın bir inhibitörü olarak görülmektedir (Mulheron and Schomberg 1993). Yumurta olgunlaşması üzerinde uyarıcı ve engelleyici bir etkisi olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca TGF- $\beta$ 'nın balık hücrelerin de eksprese olduğu bilinmektedir (Tsafirri 1989; Feng 1998).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bal, arı poleni, arı sütü, propolis ve arı zehri gibi arı ürünleri besleyici özellikleri ve sağlık üzerine olumlu etkileri nedeniyle son yıllarda araştırmacıların ilgi odağı olmuştur (Bogdanov 2008).

Kanbur *et al.* (2009)'na göre farelere 50 mg/kg arı sütü verilmesinin floridinin sebep olduğu eritrosit ve karaciğer dokusunda MDA seviyeleri ve SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerini, serum kolesterol, trigliserid, glikoz, total protein ve albumin seviyesi ile AST ve ALP aktivitelerini iyileştirdiğini tespit etmişlerdir.

Oksidatif stres ve cisplatin-indükleyici nefrotoksisite üzerine arı sütünün etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada araştırma materyali olarak kullanılan ratlar üzerine kontrol, cisplatin, arısütü ve cisplatin ilaveli arısütü olmak üzere sekiz gruba ayrılarak biyokimyasal ve histopatolojik metotlar ile nefrotoksisitenin ölçüsü değerlendirilmiştir. Kan dokusundan BUN, alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, trigliserid, total kolesterol, ürik asit, total bilirubin ve total protein seviyeleri, böbrek dokusundan ise MDA, GSHPx, SOD ve CAT aktivitelerinin ölçümü ve histopatolojik muayeneler belirlenmiştir. Ratlara cisplatin uygulaması serum BUN'da ve ürik asit konsantrasyonlarındaki önemli bir artış ile karakterize edilen böbrek hasarını arttırdığı ve böbrekte yüksek MDA ve daha düşük GSH-Px, SOD ve CAT aktivitelerine sahip olduğu bildirilmiştir. CP ile ilişkili RJ uygulanmış gruplarda bazı oksidatif stres parametreleri ve belli diğer biyokimyasal parametrelerde gelişmeler aktarılmıştır. Böylece arı sütünün antioksidan potansiyeli olduğu kanısı (Silici *et al.* 2011) tarafından doğrulamaktadır.

Inoue *et al.* (2003) diyet arı sütünün CH<sub>3</sub>H/Hej farelerinin ömür uzunluğu ve dokudaki DNA oksidatif hasarı üzerine etkisini araştırmıştır. Çalışmada 16 hafta boyunca arı sütü diyeti ilave edilmiş yemlerle beslenen CH<sub>3</sub>H/Hej farelerinde bir oksidatif stres markırı olan 8-OHdG seviyelerinin serum ve böbrek DNA'sında önemli oranda düştüğü

belirlenmiştir. Öte yandan, diyet arı sütünün ömür uzunluğu üzerine etkisi belirlenmiştir. Genelleştirilmiş Wilcoxon testine göre orta (yaklaşık 6mg/kg ağırlık) ve yüksek (yaklaşık 60 mg/kg ağırlık) doz uygulanan grupların %50'sinin kontrol grubundan daha uzun süre yaşadığı tespit edilmiştir. Ortalama ömür uzunluğu kontrol grubunda 88 hafta, düşük doz (yaklaşık 0,6 mg/kg ağırlık) grubunda 79 hafta, orta doz grubunda 112 hafta, yüksek doz grubunda ise 110 hafta olarak belirlenmiştir. Kontrol ile mukayese edildiğinde arı sütünün ortalama ömür uzunluğunu yaklaşık %25 oranında uzattığı, ancak toplam ömür uzunluğunu uzatmadığı kaydedilmiştir. Araştırma sonucunda arı sütünün CH<sub>3</sub>H/Hej farelerinde oksidatif hasarı azaltma yoluyla ortalama ömür uzunluğunu arttırdığı saptanmıştır.

Ratlar üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise parasetamol ile indüklenen karaciğer hasarında kontrol dahil altı gruba ayırdığı deneklere ağız yoluyla RJ ve PAR'ın farklı konsantrasyonlarını farklı sürelerde (200mg/kg RJ bir gün, 200 mg/kg RJ 7 gün, 400 mg/kg PAR bir gün, 400 mg/kg PAR+ 200mg/kg RJ bir gün, 200mg/kg RJ+400 mg/kg PAR 7 gün) uygulanmıştır. Kontrol grubuna göre serumda ALT, AST ve ALP karaciğerde MDA önemli derecede artış gösterirken karaciğerde GSH-Px seviyesinin benzer şekilde azaldığı bildirilmiştir. Diğer taraftan uzun süreli RJ uygulanan 6. grupta biyokimyasal parametreler bakımından anlamlı değişikliklerin olduğu aktarılmıştır (Silici *et al.* 2009).

Spermiyotoksisiteye yol açan sisplatin üzerine arı sütünün antiosidatif etkisini araştırmak için kantitatif, biyokimyasal ve histolojik yöntemler kullanılmıştır (Silici *et al.* 2009). Bu amaçla, sıçanlara sisplatin intra peritoneal olarak 7 mg/kg tek doz şeklinde, arı sütü ise 50 ve 100 mg/kg dozlarında on gün boyunca gavaj yoluyla uygulanmıştır. Çalışmada sperm karakteristikleri, testise ait histolojik bulgular, plazma testosteron seviyeleri ve testis dokusunun oksidatif stres durumu gibi üreme organlarının özellikleri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda arı sütünde sisplatinin neden olduğu testis, epididimis, seminal vezikül ağırlığındaki ve prostat boyunca epididimal sperm konsantrasyonu ve hareketindeki azalmayı iyileştirdiği tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile mukayese edildiğinde yalnız sisplatin uygulanan gruplarda süperoksit dismutaz,

katalaz ve glutatyon peroksidaz seviyelerinin önemli oranda azaldığı, testislerdeki malondialdehit konsantrasyonunda artışın olduğu belirlenmiştir. Öte yandan sisplatin verilen sıçanlara arı sütü uygulandığında malondialdehit seviyesinde azalış, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinde artış gözlenmiştir. Çalışmada sisplatine bağlı testislerdeki histopatolojik bulgulardaki değişimler arı sütü uygulamasıyla kısmen tersine dönmüştür. Mevcut çalışmanın sonuçları arı sütünün antioksidan potansiyelini doğrulamış ve sisplatine bağlı sperm toksisite mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlamıştır.

Arı sütünün artan konsantrasyonları ile standart kültür ortamı ilave edilen ortamda yetiştirilen *Drosophila melanogaster*'in canlılığı, gelişme zamanı, vücut büyüklüğü, verimliliği, yaşam döngüsü ve geniş ölçülü genom transkripsiyon miktarlarının ölçüldüğü bu çalışmada, arı sütünün düşük konsantrasyonlarının vücut büyüklükleri üzerine her iki cinsiyette önemli farklılıklar oluşturduğu, yüksek konsantrasyonlarının ise vücut büyüklüğünü azalttığı, ölüm oranını arttırdığı, yaşam döngüsünü kısalttığı ve verimliliği azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca her iki cinsiyet için arı sütü artan konsantrasyonuna bağlı olarak gelişim sürelerini uzattığını tespit etmişlerdir. Hızlanmış yaşlanma süreci ve kısalmış yaşam döngüsüne sebep olabilecek biyosentez ve detoksifikasyonu içeren transkripsiyonel değişiklikler besinlerden sağlanan fazla miktarda arı sütünden korunmak için hücresel işlemlerdeki değişiklikler ile bağlantılı olduğu Shorter *et al* (2015), bildirmiştir.

Diğer bir organizma olan hamstırlar üzerine Kohguchi *et al.* (2004), tarafından yapılan bir araştırmada ise testiküler fonksiyonlar üzerine RJ ile beslenmenin uzun süreli etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada 32 haftalık erkek altın hamsterlar 0 µg/g arı sütü içeren kontrol diyeti, 50 µg/g'lık arı sütü veya 500 µg/g'lık arı sütü içeren diyetler ile 12 hafta boyunca beslenmişlerdir. Deney sonunda hamsterlar testiküler fonksiyonları için intra-testiküler serbest TM ve histopatolojik değişiklikleri açısından değerlendirilmiştir. Arı sütü kullanılan gruplar doza bağlı olarak kontrol gruplarına karşın daha yüksek TM seviyeleri ve daha yoğun spermatogenez göstermişlerdir. Spermatogenez ve TM seviyelerinin yoğunluğu diyet grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında sırasıyla  $p < 0.01$

ve  $p < 0.05$  gibi anlamlı farklılıklar göstermişlerdir. Bu sonuçlar arı sütü ile uzun süreli beslenmenin erkek hemstırlarda testiküler fonksiyonların yaşa bağlı olarak azalmasını engellediğini göstermektedir.

Gmez-Requeni *et al.* (2011), yapmış oldukları çalışmada lisin ilaveli diyetlerin Zebra balıklarında metabolik etkilerini 2 boyutlu proteomik jel elektroforezi kullanarak araştırmışlardır. Zebra balığındaki amino asit profilleri dikkate alınarak oluşturulan 3 farklı diyetten birincisi kontrol grubu (2,47 gr/kg lisin içeren), ikincisi eksik lisin ilaveli (1,34 gr/kg lisin içeren) ve üçüncüsü ise aşırı lisin ilaveli (4,63 gr/kg lisin içeren) diyetlerdir. Balıklar post fertilizasyon sonrası 33. günden 49. güne kadar bu 3 diyetle beslenmişlerdir. Lisin eksikliğinin balıklardaki büyümeyi olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir. Karşılaştırmalı proteomik analizlerde gruplar arasında 45 farklı noktada farklı şekillerde ekspresyon olduğu gözlenmiştir. Bu proteinlerin 29 tanesi kastaki büyümeyi, enerji-lipid metabolizmasını, göz lensi farklılığını, şaperon aktivitesini ve apoptosizi açıklayıcı proteinler olarak tanımlanmıştır. Zebra balığı diyetlerinde lisin eksikliğinin kas proteinlerinde azalmaya, enerji kaybına, büyümede yavaşlamaya ve apoptozise, aşırı lisin ilavesinin ise glikoliz, steroid ve üreme hormonlarında artışa neden olduğu bildirilmiştir.

Karanth *et al.* (2009) balık yağı, ayçiçek yağı, keten tohumu yağı ve düşük yağ içerikli diyetlerle 10 hafta süreyle beslenen Zebra balıklarında yağ asidi bağlayıcı protein (fabps) genlerinin ekspresyon dereceleri ve yağ asidi profilleri araştırılmıştır. Diyetlerdeki farklı yağ asitleri kaynakları ile beslenen balıklarda bağırsak, beyin, kas ve karaciğer dokularında farklı yağ asidi profilleri tespit edilmiştir. Beyin dokusunda fabp7b gen ekspresyonu linoleik asitçe zengin diyetlerle, bağırsak dokusunda fabp1b ve fabp7b gen ekspresyonu linolenik asitçe zengin diyetlerle, karaciğer dokusunda fabp7b gen ekspresyonu düşük yağ içerikli diyetlerle ve kas dokusunda fabp7b gen ekspresyonu linolenik asitçe zengin ve düşük yağ içerikli diyetlerle beslenen balıklarda artış göstermiştir. Fabps genlerinin ekspresyon derecelerinin bu genlere ait hnRNA miktarları ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir.

Genetiği değiştirilmiş bitkisel kaynakların model organizma üzerinde etkilerini belirlemeyi amaçladıkları çalışmada; GM ve non-GM soya ve mısır içeren diyetlerin Zebra balıklarının yem değerlendirme, büyüme, strese karşı yanıtını araştırmış ve balıkların ağırlıklarının iki katına çıktığını belirlemişlerdir. Her iki mısır kaynağı karşılaştırıldığında büyüme bakımından GM içeren yem ile beslenenlerin diğerine göre büyüme oranının yüksek olduğu ancak SOD-1 ve HSP-70 mRNA ekspresyon seviyesinin düşük olduğu görülmüştür. Modifiye ürünlerin cinsiyet üzerine etkilerinin ayrı olduğu özellikle SOD-1 bakımından erkek ve dişi balıklarda istatistiki olarak farklı oranlarda mRNA seviyesi olduğu bildirilmiştir (Sissener *et al.* 2010).

Vitamin E'nin fetal gelişimdeki rolünü incelemek amacıyla model organizma olarak 4-6 haftalık Zebra balıklarının kullanıldığı bu çalışmada balıklar kontrol diyeti,  $\alpha$ -tokoferol ilaveli (E+) ve ilavesiz (E-) diyetlerle 1 yaşına kadar beslenmişlerdir. Tüm gruplar benzer büyüme oranları göstermiştir. Vitamin E eksikliğinin yetişkin Zebra balıklarında nörolojik hasarlara neden olduğu belirlenmiştir. Bu üç grupta da karaciğerdeki oksidatif stres ve apoptozis genlerinin ekspresyonlarında herhangi bir varyasyona rastlanmamıştır. Vitamin E ilavesiz diyetlerle beslenen yetişkin balıklardan yumurta elde edilmiş ancak elde edilen embriyolarda yine vitamin E eksikliği gözlenmiştir. Ayrıca bu gruba ait embriyolarda fertilizasyon sonrası 24. saatte yüksek oranda ölümler, 120. saatte ise anomali ve ölümler tespit edilmiştir. Bu araştırma vitamin E'nin Zebra balıklarının embriyonik gelişimleri için gerekli olduğunu gösteren ilk çalışmadır (Miller *et al.* 2012).

Benzer diğer bir çalışmada ise Lebold *et al.* (2011), yağda çözünebilir  $\alpha$ -tokoferol PUFA'nın yapısının korunması için gerekli olduğundan Zebra balıklarında  $\alpha$ -tokoferol eksikliği durumunda PUFA yapısının bozulduğu hipotezini sunmuşlardır. Balıklar yeterli ve yetersiz oranda  $\alpha$ -tokoferol, ALA ve linoleik LA asit içeren, ARA, EPA ve DHA içermeyen diyetler ile bir yıl süresince beslenmişlerdir. Vitamin E eksikliğinin n-3 ve n-6 PUFA oranını %20 oranında azalttığı, n-6/n-3 oranını ise arttırdığı kanaatine varmışlardır. Ayrıca E vitamini eksikliğinde DHA/ALA oranının %60, ARA/LA oranının ise %60 değer kaybettiği hesaplanmıştır. PUFA sentezinde görevli olan fads2

ve elovl2 mRNA ekspresyonu  $\alpha$ -tokoferol'ce yeterli diyetler ile beslenenlerde diğer yem gruplarına göre iki kat fazla olduğu ve E vitamini eksikliğinin lipid peroksidasyonun arttırdığını ve buna bağlı olarak n-3 PUFA sentez kabiliyetini düşürdüğünü ortaya koymuşlardır (Lebold *et al.* 2011).

Diğer bir vitamin çalışmasında ise Yossa *et al.* (2011) Zebra balıkları diyetlerine katılmış olan vitamin-B grubundan biyotini bağlayan ve yumurta içerisindeki bir glikoprotein olan avidin'in balıkların büyüme, hayatta kalma, yem değerlendirme oranı ve biyotin miktarını tespit edici genlerin ekspresyonu üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Balıklar 12 hafta süreyle 0, 1, 15, 30, 60 ve 120 kat ilave edilmiş 6 farklı avidin diyeti ile beslenmiştir. En yüksek ölüm oranı ve en düşük ağırlık kazancı kontrol diyeti ile beslenen balıklarda görülmüştür. Diyetteki avidin miktarı ile yem değerlendirme oranı arasında lineer bir ilişki belirlenmiştir. Tüm balıktaki en yüksek biyotin içeriği biyotinden 120 kat daha fazla avidin içeren diyetlerle beslenen balıklarda, en düşük ise kontrol ve avidin içermeyen diyetlerde görülmüştür. Diğer diyetlerle karşılaştırıldığında en yüksek acetyl CoA karboksilaz-A (acca), metilkrotonil CoA karboksilaz (mcc) ve propionil CoA karboksilaz-A (pcca) gen ekspresyon değerleri kontrol diyetinde tespit edilmiştir. Biotine göre 60 kat fazla avidin diyeti ile beslenen balıklarda bu diyetin biyotin eksikliği belirtilerine neden olduğu bildirilmiştir.

Zebra balıkları üzerinde yapılan bir çalışmada 5 farklı ticari diyet ve 2 farklı laboratuvar da hazırlanan diyetle 9 hafta süreyle beslenen balıkların büyüme, yaşama oranı ve kondüsyon faktörleri araştırılmıştır. Laboratuvar diyetleri ile beslenen balıklarda canlı ağırlık artışı diğer diyetlere göre daha yüksek bulunmuştur. Kondüsyon faktörü açısından gruplar arasında istatistiksel açıdan bir farklılık gözlemlenmezken yaşama oranı %100 ile en yüksek değerde ticari bir diyetle beslenen grupta farklılık tespit edilmiştir. Zebra balığı diyetlerinin geliştirilmesi üzerine yapılacak çalışmalar besleme çalışmalarında farklı sonuçlar verebileceğinden yeni diyetlerin formüle edilmesi önerilmektedir (Siccardi 2009).

Model bir organizma olan *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinde arı sütünün anti oksidatif etkisinin araştırıldığı çalışmada kullanılan maya, 1,2 ve 5,0 g/L olmak üzere iki farklı oranda arı sütü ile zenginleştirilmiş ve YEPD ortamı içinde geliştirilmiştir. Maya büyümesi optik yoğunluk ölçülerek belirlenmiş olup farklı zamanlarda hücre enerjisinin metabolik aktivitesi indikatör resazurin hücre metabolizma enerjisi kullanılarak ölçülmüştür ve 2',7'-dichlorofluorescein hücre içi oksidasyonu belirlemek için uygulanmıştır. Araştırmanın sonunda arı sütü dozlara bağlı olarak hücreler arası oksidasyonu azalttığı, büyüme ve büyüme fazına ilişkili olarak metabolik aktiviteyi etkilediği gözlemlenmiştir. Ayrıca arı sütünün sadece reaktif oksijen türlerinin temizleyicisi olarak hareket etmediği aynı zamanda protein ekspresyonunu da etkilediği bildirilmiştir (Jamnik *et al.* 2007).

Chen *et al.* (2010), tarafından Zebra balıkları yumurtadan çıktıktan sonra 20.günden 60. güne kadar diyetlerinde PBDE-47 ilaveli yem ile besleyerek, 38. ve 60. günlerde örnekleyerek CYP1A1, VTG, TTR, ve TSH- $\beta$  genlerinin mRNA seviyelerini belirlemişlerdir. Diyetlere katılan PBDE-47'nin balıkların gelişimini ve CYP1A1 ekspresyonunu olumlu etkilediği, ayrıca Zebra balığının moleküler, doku ve organizma çalışmaları için çok etkili bir model organizma olduğunu bildirmişlerdir.

Farklı oranlardaki arı sütünün koyun spermelerine ilave edildiği bir çalışmada; 0, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatte alınan sperm örneklerinde kinematik, plazma membranı, NO ve antioksidan üzerine arı sütünün etkileri araştırılmıştır. RJ ilavesinin sperm canlılığında önemli bir artış gösterdiği ( $p<0.05$ ) ve en yüksek artışı ise 120. saatte %1 RJ konsantrasyonunda verdiği ayrıca en belirgin koruyucu etkisinin ise depolamanın 72. saatinden sonra olduğu belirtilmiştir. Antioksidan özelliğinden dolayı arı sütü koyun spermelerinin aktivitesi, mortalite ve plazma membran fonksiyonları üzerine olumlu etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Moradi *et al.* 2013).

Aksakal-İçoğlu (2013), Gökkuşacağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) üzerinde yaptığı bir çalışmada balıkları %14 oranında nar çekirdeği, soya fasulyesi, keten tohumu yağı, balık yağı ve %7 soya fasulyesi yağı ilaveli %7 keten tohumu yağı içerikli beş farklı



diyetle sekiz hafta boyunca beslenmiş, kas ve karaciğer dokularında insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I), IGF-II, büyüme hormonu (GH-I), ve dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- $\beta$ ) mRNA seviyeleri ve bunların yanında spesifik büyüme oranı, oransal büyüme ve yaşama gücünü araştırmıştır. Nar çekirdeği yağı içerikli diyetle beslenen gruptaki balıkların kas ve karaciğer dokularında GH-I gen ifadesini diğer gruplara kıyasla daha yüksek bulmuştur. Kas dokularında IGF-II mRNA seviyesi IGF-I mRNA seviyesine göre, karaciğer dokularında ise IGF-I mRNA seviyesi IGF-II mRNA seviyesine göre daha yüksek oranda ifade edildiğini tespit etmiştir. Nar çekirdeği yağından farklı gruplarda kas ve karaciğer dokularında TGF- $\beta$  mRNA seviyesi düşük oranda olduğu belirlenmişken, nar çekirdeği yağı grubunda kontrole kıyasla daha yüksek oranda mRNA seviyesi belirtilmiştir. Nar çekirdeği yağı içerikli diyetlerle beslenen grubun kas ve karaciğer dokularında TGF- $\beta$  gen ifadesi ile yaşama oranı arasında pozitif, spesifik büyüme ve oransal büyüme oranı arasında ise negatif bir ilişkinin olduğunu tespit etmiştir. Ayrıca diyet gruplarının tamamının kas ve karaciğer dokularında; GH-I ile IGF-I genleri arasında ve spesifik büyüme oranı ile IGF-I, GH-I ve TGF- $\beta$  arasında pozitif bir korelasyon belirlerken spesifik büyüme oranı ile IGF-II arasında ise herhangi bir ilişkinin olmadığını gözlemlemiştir. Tüm bu sonuçları göz önünde bulundurarak istatistiki analizler doğrultusunda Gökkuşluğu alabalığında farklı yağ kaynaklarının TGF- $\beta$  gen ifadesini, IGF-I, IGF-II ve GH-I genlerini bunlara ilave olarak spesifik büyüme, yaşama gücü ve oransal büyümeyi önemli derecede etkilediğini ortaya koymuştur ( $p<0,05$ ).

Gomez-Requeni *et al.* (2012), *Odontesthes bonariensis* yavrularında diyetlerine farklı oranlarda ilave ettikleri bitkisel yağların büyüme ve bazı metabolik değişimlerini incelemiştir. PACAP ve PRP mRNA seviyelerini ve büyümeden sorumlu IGF ve GH yoluyla sistemin kontrolünü hormonlara ait genlerin ekspresyon derecelerini araştırmışlardır. Yağ oranının artışı ile PRP-PACAP ekspresyonunu önemli oranda azalttığı fakat GH-I, IGF-I IGF-II transkriptlerinin gruplar arasında değişmediği saptanmıştır.

*Rachycentron canadum*'da protein metabolizmasında ve sindirim sisteminde görev alan bazı enzimlere ait genlerin mRNA seviyelerinin yaşama gücü, büyüme ve değerlendirme üzerine kolza küspesinin etkisini araştırmışlar ve kolza içeren diyetlere tabi tutulan gruplarda karaciğer dokusunda aspartat aminotransferaz ve IGF-I geninin ekspresyonu kontrol gruplarına göre önemli oranda azalırken kaslardaki IGF-I gen ekspresyonunun ise önemli oranda arttığı belirlenmiştir (Luo *et al.* 2012).

Düşük su sıcaklıklarında (6°C ve 8,5°C) inkübe edilen Gökkuşacağı alabalığı yumurtalarının erken gelişim safhasında IGF-I, IGF-II, GH-I, GH-II hormonlarına ait genlerin mRNA seviyelerinin belirlendiği çalışmada ilk 24 saat içerisinde GH-I, GH-II genlerinin ekspresyonunun düştüğü ve daha sonraki 17 saat içerisinde önemli bir biçimde artırıldığı belirlenmiştir. Ancak IGF-I ve IGF-II mRNA seviyeleri döllenmeyi takip eden ilk 24 saatte değişmemiş, IGF-II mRNA seviyesinin IGF-I'den daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum embriyonik gelişim süresince IGF-II'nin dominant olduğu ortaya konmuştur. GH-II ve GH-I mRNA seviyelerinde bir farklılığın ortaya çıktığı, GH-II mRNA kopyalarının sayısının GH-I'e göre çok daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Li *et al.* 2006).

Lankford and Weber (2010), yaptıkları çalışmada memelilerde ovaryum gelişmesi esnasında TGF- $\beta$  ailesi üyelerine ve onların inhibitörlerinin kritik parakrin düzenleyici fonksiyonlarını araştırmışlardır. Balığın ovaryum içi düzenleyicilerine bir iskelet oluşturmak için steriojenesis ile ilişkili beş enzim, IGF-I ve IGF-II için transkript değişimleri de ölçülmüştür. Erken gelişim döneminde BMP 4, BMP 7 ve GDF 9 gibi büyüme farklılaşma faktörü ekspresyonlarının yüksek oranda olduğu, ilerleme evresine doğru ise yavaş bir biçimde azaldığı belirlenmiştir. Erken ve orta gelişim dönemlerinde inhibin beta<sub>A</sub> ekspresyonunda artış, follistatin ekspresyonunda azalış kaydedilmiştir. Bu durum 17 $\beta$ -estradiol plazma seviyesinde artışa ve ovaryum aktivitesi için bir vitellojenik role atfedilmiştir. Olgunlaşmayı teşvik eden hormonun bileşeni ve olgunlaşma işleminde rol oynayan folliklerin inhibin beta seviyesini azalttığı, BAMBI ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. Diğer taraftan BMP 4, BMP 7 ve GDF 9'un başlıca oositte eksprese edildiği, inhibin alt ünitelerinin, follistatin ve BAMBI'nin

somatik folikül hücrelerinde eksprese edildiği ortaya konmuştur. Sonuç olarak TGF- $\beta$  süper ailesi üyeleri ve onların inhibitörlerinin balık ovaryumunun düzenlenmesinde farklı rolleri olduğu rapor edilmiştir.

**Çizelge 2.1.** Hayvan ve hücre kültürü deneylerinde arı sütünün biyolojik ve farmakolojik etkileri (Bogdanov 2011)

| ETKİ  | REFERANS   |
|---|--|
| <b>Antibakteriyal, Fungusidal, Antiviral, Antiparazitik Etkileri</b>  |  |
| Antibakteriyal  | Bilikova <i>et al.</i> , (2002), Bachanova <i>et al.</i> (2002), Stocker (2003) Furukawa (2008), Simsek <i>et al.</i> (2012)   |
| Fungusit  | Stocker (2003)   |
| Antiviral   | Diomede-Fresa <i>et al.</i> (1966) Takahashi <i>et al.</i> (1983) Stocker (2003)   |
| Çeşitli parazitik Trypanosomidae'ye karşı   | Linder (1963)  |
| <b>Biyo sitimüle Etkileri, Yaşlanmayı geciktirici</b>   |  |
| Hücre ve sıçanlarda östrojenik ve ganadotropik etkileri   | Mishima <i>et al.</i> (2005), Suzuki <i>et al.</i> (2008), Münstedt <i>et al.</i> (2009)   |
| Tavuk, hindi, tavşan, domuz, dana, kobay, fare ve sıçanların büyümesini ve kilosunu artırır.  | Bonomi <i>et al.</i> (2002), Burimistrova <i>et al.</i> (2008)   |
| Anti-yorgunluk, strese dayanıklılığı geliştirme   | Krylov <i>et al.</i> (2000), Kamaukura <i>et al.</i> (2001)  |
| Sıçanlarda ve koyunlarda üreme kapasitesinin artırılması  | Husein <i>et al.</i> (2002), Kridli <i>et al.</i> (2003), Husein <i>et al.</i> (2006), Kridli <i>et al.</i> (2006)   |
| İn vitro dokularda oksijen tüketimini arttırmak, anti-hipoksia  | Krylov <i>et al.</i> (2000), Prohoda (2009)  |
| Dişi tavşanlarda kısırlığa karşı, hamster ve sıçanlarda seksüel verimliliği arttırmak   | Kohguchi <i>et al.</i> (2004), Hassan (2009) Elnagar (2010)  |
| Farelerde ve diğer organizmalarda yaşam ömrünün uzatılması  | Inoue <i>et al.</i> (2003), Honda <i>et al.</i> (2011)   |
| <b>Immuno-modüle edici etkileri: Anti-kanser, Anti-alerji ve Anti-inflamantör</b>   |  |
| Hayvanlarda ve hücre kültüründeki immüno-modüle edici etkileri, lökosit sayısını artırması  | Okamoto <i>et al.</i> (2003), Erem <i>et al.</i> (2006) Gasic <i>et al.</i> (2007) Vučević <i>et al.</i> (2007) Mannoor <i>et al.</i> (2008) Simsek <i>et al.</i> (2009) |
| Hayvan denemelerinde ve hücre kültürlerindeki anti tümör etkisi   | Binoletto <i>et al.</i> (2005), Nakaya <i>et al.</i> (2007), Orsolich <i>et al.</i> (2007)   |
| Farelerde otoimmün inhibisyonu  | Mannoor <i>et al.</i> (2009)   |
| Hücre kültür testlerinde anti-inflamatuar   | Kohn <i>et al.</i> (2004)  |
| Hepatositlerin ve tübüler epitelin antiapoptik artışı   | Karadeniz <i>et al.</i> (2011)   |
| <b>Kardiovasküler Etkileri</b>  |  |
| Hayvanlarda anti-hipertansiyon, tansiyon düzenleyici etkisi   | Tokunaga <i>et al.</i> (2003), Tokunaga <i>et al.</i> (2004), Maruyama <i>et al.</i> (2005)  |
| Anti atheroskleroz, serum kolesterol ve trigliserit seviyesini azaltıcı, HDL seviyesini artırıcı, kan fibrinojen seviyesini ve trombositleri düşürücü | Ragab <i>et al.</i> (1999), Krylov <i>et al.</i> (2000)  |

**Çizelge 2.1. (devam)**

|  |  |
|--|--|
| Hayvan deneylerinde kardio koruyucu, myokarditeyi önler  | Krylov <i>et al.</i> (2000)  |
| Tiroksin, kortison albümin/globülin oranlarının kandaki seviyesi artar ve farelerde oral yolla alınması ile serum proteinlerini azaltıcı | Chauvin (1968), Chauvin (1987)   |
| Kan hücrelerinin sayısını artırıcı   | Krylov <i>et al.</i> (2000)  |
| <b>Merkezi ve Vejetatif Sinir Sistemi Üzerine Etkileri</b>   |  |
| Merkezi sinir aktivitesi üzerinde rol oynama, aktive etmek ve koruma   | Hattori <i>et al.</i> (2007a), Hattori <i>et al.</i> (2007b)   |
| Sıçanlarda beyin kolesterol aktivitesinin arttırmak için CNS'nin fosforilizasyonunun artırılması   | Krylov <i>et al.</i> (2000)  |
| Bağırsakta Asetil-kolin benzeri etki göstermesi  | Krylov <i>et al.</i> (2000)  |
| Sıçanların sakinleşmesi  | Chauvin 1987, Chauvin (1968)   |
| Anti-oksidasyon Karaciğer-koruyucu radyasyon koruyucu  | (Nagai <i>et al.</i> (2001); Inoue <i>et al.</i> (2003), Nagai <i>et al.</i> (2006), Jamnik <i>et al.</i> (2007) |
| Antioksidatif  | Krylov <i>et al.</i> (2000)  |
| Hayvan deneylerinde karaciğer koruyucu   | El nekeety <i>et al.</i> (2007)  |
| Mikotoksinlerle intoksikasyondan dolayı sıçanlardaki hepatik ve böbrek hasarını azaltıcı, stres azaltıcı                                 | Okavd <i>et al.</i> (2001), Kamakura <i>et al.</i> (2001a,2002b)   |
| Hepatosit DNA sentezinin uyarılmasını aktive eder ve hücreleri apoptozisten korur, hücre çoğalmasını artırıcı                            | Wagner <i>et al.</i> (1970)  |

### 3. MATERYAL ve METOT

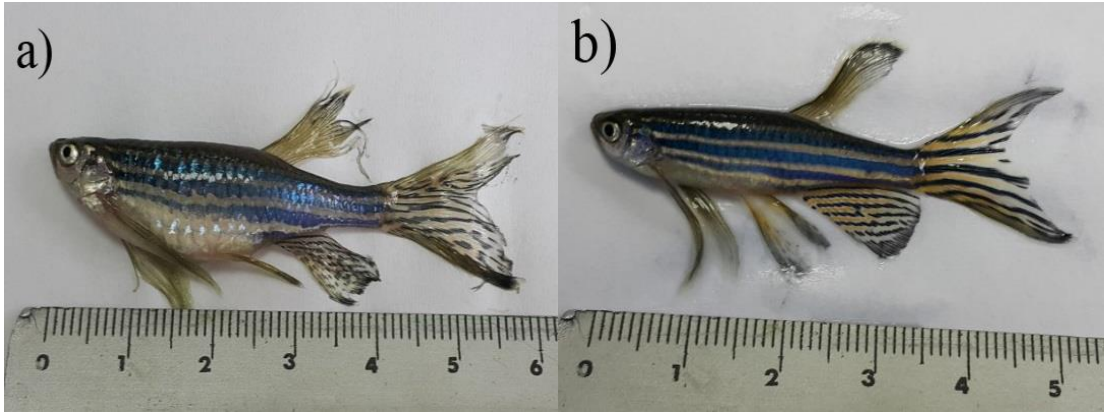
#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Araştırma yeri ve süresi

Deneme, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nde Model Organizma Ünitesi ve Biyoteknoloji Laboratuvarlarında 15 Kasım 2014-15 Kasım 2015 tarihleri arasında yürütülmüştür.

##### 3.1.2. Balık materyali

Çalışmada 2 aylık,  $0,35 \pm 0,15$  gr ağırlığındaki toplam 250 adet (1♂:1♀) Zebra balığı (*Danio rerio*) kullanılmıştır (Şekil 3.1). Deneyde kullanılan Zebra balıkları Erzurum'daki Yaşar Akvaryumculuktan temin edilmiştir.



Şekil 3.1. Dişi (a) ve erkek (b) Zebra Balığı (*Danio rerio*)

##### 3.1.3. Su materyali

Araştırmada kullanılan su materyali Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal

Biyoteknoloji Bölümü'ne ait Model Organizma Ünitesindeki şebeke suyu kullanılmıştır. Su sisteme verilmeden önce 8 farklı filtreden geçirilmiş ve dinlendirme tanklarında 2 gün boyunca havalandırıldıktan sonra sisteme verilmiştir. Yapılan ölçümlerden elde edilen su parametreleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Araştırmada kullanılan suyun kimyasal özellikleri

| Parametre                      | Değer  |
|--------------------------------|--------|
| Çözünmüş O <sub>2</sub> (mg/l) | 9±0,5  |
| pH                             | 7,30   |
| Saturasyon (%)                 | 70-80  |
| Sıcaklık (°C)                  | 26±1,0 |

#### 3.1.4. Model organizma ünitesi

Deneme çalışmaları kapalı devre araştırma sistemi olan model organizma ünitesinde yürütülmüştür. Sistemin avantajları balık materyali için gerekli olan sıcaklık değerinin sabit tutulması, suyun sürekli sirküle olması ve istenilen optimum koşulların sağlanabilmesidir. Araştırmanın yürütüldüğü model organizma ünitesi Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.2.** Araştırmada kullanılan model organizma ünitesi

Model Organizma Ünitesinde bulunan ekipmanlar ve görevleri aşağıda sırası ile belirtilmiştir.

**3.1.4.a. Sediment filtre**

Suyun berrak hale gelmesi için çamur, tortu, pas, kum, toz vs. gibi kaba partikülleri tutmaktadır.

**3.1.4.b. Karbon filtre**

Suda bulunan serbest kloru tutmaktadır.

**3.1.4.c. Granül aktif karbon filtre**

Suda bulunan serbest kloru, organik maddeleri tutmaktadır ve istenmeyen kokuları gidermektedir.

**3.1.4.d. Blok karbon filtre**

Granül aktif karbon filtreye ilave ikinci bir karbon filtredir. Gelen suyu membrana girecek hale getirmektedir. En ince partikülleri tutmaktadır.

**3.1.4.e. Membran filtre**

Ters osmos olayının gerçekleştiği yerdir. Su basıncı ile çalışmaktadır. Suda çözünmüş tüm maddeleri %90-95 oranında tutmaktadır. Zararlı iyonların ve mikroorganizmaların geçişine izin vermemektedir. Kirli suyu atmaktadır.

**3.1.4.f. Mineralli karbon filtre**

Tankta toplanan veya direkt membrandan gelen temiz suya musluktan akmadan önce mineral takviyesi yaparak suyu zenginleştirmekte ve pH'yı düzenlemektedir.

### **3.1.4.g. Dinlendirme tankları**

Suyun dinlendirildiği 25 lt ve 100lt kapasiteli su tanklarıdır. 4 adet 25lt ve 2 adet 100lt hacimli dinlendirme tankı bulunmaktadır.

### **3.1.4.h. Araştırma tankları**

Akumaks markalı tanklar korozyona dayanıklı olup, akrilik malzemeden imal edilmiştir. Önü su sirkülasyonunu sağlamak amacı ile eğimli olarak dizayn edilmiştir. Tankların yerleştirildiği standlar kompozit malzemeden üretilmiştir ve korozyona dayanıklıdır. 410x30x250 cm boyutlarındadır. 28 adet 10 lt lik (25x30x18,5cm boyutlarında), 15 adet 6 lt lik (15,5x30x25cm boyutlarında) ve 13 adet 3 lt lik (8,2x30x18,5cm boyutlarında) toplam 56 adet tank bulunmaktadır.

### **3.1.4.i. Isıtma-soğutma ünitesi**

Sistemde bulunan suyun istenilen derecede olmasını sağlayan ünitedir. Suyun sıcaklığına bağlı olarak otomatik devreye girmektedir.

### **3.1.4.i. Denge tankları**

Isıtma ve soğutma işlemleri, ana oksijenlendirme, suyun tazelenmesi, suyun çekilip sisteme verilmesi, denge tanklarında yapılmaktadır.

### **3.1.4.j. Pompalar**

Sistemde 1 adet aktif 1 adet yedek olmak üzere 2 adet pompa bulunmaktadır. Kendinden emiřli olup suyu filtrelere göndermektedir.



### **3.1.4.k. Oksijen jeneratörü**

%93 saflıkta oksijen üretmektedir. Denge tankına veya akvaryumlara koyulabilmektedir. Cihaz çıkış basıncı 0,4 bardır. Oksijen jeneratörü kapasitesi maksimum 5 lt/dk'dır.

### **3.1.4.l. Akıllı oksijenmetre (Smartoxy)**

Cihaz oksijen, saturasyon, sıcaklık ve pH parametrelerini ölçmektedir. Android işletim sistemine sahip bir cihazdır. Bluetooth aracılığı ile ekrandan ölçüm değerlerini okuma, internet üzerinden verileri transfer etme ve kaydetme özelliğine sahiptir.

### **3.1.4.m. Ortam soğutma ünitesi**

Sistemdeki cihazlar yaklaşık 50.000 BTU'luk bir ısı yaydığı için ortamdaki ısı dengesinin sürekli ayarlanmasını ve kontrol edilmesini sağlamaktadır.

### **3.1.4.n. Torba Filtreler**

Sistemde 1 adet aktif 1 adet yedek olmak üzere 2 adet torba filtre bulunmaktadır. Torba filtreler; 200 mikrondan 1 mikrona kadar filtrasyon derecelerinde, gövde içine yerleştirilen filtre torbaları vasıtası ile hassas filtrasyonda kullanılmaktadır.

### **3.1.4.o. UV reaktörü**

Ultraviyole (UV-C) ışınlarıyla suların dezenfeksiyonu, ekolojik ve teknik avantajları sayesinde günümüzde en çok tercih edilen dezenfeksiyon metotlarından biridir. UV sudaki organizmaları (bakteri, virüs, mantar vs.) öldürmektedir.

#### **3.1.4.ö. Biyolojik filtre**

Her bir biyolojik filtre tankı kapalı olarak çalışmaktadır ve içerisine yerleştirilen biyolojik elementler ve bioballar uygun bakteri kolonisinin artışına olanak sağlayacak tipte ve yüzey özelliğindedir.

#### **3.1.4.p. Bioball**

Biyolojik filtrede faydalı bakterilerin ekimi yapılırken bioballar kullanılarak yüzey alanı artırılmaktadır. Böylece bakteriye tutunacak yüzey alanı sağlanmaktadır.1 bioball 550 m<sup>2</sup> yüzey alanı sağlamaktadır. Bakteri ekimi yapıldığında bakteriler bioball yüzeyine tutunmaktadır. Bioball yüzeyine tutunamayan bakteriler ise su ile tüm sistemi dolaşarak yine sisteme yayılmaktadır.

#### **3.1.4.r. Biyolojik elementler**

Bioballar gibi yüzey alanını artırarak bakteriye tutunacak yüzey alanı sağlamaktadırlar. Yüzey alanlarında bakteri kolonileri oluşmaktadır. 1 m<sup>2</sup> dolgu hacmindeki yüzey alanı 750 m<sup>2</sup>'dir.

#### **3.1.4.s. Otomasyon panosu**

Tüm sistemdeki cihazların enerji kontrolü panodan yapılmaktadır.

#### **3.1.4.t. Fotoperiyot**

Ünitenin kurulduğu ortam ışıktan tamamen izole olacak şekilde ayarlanmıştır. Işık periyodu 10 saat karanlık, 14 saat aydınlık olacak şekilde uygulanmaktadır.

### 3.1.5. Yem materyali

Denemede 5 farklı yem D1 (%0,00), D2 (%0,10), D3 (%0,40), D4 (%1,60) ve D5 (%6,40) oranlarında arı sütü içecek şekilde kazein ve jelatin tabanlı hazırlanmıştır. Araştırmada kullanılacak arı sütü Bursa'daki Civan Arıcılık İşletmesinden temin edilmiştir. Diyetlerde kullanılan malzemeler; jelatin (G2500-1kg), kazein (C3400-1kg Sigma), dekstrin (MP-901520), L-arginine (MP-194626), L-methionine (MP-194707), L-lysine (MP-194696), kolin klorid (MP-101386), CMC, mineral karışımı (Bernhart Tomarelli, MP-902843) Mp-Bio firmasından, vitamin karışımı belirlenen oranlarda Roche firmasından karışım halinde Mp biomedikal firmasından tedarik edilmiştir (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2.** Farklı oranlarda arı sütü ilave edilen araştırma diyetleri ile hazırlanan diyetlerin bileşimi, besin madde kompozisyonları

| <b>Diyetler</b>          | <b>D1</b>     | <b>D2</b>     | <b>D3</b>     | <b>D4</b>     | <b>D5</b>     |
|--------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Kazein (vitaminsız)      | 40,00         | 40,00         | 40,00         | 40,00         | 40,00         |
| Jelatin                  | 8,00          | 8,00          | 8,00          | 8,00          | 8,00          |
| L-Arjinin                | 0,50          | 0,50          | 0,50          | 0,50          | 0,50          |
| L-Metiyonin              | 0,40          | 0,40          | 0,40          | 0,40          | 0,40          |
| L-Lisin                  | 0,80          | 0,80          | 0,80          | 0,80          | 0,80          |
| Balık unu                | 5,00          | 5,00          | 5,00          | 5,00          | 5,00          |
| Dekstrin                 | 9,10          | 9,10          | 9,10          | 9,10          | 9,10          |
| Buğday Unu               | 14,98         | 14,88         | 14,58         | 13,38         | 8,58          |
| <b>Arı Sütü</b>          | <b>0,00</b>   | <b>0,10</b>   | <b>0,40</b>   | <b>1,60</b>   | <b>6,40</b>   |
| Balık Karaciğer yağı     | 10,00         | 10,00         | 10,00         | 10,00         | 10,00         |
| Soya Lesitini            | 4,00          | 4,00          | 4,00          | 4,00          | 4,00          |
| Vitamin Mix <sup>1</sup> | 2,00          | 2,00          | 2,00          | 2,00          | 2,00          |
| Mineral Mix <sup>2</sup> | 3,00          | 3,00          | 3,00          | 3,00          | 3,00          |
| Karboksil metil selüloz  | 2,00          | 2,00          | 2,00          | 2,00          | 2,00          |
| Vitamin C                | 0,06          | 0,06          | 0,06          | 0,06          | 0,06          |
| Kolin Klorür             | 0,17          | 0,17          | 0,17          | 0,17          | 0,17          |
| <b>Toplam</b>            | <b>100,00</b> | <b>100,00</b> | <b>100,00</b> | <b>100,00</b> | <b>100,00</b> |

D1: %0 Arı sütü (Kontrol grubu), D2:%0,1 Arı sütü, D3: %0,1 Arı sütü, D4: %1,6 Arı sütü,D5:%6,4 Arı sütü.

<sup>1</sup> Roche Performance Premix (Hoffman-La Roche, INC., Nutley, N.J., USA), her bir gramında; vitamin A, 2645,50 IU; vitamin D3, 220,46 IU; vitamin E, 44,09 IU; vitamin B<sub>12</sub>, 13 mg; riboflavin,13,23 mg; niacin, 61,73 mg; d-pantothenic asit, 20,05 mg; menadione, 1,32 mg; folik asit, 1,76 mg; tiyamin, 7,95 mg ve d-diyotin, 0,31 mg.

<sup>2</sup> Bernhart Tomarelli mineral karışımı (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, USA), 100g bileşiminde: 2,1g kalsiyum karbonat, 73,5g kalsiyum fosfat dibazik, 0,227g sitrik asit, 0,046g bakır sitrat, 0,558g demir sitrat, 2,5g magnezyum oksit, 0,835g magnezyum sitrat, 0,001g potasyum iyodür, 8,1g potasyum fosfat dibazik, 6,8g potasyum oksit, 3,06g sodyum klorid, 2,14g sodyum fosfat ve 0,133g çinko sitrak.

## 3.2. Metot

### 3.2.1. Denemede kullanılan yemlerin hazırlanması

Yemler Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarın'da hazırlanmıştır. Yemler hazırlanırken Çizelge 3.2'de verilen yem katkı maddeleri hassas terazide tartılıp 5 farklı kaplara aktarılmıştır. Her grup için arı sütü kolin klorür ve karaciğer yağı hariç tüm yem katkı maddeleri homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Karıştırıcıda 30 dakika karıştırıldıktan sonra Kolin Klorür ve arı sütü saf su içerisinde yavaş yavaş çözündürülerek karışım üzerine dikkatli bir şekilde ilave edilmiştir. Daha sonra karaciğer yağı istenilen oranlarda ilave edilmiş hamur kıvamına gelinceye kadar karıştırılmıştır. Kıyma makinesinden geçirilen yem pelet haline getirilerek  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de 2 gün boyunca depolanmıştır. Pelet haline gelen yemler petri kaplarına ve 250 ml'lik balon jöjelere koyularak liyofilizatörde 20 saat ana kurutma ve 3 saat son kurutma olacak şekilde kurutulmuştur. Son olarak yemler  $1400\mu$ ,  $1000\mu$  ve  $800\mu$ 'luk eleklerden geçirilerek  $1000\mu$ 'luk boyut uygun görülmüştür (Şekil 3.3). Hazırlanan yemler  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.



**Şekil 3.3.** Araştırmada kullanılan yemlerin pelet haline getirilmesi, liyofilize edilmesi ve  $1400\mu$ ,  $1000\mu$ ,  $800\mu$ 'luk eleklerden geçirilmesi

### 3.2.2. Aklimatizasyon, deneme dizaynı ve besleme çalışmaları

Model Organizma Ünitesindeki 25 araştırma tankının her birine 10 (5♀, 5♂) adet olacak şekilde toplam 250 adet balık konulmuştur (Şekil 3.4). Deneme süresince balıklar, su sıcaklığı  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de ve 14 saat ışık 10 saat karanlık olacak şekilde fotoperiyotta tabii tutulmuştur. Balıklar yaklaşık bir haftalık aklimatizasyon periyoduna tabii tutulmuştur. Bu süre zarfında balıklar bazal diyetle beslenmiştir. İlk sekiz haftalık besleme çalışmaları süresince 5 farklı deneme gruplarındaki Zebra balıklarına günlük canlı ağırlıklarının %1, %2, %5, %8 ve %10'u kadar yem verilmiştir. Balık yaşama oranlarına bakıldığında en iyi sonucun günlük canlı ağırlıklarının %5'i kadar yemin olduğu gözlemlenmiştir. İkinci sekiz haftalık besleme çalışmaları süresince Zebra balıklarının günlük ağırlık artışının %5'i kadar yem verilmiştir. Yemlemeler 09:00, 12:00, 15:00 ve 18:00 saatlerinde olmak üzere günde dört sefer yapılmıştır.



Şekil 3.4. Araştırmada kullanılan 10 Lt Lik zebra balık tankları

### 3.2.3. Büyüme performansının belirlenmesi

Deneme süresince 0., 15., 30., 45. ve 56. gün balıkların canlı ağırlık tartımları yapılmıştır. 15., 30., 45. gün alınan tartımlar, balıklara günlük verilen yem oranlarının

güvenilirliğini artırmak için yapılmıştır. Deneme süresince bütün tartımlar hassasiyeti 0,01 gr olan terazi ile yapılmıştır.

### 3.2.3.a. Ortalama canlı ağırlık artışı

Ortalama canlı ağırlık değeri, her deneme tankında ki bireylerin deneme sonu canlı ağırlıkları alınıp, toplam ağırlığın tanklardaki birey sayısına bölünmesiyle bulunmuştur (Hoşsu vd 2003).  $W_i$ : deneme başı balık ağırlığı (gr) ve  $W_s$ : deneme sonu balık ağırlığı (gr) dir.

$$\text{Ort. Canlı Ağırlık Kazancı (\%)} = \frac{W_s - W_i}{W_i} \times 100$$

### 3.2.3.b. Spesifik büyüme oranı

Araştırmada kullanılan zebra balıklarının günlük büyüme oranları aşağıda formüle edilen spesifik büyüme oranı yöntemi ile hesaplanmıştır. SBO: spesifik büyüme oranı (%/gün),  $W_i$ : deneme başı balık ağırlığı (gr),  $W_s$ : deneme sonu balık ağırlığı (gr) ve  $t$ : deneme süresi (gün) dür (Hoşsu vd 2003).

$$\text{SBO (\%)} = \frac{\ln W_s - \ln W_i}{t} \times 100$$

### 3.2.3.c. Yem değerlendirme oranı

Yemin ete dönüşüm oranı olarak tarif edilen yem değerlendirme oranı (YDO) nutrigenomik çalışmalar da büyüme ve gelişimin önemli bir parametresi olarak kullanılmaktadır. Yem değerlendirme oranı tüketilen yem miktarı ile kazanılan canlı ağırlık arasındaki oran ile açıklanmaktadır. Her ölçüm döneminde yem değerlendirme oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. YDO: yem değerlendirme oranı (%),  $\sum W$ : deneme sonu toplam balık ağırlığı (gr) ve  $\sum \text{Yem}$ : deneme süresince verilen toplam yem miktarı (gr) olarak belirtilmiştir (Goddars 1996; Hoşsu vd 2003; Korkut vd 2007).

$$YDO = \frac{\sum Yem}{\sum W}$$

### 3.2.3.d. Yaşama oranı

Yaşama oranı (YO) ise yüzde olarak ifade edilmiş olup aşağıdaki formülden hesaplanmıştır (Keskin ve Erdem 2005).

$$YO(\%) = \frac{\text{Deneme sonu balık sayısı}}{\text{Deneme başı balık sayısı}} \times 100$$

### 3.2.3.e. Hepatosomatik indeks değeri

Canlılar fazla enerji olduğu zaman vücut tarafından karaciğerde glikojen olarak depolanmaktadır. Bu sebepten dolayı karaciğerin oransal büyüklüğü beslenme durumu ile büyüme hızının bir indeksi olarak görülmektedir. Hepatosomatik indeks şu formülle ifade edilmiştir (Halver and Hardy 2002).

$$HSİ (\%) = \frac{\text{Balığın Karaciğer Ağırlığı (gr)}}{\text{Balığın Canlı Ağırlığı (gr)}} \times 100$$

### 3.2.4. Balıklardan doku örneklerinin alınması

8 haftalık besleme çalışması sonunda her gruptan 6 balık şansa bağlı olarak seçilmiş ve hipotermi ile öldürülmüştür. Diseksiyonda kas, karaciğer ve böbrekten alınan doku örnekleri steril 2 ml'lik eppendorf tüplere konulmuş, üzerine RNA Later (QIAGEN, Katalog No: 76106) solüsyonu ilave edilerek çalışılincaya kadar -86°C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.5. Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu Qiagen-Qiacube izolasyon robotunda yapılmıştır (Şekil 3.4). Kas

dokuları için RNA izolasyonunda QIAGEN RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Cat:74804) kullanılmıştır. Karaciğer ve böbrek dokularından RNA izolasyonu ise QIAGEN RNeasy Mini Kit (Cat:74034) kullanılarak yapılmıştır.

### **3.2.5.a. Robotta total RNA izolasyonu**

Kas dokularının RNA izolasyonunda Qiacube izolasyon robotunda yükleme aşamasından önce aşağıda belirtilen protokol takip edilmiştir.

1.  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de tutulan doku örnekleri alınarak karda çözümleri sağlanmıştır. Çözünen doku örneklerinden 100 ve 50 mg doku örneği alınarak önceden içlerine çelik bilye atılmış (Qiagen Cat No:69989) olan steril ependorf tüplerine konulmuştur. Üzerine 500  $\mu\text{L}$  Qiazol Lysis Reagent eklenmiştir.
2. Tissuelyser LT'de (Qiagen Cat No:85600) 40 Hz'de 3+3 dk süreyle parçalanmıştır (Şekil 3.3). İyice parçalanan doku örneklerinin içinden çelik boncuklar çıkartılıp tüpe 100  $\mu\text{L}$  kloroform ilave edilmiştir. Sonra 15 sn vortekslenmiştir. Ardından 2-3 dk düz bir zeminde bekletilmiştir.
3. Örnekler  $12000\times g$   $4^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Santrifüjlenen örneklerde oluşan 3 tabakadan ortada kalan fazdan süpernatanttan yaklaşık 300  $\mu\text{L}$  alınarak yeni steril 2 ml'lik ependorf tüpleri içerisine aktarılmıştır.
5. Alınan fazlar QIAGEN- QIACUBE DNA-RNA izolasyon robotuna RNA izolasyonu için konulmuştur.

### **3.2.5.b. Manuel total RNA izolasyonu**

Böbrek ve karaciğer dokularının RNA izolasyonu aşağıda belirtilen protokola göre uygulanmıştır.

1.  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de tutulan doku örnekleri alınarak karda çözümleri sağlanmıştır. Çözünen doku örneklerinden 30 mg ve 20 mg doku alınarak önceden içlerine steril çelik bilye (Qiagen Cat No:69989) atılmış steril ependorf tüplerine konulmuştur. Üzerine 350  $\mu\text{L}$



Buffer RLT Lysis eklenmiştir.

2. Tissuelyser LT'de (Qiagen Cat No:85600) 40 Hz'de 3+3 dakika süreyle parçalanmıştır. İyice parçalanan doku örneklerinin içinden çelik boncuklar çıkartılıp üzerine 350  $\mu$ L %70'lik Ethanol ilave edilmiştir. Sonra 5 sn vortekslenip 1 dk düz bir zeminde bekletilmiştir.

3. Her bir örnek RNeasy Mini Kit (Cat:74034) içerisindeki pembe kolonlara 700  $\mu$ L yüklenmiştir. 8000 $\times$ g'de 4°C'de 15 sn santrifüj edilmiştir. Kolondan geçip altta biriken kısım atılmıştır.

4. Buffer RW1 Wash solusyonundan 700  $\mu$ L alınarak kolondan yavaşça geçirilmiştir. 8000 $\times$ g'de 4°C'de 15 sn santrifüj edilmiştir. Kolondan geçip altta biriken kısım atılmıştır.

5. Buffer RPE Wash buffer solusyonundan 500  $\mu$ L alınarak kolondan yavaşça geçirilmiştir ve 8000 $\times$ g'de 4°C'de 15 sn santrifüj edildikten sonra kolondan geçip altta biriken kısım atılmıştır.

6. İkinci kez Buffer RPE Wash buffer solusyonundan 500  $\mu$ L alınarak kolondan yavaşça geçirilmiştir. 8000 $\times$ g'de 4°C'de 3 dk santrifüj edildikten sonra kolondan geçip altta biriken kısım atılmıştır.

7. Son olarak 30  $\mu$ L RNase-free-water kolona yüklenerek yıkama işlemi yapılmıştır ve 8000 $\times$ g'de 4°C'de 1 dk santrifüj edildikten sonra manuel olarak RNeasy Mini Kit protokolü tamamlanmıştır.



**Şekil 3.5.** Araştırmada RNA izolasyonunda kullanılan QIACUBE otomatik izolasyon robotu. Araştırmada dokuların parçalanmasında kullanılan Tissuelyser LT

### 3.2.5.c. RNA'nın kantitatif tayini

RNA'nın yapısında yer alarak hücrelerdeki genetik bilginin kodlanmasında önemli bir rol oynayan pürin ve pürimidin bazıları ( $A_{260}/A_{280}$ ) dalga boyunda absorpsiyon verdiği için bu dalga boylarında ölçüm yapılmıştır. Örneklerin konsantrasyon ve saflık dereceleri  $\mu$ Drop™ Plate (Thermo Scientific, Cat No:12391)'te 2  $\mu$ L numune yüklemesi yapılarak okunmuştur (Şekil 3.9).



Şekil 3.6. Araştırmada kullanılan  $\mu$ Drop™ Plate nanodrop spektrofotometre

### 3.2.5.d. RNA'nın kalitatif tayini

RNA varlığının kontrolü için Agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır. RNA'nın kalitatif tayini için thermo elektroforez cihazına yükleme yapılmadan önce belirtilen protokol takip edilmiştir.

1. 70 ml'lik elektroforez küveti için %1'lik agaroz jel hazırlanma protokolünde 0,7 gr agaroz (Cat No: Sigma A 9539) tartılarak bir erlenmayere konulmuştur.
2. Üzerine 66,5 ml ddH<sub>2</sub>O ve 4,38 ml 20×MOPS solüsyonu eklenmiştir.
3. Mikrodalga fırında bileşenler tamamen çözünene kadar yaklaşık 3 dakika tutulmuştur.

4. Ardından su altında biraz soğutulmuştur ve içine 15,6 µL formamid (Cat No: Simga F 9037) ve 12,8 µL etidyum bromür (10µg/µl) (Cat No: Sigma E8751) ilave edilmiştir.
5. Steril 0,2 ml'lik ependorf tüp içine 5 µL formamid, 0,5 µL 20×MOPS solüsyonu, 3,5 µL ddH<sub>2</sub>O ve 1 µL izole edilen RNA örneklerinden konulmuştur.
6. 65°C'de 15 dk etüvde inkübe edilmiştir.
7. Jel donduktan sonra üzerine jeli kaplayacak kadar 1×MOPS solüsyonu dökülmüştür.
8. Ardından örnekler jel yükleme tamponu Brom Fenol Blue (Cat No: İnvitrogen 10816-015) ile boyanarak kuyucuklara yükleme yapılmıştır. 90V 90A'da 30 dk yürütülmüştür.

**Çizelge 3.3.** RNA'nın kalitatif tayini için kullanılan kimyasallar

| <b>Malzeme Adı</b>      | <b>Miktar</b> | <b>Katalog Numarası</b> |
|-------------------------|---------------|-------------------------|
| Agaroz                  | 0,7 gr        | Sigma A 9539            |
| Formamid                | 15,6 µL       | Simga F 9037            |
| Etidyum Bromür(10µg/µl) | 12,8 µL       | Sigma E 8751            |
| Brom Fenol Blue         | 0,5 µL        | İnvitrogen 10816-015    |
| DEPC                    | 500 ml        | Sigma D-5758            |
| MOPS                    | 41,9 gr       | Sigma D-5758            |
| Sodyum asetat           | 6,8 gr        | Sigma S 2889            |
| EDTA                    | 2,6gr         | Sigma 93283             |

### **3.2.5.e. 500 ml DEPC hazırlanışı**

500 ml saf su ve 500 µL DEPC (Cat No: Sigma D-5758) 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılıp ardından otoklavlanır. +4°C'de bekletilir.

### **3.2.5.f. 20×MOPS solüsyonunun hazırlanışı (500 ml)**

41,9 gr MOPS (Cat No: Sigma M-1254), 6,8 gr Sodyum asetat (Cat No: Sigma S 2889), 2,6 gr EDTA (Cat No: Sigma 93283) tartılır 500 ml'lik erlenmayere konur. Önceden hazırladığımız 500 ml DEPC H<sub>2</sub>O'dan 480 ml konulur pH metre ile NaOH eklenerek pH 7,0'a ayarlanır. DEPC'li su ile hacim 500 ml'ye tamamlanır.

24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda (ısıtıcısı açılmayarak) manyetik bar yardımıyla karıştırılır.

### **3.2.5.g. 1×MOPS solüsyonunun hazırlanışı;**

%5 oranında sulandırma yapılarak, 19 birim saf su ve 1 birim 20×MOPS solüsyonu karıştırılarak hazırlanır.

### **3.2.5.h. RT-PCR ile cDNA sentezi**

Total RNA'lardan Super Script<sup>®</sup> III Reverse Transcriptase (Invitrogen Cat. No: 18080-044) kiti ile cDNA aşağıdaki şekilde sentezlenmiştir.

1. İzole edilen RNA'lar  $\mu$ Drop<sup>™</sup> Plate nanodrop spektrofotometre ile ölçülerek cDNA sentezinde kullanılacak konsantrasyonları hesaplanmıştır. Konsantrasyonlar 1  $\mu$ g/ $\mu$ L olacak şekilde ayarlanmıştır.
2. Steril 0,2 ml'lik PCR tüplerine; 1  $\mu$ L 50  $\mu$ M Oligo dT<sub>20</sub>, 1  $\mu$ L dNTP Mix (10  $\mu$ M) eklenmiştir.
3. Toplam hacmi 13  $\mu$ L'ye tamamlamak için üzerine konsantrasyonu 1 $\mu$ g olan total RNA'dan hesaplanan miktarda (x) eklenmiştir.
4. Üzerine 11-x  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O ilave edilmiştir.
5. 65 °C'de 15 dk PCR'da inkübe edilmiştir. Ardından 1 dk buz üstünde bekletilmiştir.
6. Daha sonra kısa süreli (5-10 sn) mikrosantrifüj yapılmıştır.
7. Ardından 4  $\mu$ L 5x First Strand Buffer, 1  $\mu$ L 0,1 M DTT, 1  $\mu$ L RNase OUT<sup>™</sup> (40 unit/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L Super Script III RT (200 unit/ $\mu$ L) eklenmiştir.
8. Karışım hafif bir pipetaj yapılmıştır.
9. Karışım 50°C'de 30-60 dk inkübe edilmiş ve gene spesifik primer için reaksiyon sıcaklığı 55°C kadar arttırılmıştır.
10. Karışım 70°C'de 15 dk ısıtılarak reaksiyon durdurulmuştur.
11. Elde edilen cDNA'lar  $\mu$ Drop<sup>™</sup> Plate nanodrop spektrofotometre de  $A_{260}/A_{280}$  değerleri ölçülmüştür.



**Şekil 3.7.** cDNA sentezi oluşturmada kullanılan PCR

### 3.2.5.i. Genlere spesifik primer ve TaqMan prob dizaynı

İnternet ortamındaki gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zebra balığında GH-I, IGF-I, TGF-BR1A ve Beta Aktin genlerine ait mRNA dizilimleri kullanarak bir primer dizayn programı olan primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) kullanılarak genlerin maksimum 60-150 bp lik kısmına spesifik primer ve proplar dizayn edilmiştir. Dizayn edilen primer ve propların ilgili gen bölgelerine spesifiklikleri <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> kullanılarak kontrol edilmiştir. Çalışmada kullanılan genlere ait primer ve propların baz dizilimleri, bç ve gen bankası erişim numaraları Çizelge 3.4'de verilmiştir.

### 3.2.5.i. Real time PCR uygulamaları

Elde edilen cDNA'lar üzerinde ilgili genlere ait bölgelerin amplifikasyonu Real-time PCR'da yapılmıştır. TaqMan prob iki primer arasındaki bölgeye bağlanacak şekilde dizayn edilir. Bu yöntemde 5' ucunda flouresan işaretli Reporter ve 3' ucunda da Quencher boya kullanılmıştır. Reaksiyon esnasında serbest kalan reporter boya ışınım yapar. Bu ışınım, her döngüde kopan prob sayısı ile orantılı olarak artmaktadır. Böylece

oluşan ürünün miktarı kantitatif olarak ölçülmektedir. FastStart TaqMan® Probe Qiagen Rotor GeneQ kullanılarak gerçekleştirilen Real time PCR karışımı ve protokolü Çizelge 3.4'de verilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Real time PCR karışımı

| <b>Bileşenler</b>       | <b>Konsantrasyon</b> | <b>Hacim (µL)</b> |
|-------------------------|----------------------|-------------------|
| FastStart TaqMan® Probe | 2x                   | 25                |
| Hydroliz Prob           | 10 pmol              | 1                 |
| Forward primer          | 20 pmol              | 2                 |
| Reverse primer          | 20 pmol              | 2                 |
| cDNA                    |                      | 2                 |
| ddH <sub>2</sub> O      |                      | 18                |
| <b>Toplam hacim</b>     |                      | <b>50 µL</b>      |

### 3.2.5.j. Gen ekspresyonu hesaplamaları

Real-Time PCR sonuçlarının değerlendirilmesinde, her bir örneğin referans ve hedef C<sub>T</sub> değerleri arasındaki farkı kıyaslayan Hedef gen oranı metodu kullanıldı (Pfaffl 2001). Kontrol ve muamele (Arı sütü) gruplarının ekspresyon seviyelerinin hesaplanması aşağıda gösterildiği gibi Hedef gen oranı metoduna göre yapılmıştır.

$$\text{Hedef Gen Oranı} = \frac{E_{\text{hedef gen}}^{\Delta\text{CP hedef (kontrol-örnek)}}}{E_{\text{referans gen}}^{\Delta\text{CP referans (kontrol-örnek)}}$$

**Çizelge 3.5.** Zebra balığı'nda kullanılacak primer ve problara ait dizilim bilgileri, ürün uzunluğu ve genbank erişim numaraları

| Genler         | Primer ve Proplar | Baz Dizilimi (5'-3')  | Ürün Uzunluğu (bç) | Gen Bankası Erişim Numarası |
|----------------|-------------------|---|--------------------|-----------------------------|
| GH             | Forward           | GCATCAGCGTGCTCATCAAG  | 108                | AJ937858.1                  |
|                | Reverse           | TGGTCTCCCCTACGGTCAG   |                    |                             |
|                | Prob              | <sup>FAM-</sup> TGGATGACAACGACTCCCTGCCGTT <sup>-TAMRA</sup> |                    |                             |
| IGF-I          | Forward           | AGTACCCACACCCTCTCACT  | 132                | NM_131825.2                 |
|                | Reverse           | AAAGCCCCTGTCTCCACAC   |                    |                             |
|                | Prob              | <sup>FAM-</sup> GCGTTGACTCCCGCGACTCTGGA <sup>-TAMRA</sup>   |                    |                             |
| TGF- $\beta$   | Forward           | GACCACCCATTCCTTGCTGA  | 144                | NM_001037683.2              |
|                | Reverse           | GCCCTTCCCAATGCTCTCTT  |                    |                             |
|                | Prob              | <sup>FAM-</sup> AGTGCAACGGACCATCGCCAGGA <sup>-TAMRA</sup>   |                    |                             |
| $\beta$ -Aktin | Forward           | CCTCTCTTGCTCCTTCCACC  | 150                | AF057040.1                  |
|                | Reverse           | TACTCCTGCTTGCTGATCCAC                                       |                    |                             |
|                | Prob              | <sup>CY5-</sup> GGCCTCCCTGTCCACCTTCCAGC <sup>-BQ2</sup>     |                    |                             |

### **3.2.6. Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi**

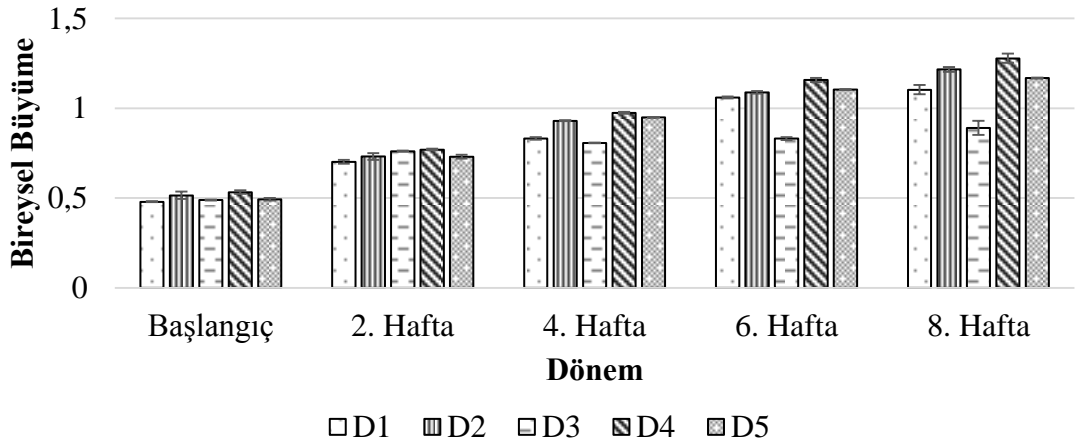
Veriler SPSS 17.0 paket programında ANOVA yöntemi ve varyans analizine tabi tutularak analizleri yapılmıştır. ANOVA testi ve varyans analizleri sonucunda önemli çıkan grup ortalamaları arasındaki farklılığı tespit etmek için Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Bireysel Ortalama Canlı Ağırlık Değişimi

Farklı oranlarda arı sütü içeren beş diyet ile beslenen Zebra balıkları (*Danio rerio*)'nın bireysel ortalama canlı ağırlıkları deneme başında ve araştırmanın başlamasını takip eden her 15 günde bir ölçülmüş olup tüm dönemlere ait ortalama canlı ağırlık değerleri ile analiz sonuçları Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir. Deneme grubu balıklarının deneme süresince ortalama canlı ağırlık değerleri ile diyet grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Deneme sonunda en yüksek büyüme oranı D4 diyet grubunda belirlenmiş olup D2 grubu ile arasında istatistiksel olarak farklılık olmadığı  $p<0,05$ 'e göre belirlenmiştir. Ancak D2 dışındaki D1, D3, D4, D5 grupları ile arasında farklılık çok önemli seviyede hesaplanmıştır ( $p<0,05$ ). Deneme sonu en düşük bireysel büyüme  $0,890\pm 0,07$  g ile D3 grubunda olduğu tespit edilmiş olup diğer gruplar ile olan farklılığın çok önemli olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).



**Şekil 4.1.** Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı (*Danio rerio*)'nın deneme süresince ortalama bireysel canlı ağırlık artışları (g)

**Çizelge 4.1.** Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı (*Danio rerio*)'nın deneme süresince ortalama bireysel canlı ağırlık artışları (g)

|                    | D1                      | D2                       | D3                       | D4                      | D5                       |
|--------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Başlangıç Ağırlığı | 0,479±0,07              | 0,515±0,04               | 0,489±0,05               | 0,533±0,02              | 0,493±0,01               |
| 15. Gün Ağırlık    | 0,701±0,02 <sup>c</sup> | 0,731±0,03 <sup>bc</sup> | 0,761±0,01 <sup>ab</sup> | 0,770±0,01 <sup>a</sup> | 0,730±0,02 <sup>bc</sup> |
| 30. Gün Ağırlık    | 0,832±0,01 <sup>d</sup> | 0,930±0,01 <sup>c</sup>  | 0,807±0,01 <sup>e</sup>  | 0,974±0,01 <sup>a</sup> | 0,949±0,00 <sup>b</sup>  |
| 45. Gün Ağırlık    | 1,060±0,01 <sup>c</sup> | 1,088±0,01 <sup>ab</sup> | 0,831±0,02 <sup>d</sup>  | 1,157±0,02 <sup>a</sup> | 1,104±0,01 <sup>bc</sup> |
| 56. Gün Ağırlık    | 1,103±0,05 <sup>c</sup> | 1,216±0,03 <sup>bc</sup> | 0,890±0,07 <sup>d</sup>  | 1,278±0,05 <sup>a</sup> | 1,168±0,01               |

$\bar{X} \pm S \bar{x}$  = Ortalama±Ortalamanın Standart Sapması, n=3. Farklı harfler birbirinden farklı olan grupları göstermektedir, p<0,05.

#### 4.2. RNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Değerleri

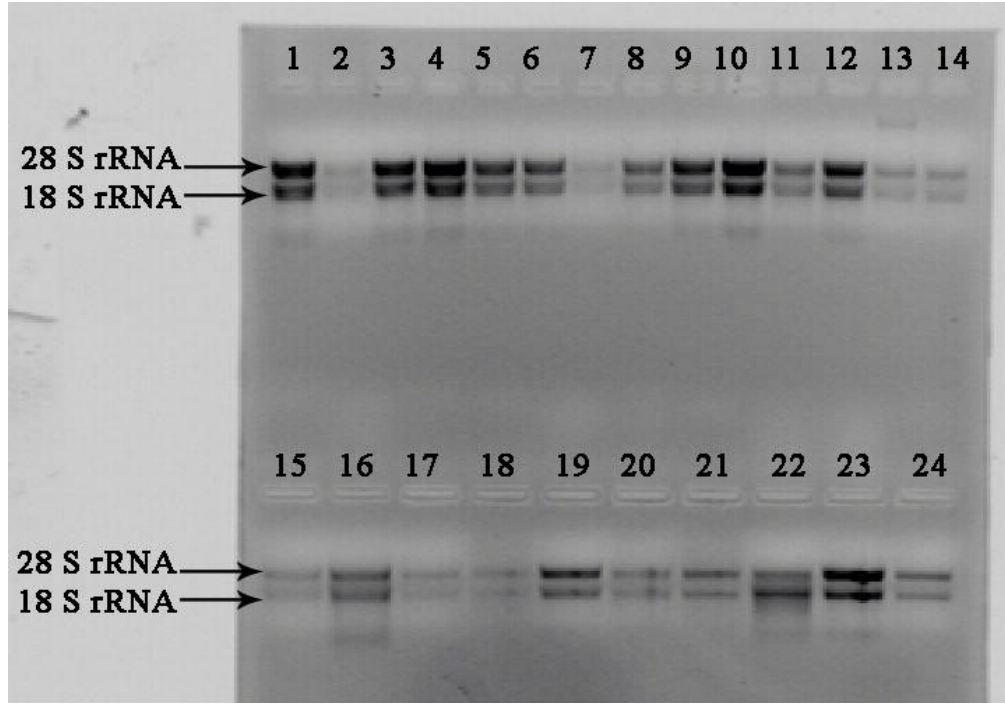
İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları,  $A_{260}/A_{280}$  nm'de ölçülen absorbansların oranıyla belirlenen saflık dereceleri udrop cihazı ile belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Saf haldeki bir RNA'nın  $A_{260}/A_{280}$  absorbans oranı 2,0 civarındadır. Elde ettiğimiz RNA örneklerimizin saflık dereceleri yani  $A_{260}/A_{280}$  oranınının 2,0 olması RNA izolasyonunun başarılı olduğu anlamına gelmektedir. Bulduğumuz konsantrasyonlar cDNA'ların elde edilebilmesi için gerekli olan konsantrasyon miktarlarının üzerinde olup cDNA sentezinde başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Kompleks yapılı organizmalarda elektroforez sonucunda 18S rRNA ve 28S rRNA olmak üzere iki bant elde edilmektedir. Bantta görülen total RNA'dır. Elektroforez sonuçlarında elde edilen bantlar yoğun ve belirgindir. RNA kırıkları ve kontaminasyon görülmemektedir. Jelde görüntü elde edilemeyen örneklerin izolasyonları tekrarlanmıştır (Şekil 4.2).

**Çizelge 4.2.** Total RNA konsantrasyonları (ng/μL) ve 260/280 (nm) oranları

|           | <b>KAS</b>            |                      | <b>KARACİĞER</b>      |                      | <b>BÖBREK</b>         |                      |        |
|-----------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|--------|
|           | Konsantrasyon (ng/μl) | Safılık 260/280 (nm) | Konsantrasyon (ng/μl) | Safılık 260/280 (nm) | Konsantrasyon (ng/μl) | Safılık 260/280 (nm) |        |
| <b>D0</b> | 1                     | 172,5385             | 2,1840                | 420,30               | 2,1739                | 775,84               | 2,1578 |
|           | 2                     | 156,3846             | 1,9254                | 230,20               | 2,3456                | 821,46               | 2,1744 |
|           | 3                     | 145,6902             | 2,2012                | 221,40               | 2,3063                | 113,46               | 2,1377 |
|           | 4                     | 186,3552             | 2,1920                | 285,60               | 2,3260                | 750,62               | 2,1466 |
|           | 5                     | 152,3689             | 2,2122                | 222,30               | 2,2552                | 785,60               | 2,1515 |
| <b>D1</b> | 1                     | 242,6923             | 2,0474                | 2242,23              | 2,0960                | 277                  | 2,1851 |
|           | 2                     | 178,7692             | 2,1740                | 1068,872             | 2,2060                | 102,46               | 2,1173 |
|           | 3                     | 136                  | 2,1908                | 1662,61              | 2,3333                | 151,46               | 2,1944 |
|           | 4                     | 186,8696             | 2,0482                | 1500,56              | 2,1923                | 165,26               | 2,1725 |
|           | 5                     | 175,8545             | 2,3655                | 1025,52              | 2,1928                | 258,10               | 2,2025 |
| <b>D2</b> | 1                     | 172,84               | 2,1654                | 1167,92              | 2,1790                | 373,84               | 2,1726 |
|           | 2                     | 268,92               | 2,1760                | 1652,38              | 2,1861                | 366,61               | 2,1644 |
|           | 3                     | 220,88               | 2,1707                | 1311,2               | 2,1450                | 370,225              | 2,1685 |
|           | 4                     | 225,56               | 2,1852                | 1452,3               | 2,1516                | 385,228              | 2,1548 |
|           | 5                     | 205,78               | 2,1925                | 1789,29              | 2,1325                | 374,359              | 2,1485 |
| <b>D3</b> | 1                     | 150,53               | 2,1525                | 214,23               | 2,1639                | 267,84               | 2,1245 |
|           | 2                     | 420,84               | 2,1652                | 386,46               | 2,3929                | 241,65               | 2,1706 |
|           | 3                     | 285,685              | 2,1588                | 995,15               | 2,1717                | 287,60               | 2,0955 |
|           | 4                     | 359,256              | 2,1489                | 759,65               | 2,1545                | 245,32               | 2,1456 |
|           | 5                     | 285,458              | 2,1556                | 456,12               | 2,1485                | 258,15               | 2,1865 |
| <b>D4</b> | 1                     | 315,69               | 2,2266                | 2388,61              | 2,0537                | 264                  | 2,1777 |
|           | 2                     | 324,23               | 2,2505                | 1127,46              | 2,1782                | 539,53               | 2,1211 |
|           | 3                     | 420,84               | 2,1648                | 1181,46              | 2,1743                | 208,76               | 2,1931 |
|           | 4                     | 356,26               | 2,1654                | 2054,28              | 2,1654                | 256,28               | 2,1548 |
|           | 5                     | 314,56               | 2,2365                | 2289,69              | 2,1953                | 247,64               | 2,1584 |
| <b>D5</b> | 1                     | 158,3846             | 2,8367                | 1790,84              | 2,1609                | 128,30               | 2,1775 |
|           | 2                     | 175,1538             | 2,1884                | 226,76               | 2,1724                | 224,76               | 2,1773 |
|           | 3                     | 197,1538             | 2,1794                | 330,84               | 2,1955                | 178,53               | 2,1431 |
|           | 4                     | 145,9854             | 2,1456                | 548,52               | 2,1523                | 148,36               | 2,1685 |
|           | 5                     | 174,6598             | 2,1852                | 254,65               | 2,1765                | 175,25               | 2,1784 |

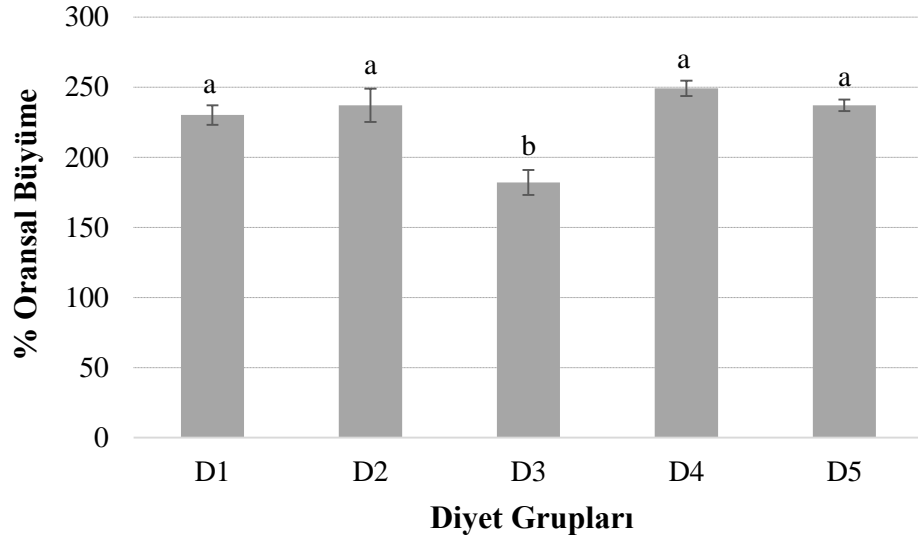
D0:Başlangıç örnek grupları, D1: Kontrol grubu %0 Arı sütü, D2:%0,1 Arı sütü, D3: %0,40 Arı sütü, D4: %1,6 Arı sütü, D5:%6,4 Arı sütü.



**Şekil 4.2.** İzole edilen RNA'ların % 1'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri

### 4.3. Oransal Büyüme (OB)

Çalışmada hesaplanan yem gruplarına yüzde oransal büyümeleri Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3'de verilmiştir. Yapılan hesaplamalarda D3 grubu haricinde D1, D2, D4 ve D5 gruplar arasında farklılığın istatistiksel (p>0.05) açıdan önemli olmadığı görülmüştür. En yüksek değer  $237,04 \pm 11,85$  ile D2 yem grubunda belirlenirken en düşük oransal büyüme ise  $182,04 \pm 8,80$  D3 grubunda olduğu belirlenmiştir. Yapılan hesaplamalarda D3 grubu haricinde D1, D2, D4 ve D5 gruplar arasında farklılığın istatistiksel (p>0.05) açıdan önemli olmadığı görülmüştür. En yüksek değer  $237,04 \pm 11,85$  ile D2 yem grubunda belirlenirken en düşük oransal büyüme ise  $182,04 \pm 8,80$  D3 grubunda olduğu belirlenmiştir. Çalışmada hesaplanan yem gruplarına yüzde oransal büyümeleri Çizelge 4.3'de verilmiştir.



**Şekil 4.3.** Farklı oranlarda beslenen arı sütünün Zebra balığı (*Danio rerio*) deneme süresince oransal büyüme (OB) değerleri (%)

#### 4.4. Spesifik Büyüme Oranı (SBO)

Tüm gruplarda Zebra balıklarının spesifik büyüme oranı yüzde oransal büyüme verileri ile benzerlik göstermiş olup sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir. Araştırma sonunda en yüksek SBO D4 diyeti ile beslenen grupta  $1,63 \pm 0,04$  oranında, en düşük değer ise D3 diyetleriyle beslenen muamele  $1,07 \pm 0,09$  ile belirlenmiştir. Diyetler arasında SBO değerleri bakımından D3 grubu diğer dört gruptan istatistiki olarak farklı olduğu ( $p < 0,05$ ) fakat D1, D2, D4 ve D5 yem grupları arasında değerler arasındaki farklılığın istatistiki olarak önemli olmadığı belirlenmiştir ( $p > 0,05$ ).

#### 4.5. Yem Değerlendirme Oranı ve Yaşama Oranı

Arı sütünün farklı konsantrasyonlarının ilave edildiği diyetlerde balıkların yem değerlendirme ve yaşama oranları üzerine etkilerinin olmadığı belirlenmiş olup her iki parametreye ait bulgular Çizelge 4.3'te verilmiştir. En düşük YDO  $2,28 \pm 0,26$  ile D1 grubunda iken en yüksek oran D4 grubu yem ile beslenen balıklarda  $2,81 \pm 0,44$  ile belirlenmiştir. Bütün gruplar arasında  $P > 0,05$ 'e göre bir farklılık olmadığı görülmüştür.

Yaşama oranları bakımından elde veriler YDO ile aynı doğrultuda olup Çizelge 4.3'te sunulmuştur. Gruplar arasında istatistiki bakımdan bir farklılık belirlenmemiştir ( $p>0,05$ ). En düşük yaşama oranı %78,67±10,48 ile D4 grubunda, en yüksek ise D3 grubunda %88,00±1,15 oranı ile belirlenmiştir.

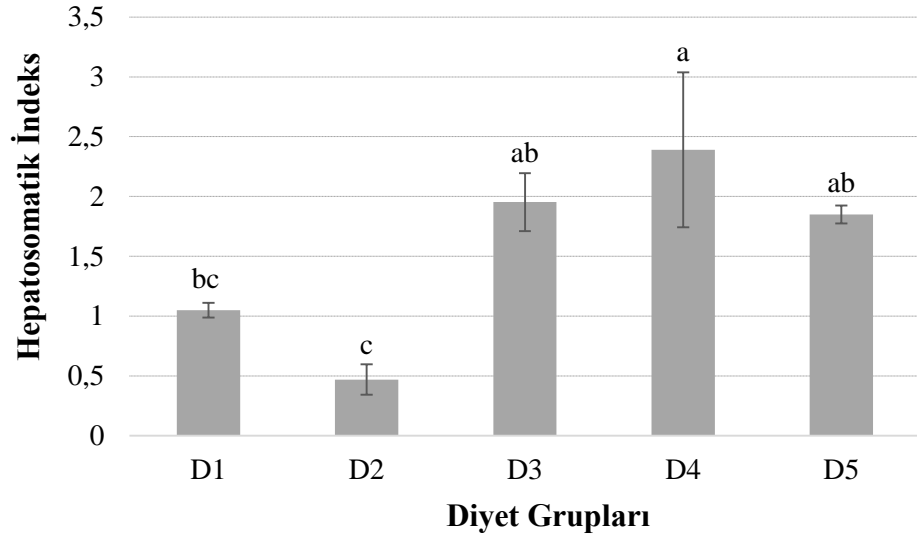
**Çizelge 4.3.** Arı sütünün Zebra balığı (*Danio rerio*)'nın deneme süresince oransal büyüme (OB), spesifik büyüme oranı (SBO), yem değerlendirme oranı (YDO) ve yaşama oranı (YO) değerleri (%).

|               | D1                       | D2                        | D3                       | D4                       | D5                       |
|---------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>OB (%)</b> | 230,14±6,90 <sup>a</sup> | 237,04±11,85 <sup>a</sup> | 182,04±8,80 <sup>b</sup> | 249,11±5,45 <sup>a</sup> | 237,01±4,12 <sup>a</sup> |
| <b>SBO(%)</b> | 1,49±0,05 <sup>a</sup>   | 1,54±0,09 <sup>a</sup>    | 1,07±0,09 <sup>b</sup>   | 1,63±0,04 <sup>a</sup>   | 1,54±0,03 <sup>a</sup>   |
| <b>YDO</b>    | 2,28±0,26                | 2,61±0,10                 | 2,41±0,29                | 2,81±0,44                | 2,45±0,01                |
| <b>YO (%)</b> | 79,33±6,77               | 82,67±5,81                | 88,00±1,15               | 78,67±10,48              | 84,00±1,15               |

$\bar{X} \pm S \bar{x}$  =Ortalama±Ortalamanın Standart Sapması, n=3. Her bir parametre için farklı harflerle işaretlenmiş ortalamalar birbirinden farklı olan grupları göstermektedir,  $p<0,05$ .

#### 4.6. Hepatosomatik İndeks (HSİ)

Dört farklı yemle beslenen Zebra balıklarının 2 aylık deneme sonunda hepatosomatik indeks değerlerinin analiz sonuçları Çizelge 4.3'te sunulmuştur. Bu veriler doğrultusunda en yüksek HSİ değeri D4 yemiyle beslenen grupta (2,39±0,65), en düşük değer ise D2 yemiyle beslenen balıklarda (0,48±0,13) belirlenmiştir. D4 grubu ile D3 ve D5 grupları arasında, D1 ile D2 grubu arasında ve D1 ile D3 ve D5 diyet grupları arasında istatistiki açıdan fark olmadığı belirlenmiştir ( $p>0,05$ ).



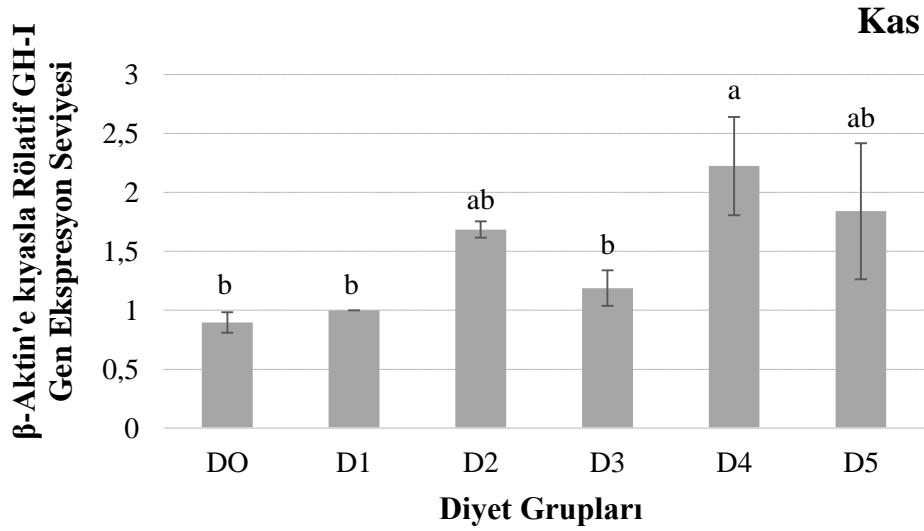
**Şekil 4.4.** Arı sütü ile beslenen Zebra balığı (*Danio rerio*)'nın deneme sonunda hepatosomatik indeks değerleri (%).

#### 4.7. Kas, Karaciğer ve Böbrek Dokularında GH-I mRNA Seviyesi

Araştırmada farklı oranlarda arı sütü içeren diyetlerin Zebra balığı (*Danio rerio*)'nın kas, karaciğer ve böbrek dokularında GH-I mRNA seviyelerine ait farklılıklar Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7, Çizelge 4.4.'te sunulmuştur. Kontrol grubu D1 (%0 arı sütü içeren) diyet mRNA seviyelerinin belirlenmesinde kalibratör olarak kullanılmış olup bu gruba ait gen ekspresyon miktarı 1 olarak kabul edilmektedir.

Kas dokusunda en yüksek GH-I gen ekspresyonu D4 diyeti ile beslenen balıklarda  $2,22 \pm 0,42$  ile belirlenirken en düşük ekspresyon miktarı  $1,19 \pm 0,15$  ile D3 diyet grubunda tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). Başlangıç örnekleme (D0), D1, D2, D3 ve D5 grupları arasında GH-I mRNA seviyesi bakımından istatistiki olarak fark bulunmamasına ( $p > 0,05$ ) rağmen D4 diyet grubu ile D0, D1 ve D3 grupları arasında ilgili hormona ait genin ekspresyon dereceleri arasında önemli farklılık olduğu  $p < 0,05$ 'e göre belirlenmiştir. Diğer taraftan D4 diyet grubu ile D2 ve D5 grupları arasından GH-I mRNA seviyesi incelendiğinde farklılığın istatistiki olarak önemli olmadığı belirlenmiştir ( $p < 0,05$ , Şekil 4.5). Sonuç olarak, %1,6 oranında arı sütü ilave edilen D4 grubu balıklarının kaslarında GH-I hormonuna ait genin ekspresyon derecesi kontrol

grubuna oranla  $2,22 \pm 0,55$  kat daha fazla eksprese olmasına rağmen diğer diyet gruplarında bu gene ait ekspresyon derecesi kontrol grubundan düşük oranda gerçekleştiği tespit edilmiştir.



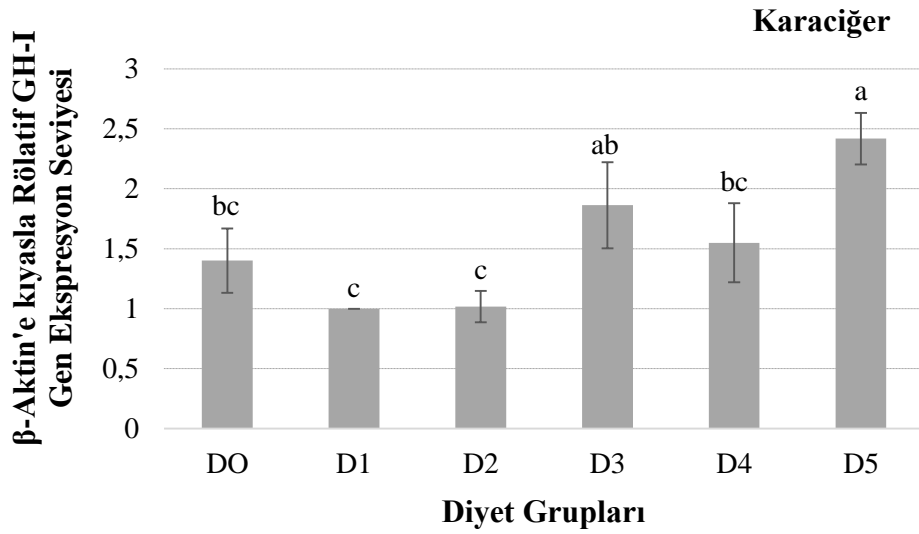
**Şekil 4.5.** Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı (*Danio rerio*)'nın kas dokusu GH-I mRNA seviyesi

Karaciğer dokusunda GH-I mRNA seviyeleri diyet gruplarında kas dokusuna göre farklılık göstermiştir. Kas dokusunda en yüksek ekspresyon derecesi D4 diyet grubunda iken karaciğerde D5 diyetleri ile beslenen balıklarda  $2,42 \pm 0,22$  olarak belirlenmiştir. Bu dokuda en düşük ekspresyon değeri  $1,02 \pm 0,13$ 'dir. Sonuçlar istatistiki olarak incelendiğinde D0, D1, D2, ve D4 uygulamaları arasında farklılık olmadığı ( $p > 0,05$ ), D5 diyet grupları balıklarında mRNA seviyelerinin ise diğer gruplardan yüksek olup bu farklılık  $p < 0,05$ 'e göre önemlidir. Diğer taraftan D2, D4 ve D5 grupları arasında karaciğer dokusunda ilgili gen ekspresyon derecesi bakımından farklılık olmadığı istatistiki olarak analiz edilmiştir ( $p > 0,05$ ). Ayrıca kontrol grubuna göre D5 diyetleri ile beslenenler  $2,42 \pm 0,22$ , D3 ile beslenenler  $1,86 \pm 0,36$ , ve D4 diyet grubunda ise  $1,55 \pm 0,33$  kat daha eksprese olmuştur.

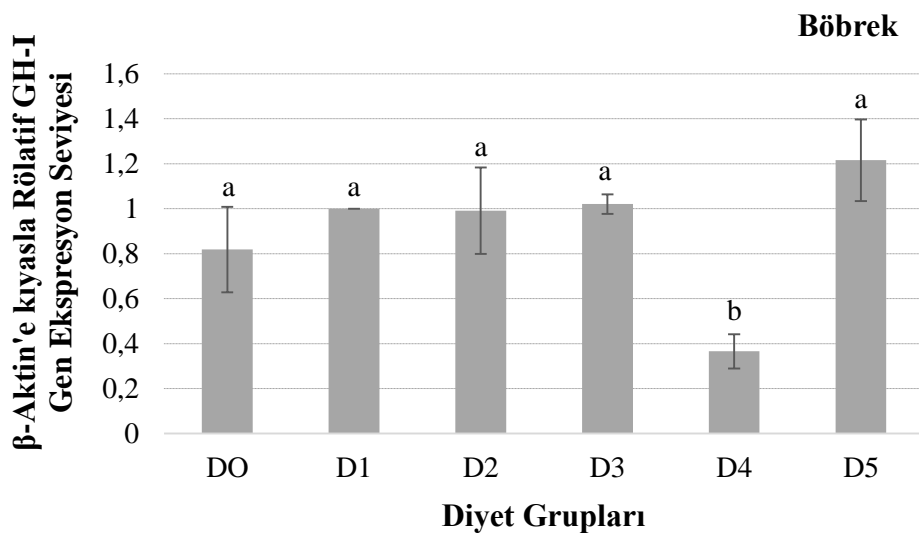
Böbrek dokularında ise en düşük ekspresyon miktarı D4 diyeti ile beslenen balıklarda belirlenmiş olup diğer gruplardan  $p < 0,05$ 'e göre istatistiki olarak farklı bulunmuştur.



Diğer taraftan D5 grubu en yüksek mRNA seviyesine sahip olmasına rağmen D0, D1, D2 ve D3 gruplarından istatistiki olarak farklı olmadığı tespit edilmiştir ( $p>0,05$ ). D5 grubundaki ekspresyon miktarı kontrol grubuna göre  $1,22\pm 0,18$  kat daha fazla eksprese olurken D4 grubu böbreklerinde kontrole göre yaklaşık %65 daha fazla mRNA seviyesi belirlenmiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.7).



**Şekil 4.6.** Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı (*Danio rerio*)'nın karaciğer dokusu GH-I mRNA seviyesi.

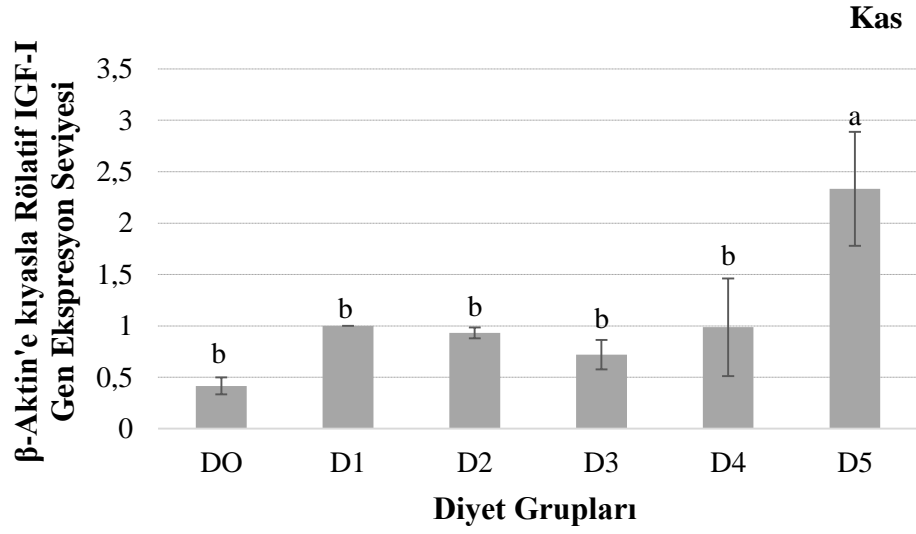


**Şekil 4.7.** Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı (*Danio rerio*)'nın böbrek dokusu GH-I mRNA seviyesi.

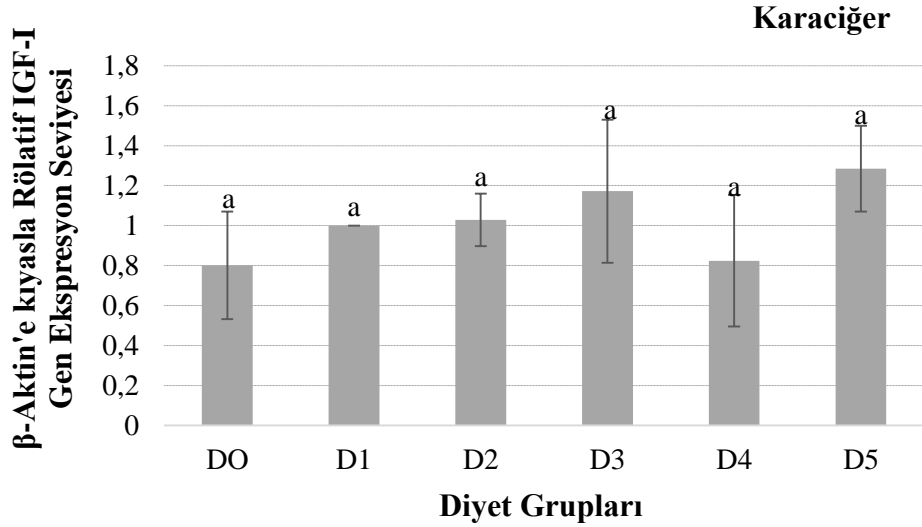
#### 4.8. Kas, Karaciğer ve Böbrek Dokularında IGF-I mRNA Seviyesi

Büyüme metabolizmasında görevli olan bir diğer gen olan IGF-I mRNA seviyesi bakımından diyet gruplarına ait balık örneklerinin kas, karaciğer ve böbrek dokuları analiz edilmiş, elde edilen bulgular Şekil 4.8, 4.9 ve 4.10, Çizelge 4.4.'te sunulmuştur. Kas dokusundan elde edilen mRNA'lerden yapılan Real-Time PCR analizleri sonucunda en yüksek ekspresyon  $2,33\pm 0,55$  ile %6,4 arı sütü ihtiva eden D5 grubu Zebra balıklarına ait balıklarda, en düşük değer ise GH-I hormonunda olduğu gibi D3 diyet grubunda  $0,92\pm 0,46$  olduğu görülmüştür. Ayrıca D5 grubu ekspresyon derecesinin başlangıç örnekleri ve diğer diyet gruplarına oranla daha yüksek olduğu ve farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Diğer taraftan D0, D1, D2, D3 ve D4 gruplar arasında ilgili gen bakımından  $p>0,05$ 'e göre bir farklılık olmadığı analiz edilmiştir. Diğer bir bakış açısı ile D5 grubu balıklarında IGF-I mRNA seviyesi kontrol grubuna oranla  $2,33\pm 0,55$  kat daha fazla eksprese olurken, diğer muamele grupları kalibratör D1 grubunun mRNA seviyesinin altında seyrettiği sonucu elde edilmiştir.

Karaciğer dokularında kas dokusunda olduğu gibi en yüksek IGF-I ekspresyon derecesi D5 grubu balıklarında  $1,28\pm 0,33$  kaydedilirken en düşük değer D4 grubunda olduğu analizler sonucu belirlenmiştir (Şekil 4.9 ve Çizelge 4.4). Diğer taraftan tüm diyet grupları arasında ve diyet gruplarının başlangıç örneklerine göre bu genin mRNA seviyesi bakımından istatistiki bakımdan bir farklılık olmadığı analiz edilmiştir ( $p>0,05$ ).



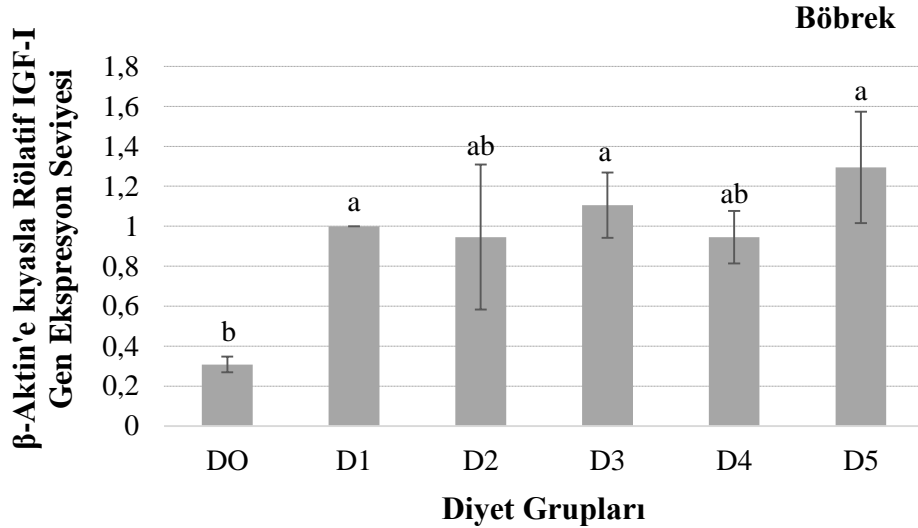
**Şekil 4.8.** Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı (*Danio rerio*)'nın kas dokusu IGF-I mRNA seviyesi.



**Şekil 4.9.** Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı (*Danio rerio*)'nın karaciğer dokusu IGF-I mRNA seviyesi.

Araştırma bulgularına göre böbrek dokusunda IGF-I mRNA ekspresyon seviyesi en yüksek grup  $1,30 \pm 0,28$  ile D5 grubunda, en düşük değer ise  $0,95 \pm 0,13$  D4 diyetleri ile beslenen balıklarda bulunmuştur. İstatistiki açıdan incelendiğinde başlangıç örnekleri hariç tutulduğunda diyet grupları içerisinde istatistiki bir farklılık olmadığı analiz edilmiştir ( $p > 0,05$ ). Ayrıca D5 ve D4 grupları sonuçlarının dışında diğer gruplara ait

ekspresyon seviyeleri kalibratör olarak kullanılan kontrol grubu derecesinin altında ölçülmüştür (Şekil 4.10 ve Çizelge 4.4).



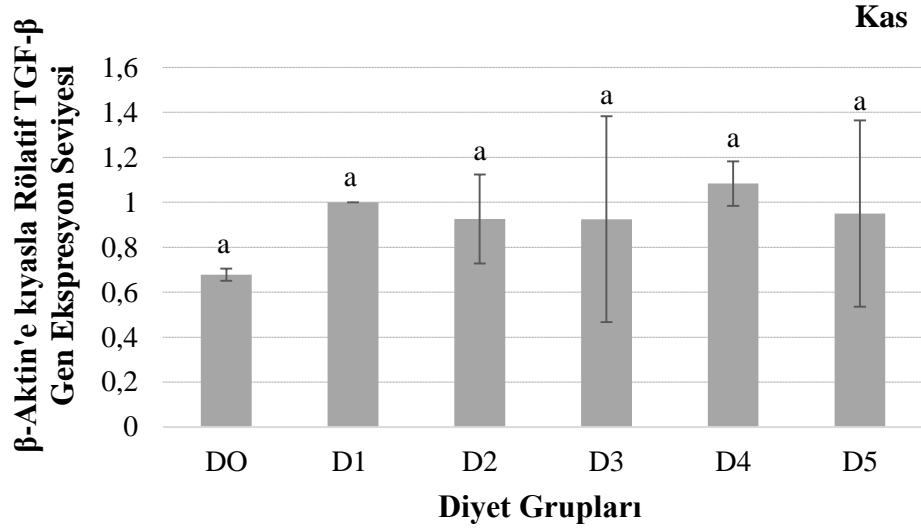
**Şekil 4.10.** Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı (*Danio rerio*)'nın böbrek dokusu IGF-I mRNA seviyesi.

#### 4.9. Kas, Karaciğer ve Böbrek Dokularında TGF- $\beta$ mRNA Seviyesi

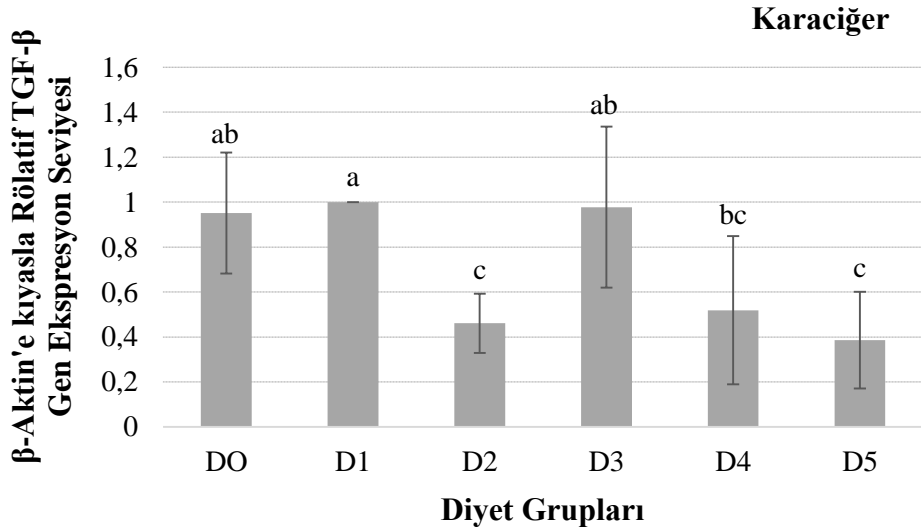
İmmün sistemde önemli bir rol oynayan aynı zamanda büyüme metabolizmasında görev alan GH-I dolayısı ile IGF-I gibi bazı genlerin ekspresyonunu kontrol eden TGF- $\beta$  genine ait mRNA seviyesinin gruplara göre dokulardaki dağılımı Şekil 4.11, 4.12 ve 4.13, Çizelge 4.4'te sunulmuştur. İlk olarak kas dokusu ele alındığında yukarıda bahsedilen diğer iki gene rağmen gruplar arasında bir farklılık olmadığı  $p>0,05$ 'e göre tespit edilmiştir. En düşük mRNA seviyesi D3 grubunda  $0,93\pm 0,46$ , en yüksek ise  $1,08\pm 0,10$  ile D4 diyet grubu balıklarının kaslarında analiz edilmiştir. TGF- $\beta$  mRNA bakımından D0, D2, D3 ve D5 uygulama grupları D1 (kontrol) grubundan daha düşük eksprese olmuştur.

Diyet grupları arasında karaciğer dokusunda TGF- $\beta$  mRNA seviyesi incelendiğinde en yüksek ekspresyon miktarı D3 diyeti ile beslenen balıklarda ( $0,98\pm 0,09$ ), en düşük miktar ise D5 grubu balıklarda ( $0,39\pm 0,06$ ) tespit edilmiştir. Tüm uygulamalarda elde

edilen mRNA seviye miktarları kontrol grubu seviyesinin yani 1'in altında olduğu görülmüştür (Şekil 4.12).

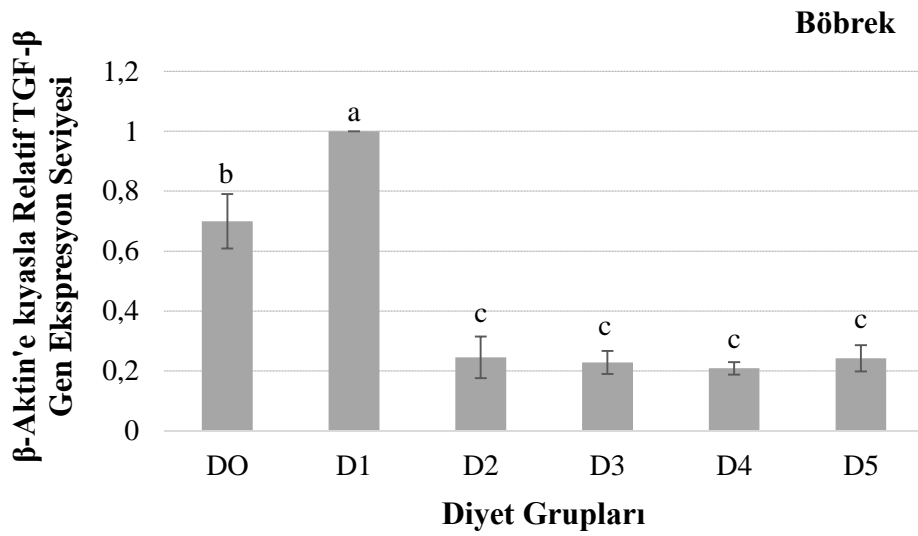


**Şekil 4.11.** Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı (*Danio rerio*)'nın kas dokusu TGF- $\beta$  mRNA seviyesi



**Şekil 4.12.** Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı (*Danio rerio*)'nın karaciğer dokusu TGF- $\beta$  mRNA seviyesi.

Böbrek dokusunda tüm uygulama gruplarında TGF- $\beta$  mRNA seviyesi kalibratör olarak kullanılan kontrol seviyesinin yani 1'in altında olduğu analizler sonucu elde edilmiştir (Şekil 4.13 ve Çizelge 4.4). En düşük değer D4 grubunda  $0,21\pm 0,02$  miktarında, en yüksek ekspresyon ise  $0,25\pm 0,07$  D2 diyeti ile beslenen balıkların böbreklerinde analiz edilmiştir. Fakat diyet grupları arasında (D2, D3, D4 ve D5) böbrek dokusunda TGF- $\beta$  mRNA seviyeleri arasında istatistiki açıdan bir fark olmadığı hesaplanmıştır ( $p>0,05$ ).



**Şekil 4.13.** Farklı oranlarda arı sütü içeren yemlerle beslenen Zebra balığı (*Danio rerio*)'nın böbrek dokusu TGF- $\beta$  mRNA seviyesi

**Çizelge 4.4.** Kas, karaciğer ve böbrek dokularında IGF-I, GH-I ve TGF- $\beta$  mRNA seviyesi değerleri

| GENLER DOKU  |           | D0                            | D1                           | D2                            | D3                            | D4                            | D5                            |
|--------------|-----------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| TGF- $\beta$ | Böbrek    | 0,70 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>  | 1,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> | 0,25 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>  | 0,23 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>  | 0,21 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>  | 0,24 $\pm$ 0,04 <sup>c</sup>  |
|              | Karaciğer | 0,95 $\pm$ 0,29 <sup>ab</sup> | 1,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> | 0,46 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>  | 0,98 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup> | 0,52 $\pm$ 0,14 <sup>bc</sup> | 0,39 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>  |
|              | Kas       | 0,68 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>  | 1,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> | 0,93 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>  | 0,92 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>  | 1,08 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>  | 0,95 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>  |
| IGF-I        | Böbrek    | 0,30 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>  | 1,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> | 0,95 $\pm$ 0,36 <sup>ab</sup> | 1,10 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>  | 0,95 $\pm$ 0,13 <sup>ab</sup> | 1,30 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>  |
|              | Karaciğer | 0,80 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>  | 1,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> | 1,03 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>  | 1,17 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>  | 0,82 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>  | 1,28 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>  |
|              | Kas       | 0,42 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>  | 1,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup> | 0,93 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>  | 0,72 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>  | 0,99 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup>  | 2,33 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>  |
| GH-I         | Böbrek    | 0,82 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>  | 1,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> | 0,99 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>  | 1,02 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>  | 0,37 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>  | 1,22 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>  |
|              | Karaciğer | 140 $\pm$ 0,27 <sup>bc</sup>  | 1,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup> | 1,02 $\pm$ 0,13 <sup>c</sup>  | 1,86 $\pm$ 0,36 <sup>ab</sup> | 1,55 $\pm$ 0,33 <sup>bc</sup> | 2,42 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>  |
|              | Kas       | 0,90 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>  | 1,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup> | 1,68 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup> | 1,19 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>  | 2,22 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>  | 1,84 $\pm$ 0,58 <sup>ab</sup> |

DO: Başlangıç örnek grupları, D1: Kontrol grubu %0 Arı sütü, D2:%0,1 Arı sütü, D3: %0,40 Arı sütü, D4: %1,6 Arı sütü, D5:%6,4 Arı sütü. a, b ve c: İstatistiksel açıdan önem derecesi ( $p<0,05$ )

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

### 5.1. Büyüme ve HSI Değerlerine İlişkin Tartışma

Önemli bir model organizma olan Zebra balığı (*Danio rerio*) büyüme, gelişme, diyet ve laboratuvar çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Zebra balığı diyetlerinin standardize edilmesinde ve yem ilave maddelerinin canlılar üzerine metabolik etkilerinin araştırılmasında tercih edilmektedir. Araştırma bulgularında bahsedildiği ve Çizelge 5.1 ve Şekil 5.1'deki gibi deneme sonunda bireysel canlı ağırlık artışları arasında  $p < 0,05$ 'e göre farklılık görülmüştür. Araştırma sonuçlarımız balıklar üzerine yapılan bir çok besleme çalışması sonuçları ile örtüşmekte olup bu çalışmalarda türe bağlı olarak değişim gösterdiği belirlenmiş olmasına rağmen (Bromley 1980; Higgs *et al.* 1985; Hughes 1989; Ekanem 1996; Lee *et al.* 1997, Grove *et al.* 2001) özellikle Zebra balığı üzerine yapılan bir çalışmada farklı yem katkı maddelerinin balıkların büyüme verileri üzerine etkili olduğunu belirtmişlerdir (Diogo *et al.* 2014). Deneme sonu balık ağırlıklarına göre D3 grubu hariç diğer yem grupları arasında farklılık olmaması yapılan bir çok besleme çalışmasının sonuçları ile benzerlik göstermiştir. Örneğin Sirkecioğlu (2011) ve bir çok araştırmacı tarafından yapılan bir çalışmada farklı yağ kaynaklarının balıkların oransal büyüme verileri üzerine etki etmediği bulguları ile örtüşmektedir (Jobling *et al.* 1991; Legendre *et al.* 1995; Martins *et al.* 2005; Richard *et al.* 2006 a,b). Ancak yemlere ilave edilen arı sütünün balıkların büyüme oranlarını matematiksel hesaplamalara göre olumsuz etkilemediği bu sonucun farklı yağ kaynaklarının balıkların büyüme performanslarını etkilemediği hipotezi ile örtüşmektedir (Bell *et al.* 1991a,b, 1992, 1993, 2002; Lie *et al.* 1993; Waagbø *et al.* 1993a,b; Thompson *et al.* 1996; Tocher *et al.* 1997; Torstensen *et al.* 2000; Rosenlund *et al.* 2001; Rollin *et al.* 2003).

Balık besleme çalışmalarında büyüme performansının belirlenmesinde önemli bir parametre olarak kullanılan spesifik büyüme oranları bizim çalışmamızda incelendiğinde oransal büyüme verileri ile benzerlik göstermektedir. Yani D3 diyetleri ile beslenen grup hariç diğer uygulamalar arasında farklılık olmadığı belirlenmiştir ( $p > 0,05$ , Çizelge 5.2). Bu araştırma verilerimiz Perez-Sanchez *et al.* (2015)'nin Çipura

balıkları yemlerine ilave edilen bir NEXT ENHANCE<sup>®</sup> maddesinin farklı oranlarının SBO üzerine gruplar arası farklılığın  $p>0,05$ 'e göre olmadığı verileri ile örtüşmektedir. Diğer bir çalışmada ise Zebra balığı diyetlerine farklı oranlarda katılan vitamin E'nin SGR verileri oransal büyüme verileri ile aynı düzlemde olduğunu bildirmişlerdir (Mehrad *et al.* 2012).

Diğer bütün canlılarda olduğu gibi balıklarda da büyümede gerekli olan enerjinin sağlanması ve yemlerin değerlendirilme oranının belirlenmesinde kullanılan parametrelerden birisi yem değerlendirme oranıdır. Yem değerlendirme oranının 1'i altında ya da eşit olması istenilen bir durumdur (Lindhors-Emme 1990; Çelikkale 1994; Aras vd 2000). Farklı oranlarda arı sütü içeren diyetlerle beslenen Çipura balıklarının yem değerlendirme oranlarının gruplar  $p>0,05$ 'e arasında farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Yem değerlendirme oranı bakımından elde edilen verilerimiz Perez-Sanchez *et al* (2015)'in bulguları ile örtüşmektedir.

Deneme süresince diyet gruplarında ölü balıklar belirlemiş olup ağırlıkları hesaplanarak günlük yem miktarındaki değişimler uygulanmıştır. Çizelge 4.1'de sunulduğu gibi yaşama oranları bakımından diyet uygulamaları arasında bir farklılık olmadığı için bu veriler zebra balıkları üzerinde yapılan bazı çalışma verileri ile benzerlik arz etmektedir (Mehrad *et al.* 2012; Perez-Sanchez *et al.* 2015).

Beslenme alışkanlıklarına ve yem maddesindeki ingredientler sindirilme kapasitesine bağlı olarak değişmektedir. Balıkların büyümesine, diyetleriyle aldıkları yağ miktarına bağlı olarak hepatosomatik indeks değeri artmaktadır (Steffens 1997; Torstensen *et al.* 2000; Rosenlund *et al.* 2001; Chaiyapechara *et al.* 2003; Piedecaus *et al.* 2007). Bizim çalışmamızda elde edilen verilere göre hesaplanan HSİ değerleri diyetlerden etkilendiği ve oransal büyüme parametreleri ile benzer eğilimde olduğu belirlenmiştir. Bu veriler Perez-Sanchez *et al.* 2015'in ilave maddenin farklı oranlarının HSİ oranını etkilemediği sonuçları ile desteklenmektedir.



## 5.2. Büyüme Hormonlarının Transkriptomik Seviyede Karşılaştırılması

### 5.2.1. Kas, karaciğer ve böbrek dokularından elde edilen GH-I mRNA seviyesi

Omurgalılarda olduğu gibi balıklarda da endokrin sisteminin düzenlenmesinde büyüme hormonu (GH-I) önemli bir rol oynamaktadır. Büyüme metabolizmasının düzenlenmesinde hem iç faktörler hem de dış faktörler etkilidir. Beslenme, büyüme metabolizmasının düzenlenmesinde etkili olan en önemli dış faktörlerden biridir. Yani besin madde kompozisyonu balıkların büyümeleri üzerine balığın ihtiyaçlarını içerip içermemesine göre olumlu yada olumsuz etki etmektedir (Company *et al.* 2001; Sirkecioğlu 2011; Reindl and Sheridan 2012). Kas dokularında en yüksek GH-I mRNA seviyesi %1,6 oranında arı sütü içeren diyetler ile beslenen balıklarda görülürken D5 ve D2 diyetlerindeki bu genin ekspresyon dereceleri arasında  $p < 0,05$ 'e göre farklılık bulunmamıştır. Benedito-Palos *et al.* (2007) yapılan bir çalışmada balığın ihtiyaç duyduğu yağ asidi kompozisyonunu yeteri derecede ihtiva etmeyen yağ kaynakları ile beslendiğinde büyüme genlerinin mRNA seviyesinin miktarında azalma olduğu bildirilmiştir. Bu veriler ışığında büyüme hormonu GH-I hipofizden salgılanan bir hormon olması sebebiyle bu hormona ait genin ekspresyonunun dokulara göre değiştiği büyüme mekanizmasının gereğidir (Picha *et al.* 2008).

Diğer bir doku olarak ele alınan karaciğer dokusunda ise ilgili gene ait ekspresyon dereceleri kas dokusuna oranla farklılık gösterdiği Şekil 4.5 ve 4.6' da verilmiştir. D4 diyeti ile beslenen balıkların kas dokusunda diğer uygulamalara göre GH-I yüksek oranda eksprese olurken karaciğer dokusunda D4 diyet grubunda düşük oranda sentezlendiği belirlenmiştir. Kas ve karaciğer dokularında GH-I sentezi hipofiz dokusuna göre daha düşük oranda gerçekleşmesine rağmen karaciğer dokusu kas dokusuna oranla daha yüksek olması gerektiği İçoğlu-Aksakal (2013) gökkuşuğu alabalıkları üzerine yaptığı bir çalışmada bildirilmiş olup bu sonuç bizim çalışmamızda net olarak görülmemiştir. Bunun sebebi materyal balığın türü olup Zebra balığı erken cinsi olgunluğa erişen bir tür olduğu için büyüme kabiliyetinin düşük olması sebebiyle ovaryum gelişiminin kas dokusunda ki sentezi baskıladığı düşünülmektedir.

Son yıllarda böbrek dokularında büyüme hormonlarının miktarı aynı zaman da bu hormonlara ait genlerin mRNA seviyeleri üzerine çeşitli faktörlerin etkileri model organizmalar kullanılarak araştırılmaktadır. Büyüme hormonlarının hem plazmada hem de dokulardaki miktarı böbrek gelişimini etkilemekte olup fonksiyonlarının düzenlenmesi için önem arz etmektedir (Roelfsema and Clark 2001). Çalışmamızda D4 grubu haricinde diğer muameleler arasında  $p>0,05$ 'e göre farklılık olmadığı belirlenmiştir. Sonuçlarımız kas ve karaciğer dokusunda böbrek dokusuna oranla daha yüksek GH-I ekspresyonu gerçekleşmiştir. Bu durum Zebra balığının tatlı su balığı olması ile açıklanmaktadır. Çünkü böbrek gelişimi tuzlu su balıklarında tatlı su balıklarına oranla daha yüksektir. Diğer bir ifade ile büyüme hormonu ve IGF metabolik sistemine göre GH hormonlarının hipotalamustan salgılanması ile karaciğerde IGF-I'in sentezi başlamaktadır. Bu mekanizmanın devam eden aşamalarında karaciğerde sentezlenen IGF-I'in miktarına bağlı olarak böbrek ve diğer dokularda IGF-II sentezi başlamakta olup doku gelişimi gerçekleşmektedir (Duan 1997; Reinecke 2010; Sheridan and Hagemeister 2009).

### **5.2.2. Kas, karaciğer ve böbrek dokularından IGF-I mRNA seviyesi**

İnsülin benzeri büyüme faktörü-I karaciğerde yüksek olarak eksprese edilmektedir. Karaciğerde ekspresyon derecesini hipofizden salgılanan GH-I stimüle etmektedir. IGF-I, büyüme hormonunun artmasıyla sentezlenmesi gerekirken bu durum besin madde alımının yetersiz olması durumunda gerçekleşmeyebilir. Çünkü büyümenin tamamlanması için metabolizmanın ihtiyaç duyduğu besin madde miktarının diyetler ile alınması gerekmektedir (Picha *et al.* 2008). Kas dokusunda IGF-I miktarı incelendiğinde en yüksek IGF-I mRNA seviyesi %6,4 arı sütü ihtiva eden diyetler ile beslenen balıklarda görülürken diğer gruplar arasındaki farklılık istatistiki olarak çok önemli bulunmuştur. GH-I bakımından D4 grubundan mRNA seviyesi yüksek çıkmışken IGF-I bakımından düşük olduğu görülmüştür. Bu durum balıklar arasında bireysel varyasyona veya stres faktörüne bağlanmaktadır.

Büyümeden sorumlu olan IGF-I hormon genleri karaciğer dokusunda fazla eksprese olması beklenmektedir. Çünkü GH-IGF sisteminin çalışma mekanizmasında hipotalamustan salgılanan GH miktarına göre karaciğerde IGF-I salınımı başlamaktadır. Bu hormon en fazla karaciğerde salgılanmakla birlikte büyümenin olduğu tüm dokularda da belirli oranlarda salgılanmaktadır (Reinecke 2010). Bizim çalışmamızda D5 grubu balıkları ile beslenen balıklar haricinde diğer tüm gruplarda IGF-I seviyesi kas dokusunda karaciğer dokusuna oranla daha az eksprese olduğu ve bu bilgiler bizim araştırma verilerimiz ile örtüşmektedir. Ayrıca karaciğer dokusunda diyet grupları arasında IGF-I mRNA seviyesi bakımından  $p>0,05$ 'e göre bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar Gökkuşluğu alabalığında Chauvigne *et al.* (2003) tarafından yapılan bir çalışmada IGF-I mRNA seviyelerini üç farklı örnekleme döneminde belirlemiş ve son örnekleme dönemlerinde seviyenin düştüğünü tespit etmiştir.

### **5.2.3. Kas, karaciğer ve böbrek dokularında TGF- $\beta$ mRNA seviyesi**

TGF- $\beta$  canlılarda hücre büyümesini ve hücrelerin farklılaşmasını kontrol eden bir hormondur. İmmun sistemin düzenlenmesinde ve gelişmekte olan hücrelerin farklılaşmasında morfogen olarak görev yapmaktadır. Bu gen hemen hemen her hücrede sentezlenmekte olup hücreler arası sinyal mekanizmasında görev almaktadır (Clark and Coker 1998; Derynck and Miyazono 2008; Nagaraj and Datta 2010; McLean 2012). Ayrıca büyümeyi düzenleyen GH-I ve IGF-I genlerinin ekspresyonunu kontrol etmektedir.

Kas dokularında TGF- $\beta$  mRNA seviyesine farklı oranlarda arı sütü içeren diyetlerin etkisi incelendiğinde  $p>0,05$ 'e göre bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Ekspresyon dereceleri kalibratör olarak kullanılan kontrol grubunu derecesine yani 1'e yakın çıkması arı sütünün balıklar üzerine olumsuz etkisi olmadığı kanaatini oluşturmuştur. Xu and Chegini (2003) ve Ding *et al.* (2004)'un TGF- $\beta$  mRNA seviyesinin dokulardaki artışı hipotezleri ile örtüşmektedir.

İlgili gen bakımından karaciğer dokularında diyet grupları arasında istatistiki olarak önemli farklılık görülmüş olup D5, D4 ve D2 diyetlerinde kontrol (D1, kalibratör) ve başlangıç (D0) gruplarına göre yaklaşık %50 oranında daha düşük mRNA seviyesi olduğu belirlenmiştir. Karaciğerde TGF- $\beta$  mRNA seviyesi düşük çıkan diyet gruplarının oransal büyüme değerleri diğer gruplara göre yüksek olduğu fakat farklılığın  $p>0,05$ 'e göre önemli olmadığı görülmüştür. Ayrıca dokulardaki büyümeyi başlatan IGF-I hormonuna ait genin ekspresyon dereceleri karaciğer dokusunda bu gruplarda diğerlerine göre fazla seviyede gözlendiği bulgusu TGF- $\beta$ 'nin büyüme (GH-I ve IGF-I) genlerinin ekspresyonunu kontrol ettiği ve bilgileriyle örtüşmektedir (Xu and Chegini 2003; Ding *et al.* 2004).

Diyet gruplarının böbrek dokusunda karaciğere göre daha fazla oranda düşük ekspresyon oranının olduğu ve bu oranın kontrole göre yaklaşık % 80 daha az seviyede olduğu belirlenmiştir. Bu veriler IGF-I'in böbrek dokusu mRNA seviyeleri ile ters bir ilişki içindedir. Yani IGF-I'in dokudaki artışı TGF- $\beta$ 'nin düşüşüne sebep olmuştur.

**KAYNAKLAR**

- Aksakal, E., Ceyhun, S.B., Erdogan, O., Ekinci, D., 2010. Acute and long-term genotoxicity of deltamethrin to insulin-like growth factors and growth hormone in rainbow trout. *Comperative Biochemistry and Physiology C*, 152, 451–455.
- Aksakal-İçoğlu, İ., 2013. Farklı Yağ Kaynağı İçeren Diyetlerin Gökkuşağı Alabalıklarında (*Oncorhynchus Mykiss*) Bazı Büyüme (GH-I), (IGF-I), (IGF-II) ve İmmün Sistem (Tgf- $\beta$ ) Genleri Ekspresyonu Üzerine Etkileri”, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Albert, S., Klaudiny, J., Simúth, J., 1999. Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Insect biochemistry and molecular biology*, 29(5), 427-434.
- Anonim, 2015. [http://www.turkhaygen.gov.tr/doc/VIZYON\\_2023.pdf](http://www.turkhaygen.gov.tr/doc/VIZYON_2023.pdf)
- Aras, N., Kocaman E.M., Aras, M.S., 2000. Genel Su Ürünleri ve Kültür Balıkçılığı Temel Esasları. Atatürk Ün. Ziraat Fak. Su Ürünleri Bölümü, Erzurum Yayın No:216.
- Bachanova, K; Klaudiny, J; Kopernicky, J; Simuth, J., 2002. Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus* larvae larvae through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie* 33 (3),259-269
- Bell, J.G., Dick, J.R., Mc Vicar, A.H., Sargent, J.R., Thompson, K.D., 1993. Dietary sunflower, linseed and fish oils affect phospholipid fatty acid composition, development of cardiac lesions, phospholipase activity and eicosanoid production in Atlantic salmon. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 49: 665–673.
- Bell, J.G., Henderson, R.J., Tocher, D.R., McGhee, F., Dick, J.R., Porter, A., Smullen,R. and Sargent,J.R., 2002. Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atalntic salmon (*Salmo salar*) affects tissue fatty acid compositions and hepatic fatty acid metabolism. *Journal of Nutrition*, 132, 222-230.
- Bell, J.G., Sargent, J.R., Raynard, R.S., 1992. Effects of increasing dietary linoleic acid on phospholipid fatty acid composition and eicosanoid production in leucocytes and gill cells of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 45: 197–206.
- Benedito-Palos, L., Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., Kaushik,S., Pérez-Sánchez, J., 2007. Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): Networking of systemic and local components of GH/IGF axis. *Aquaculture*, 267, 199–212.
- Bilikova, K., Hanes, J., Nordhoff, E., Saenger, W., Klaudiny, J., Simuth, J., 2002. Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization. *Febs Letters*, 528 (1-3), 125-129.

- Bincoletto, C., Eberlin, S., Figueiredo, C a v; Luengo, M b; Queiroz, M. L. S., 2005. Effects produced by Royal Jelly on haematopoiesis: relation with host resistance against Ehrlich ascites tumour challenge. *International immunopharmacology*, 5 (4), 679-688.
- Bogdanov S., Jurendic T., Sieber R., Gallmann P., 2008. Honey for Nutrition and Health , A Review. *Journal of American College Nutrition*; 27 (6), 677–689.
- Bogdanov, S., 2011. Royal jelly, bee brood: composition, health, medicine: a review. [www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net), *Lipids*, 3(8), 8-19.
- Bonomi, A., Bonomi, B m. 2002. La gelatina reale nell' alimentazione dei vitelli in fase de svezzamento., *Apitalia* 29 (9-10;11-12), 45-50.
- Bromley P.J., 1980. The effect of dietary water content and feeding rate on the growth and food conversion efficiency of turbot (*Scophthalmus maximus L.*), *Aquaculture*, 20: 91-99.
- Buratti S., Benedetti S., Cosio M.S., 2007. Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly amperometric flow injection analysis. *Talanta* 71, 1387-1392.
- Burimistrova, L., Agafonov, A., Budnikova, N., Haritonova, M., 2008. Methods for the stabilisation of biologically active components royal jelly. *Apitherapy today*, Ribnoe, pp 175-182.
- Çelikkale, S., 1994. İç Su Balıkları Yetiştiriciliği Cilt 1(2), Trabzon.
- Chaiyapechara, S., Casten, M.T., Hardy, R.W., Dong, F.M., 2003. Fish performance, fillet characteristics, and health assessment index of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing adequate and high concentrations of lipid and vitamin, *Aquaculture*, 169: 715-738.
- Chauvin, R., 1968. Action physiologique et therapeutique des produits de la ruche *Traite de biologie de l'abeille*. Masson; Paris, pp 116-154.
- Chauvin, R., 1987. *La ruche et l'homme*. Calmann-Lévy. France.
- Chen, T.H., Cheng, Y.M., Cheng, Y., Chou, C.T., Hsiao, C.Y., Ko, C.F., 2010. Growth and transcriptional effect of dietary 2,20,4,40-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) exposure in developing Zebra fish (*Danio rerio*). Elsevier, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 377–383.
- Clark, D. A., and Coker, R., 1998. Molecules in focus Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ). *The international journal of biochemistry cell biology*, 30(3), 293-298.
- Cock, A. G., 1969. Genetical studies on growth and form in the fowl: 2. The complexity of changes in skeletal proportions produced by selection. *Genetical research*, 14(03), 237-247.
- Company, R., Astola, A., Pendon, C., Valdivia, M.M., Perez-Sanchez, J., 2001. Somatotropic regulation of fish growth and adiposity: growth hormone (GH) and somatolactin (SL) relationship. *Comperative Biochemistry and Physiology*, 130C, 435–445.
- Delaney, M., Follet, C., Ryan, N., Hanney, N., Lusk-Yablick, J., Gerlach, G., 2002. Social interaction and distribution of female zebrafish (*Danio rerio*) in a large aquarium. *The Biological Bulletin*, 203, p240-241.
- Dernekbaşı, S., Karayücel, İ., 2010. Balık yemlerinde kanola yağının kullanımı. *Journal Of Fisheries Sciences.Com*, 4(4), 469-479.

- Derynck R., and Miyazono K., 2008. TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family. In: Derynck R, Miyazono K, editors. The TGF- $\beta$  Family. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press;. pp. 29–43.
- Dickhoff, W. W., Beckman, B. R., Larsen, D. A., Duan, C., Moriyama, S., 1997. The role of growth in endocrine regulation of salmon smoltification. *Fish Physiology and Biochemistry*, 17(1-6), 231-236.
- Ding, L., Xu, J., Luo, X., and Chegini, N., 2004. Gonadotropin releasing hormone and transforming growth factor  $\beta$  activate mitogen-activated protein kinase/extracellularly regulated kinase and differentially regulate fibronectin, type I collagen, and plasminogen activator inhibitor-1 expression in leiomyoma and myometrial smooth muscle cells. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 89(11), 5549-5557.
- Diogo, P., Martins, G., Gavaia, P., Pinto, W., Dias, J., Cancela, L., Martínez-Páramo, S., 2015. Assessment of nutritional supplementation in phospholipids on the reproductive performance of zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Applied Ichthyology*, 31(S1), 3-9.
- Diomede-fresa, V., La Pesa, M., Restuccia, P., 1966. Influence of royal jelly on the appearance and development of IRE reticulo-sarcoma. *Pathologica*, 58 (865),309-315.
- Dogaroglu, M., 1993. Bal arılarında (*Apis mellifera L.*) hormonlar ve feromonlar. Trakya Üniv. Tekirdağ Ziraat Fak. Yayınları, No.164, 76s, Tekirdağ.
- Duan, C., 1997. The insulin-like growth factor system and its biological actions in fish. *American Zoologist*, 37, 491–503.
- Duan, C., 1998. Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish. *The Journal of nutrition*, 128(2), 306S-314S.
- Ekanem, S.B., 1996. Effects of feeding frequency, moist and dry feeds on the growth of *Chrysichthys nigrodigitatus* Lacepede and on pond water quality, *Aquaculture Research*, 27, 107–112.
- El nekeety, A. A., El kholy, W., Abbas, N. F., Ebaid, A., Amra, H. A., Abdel-Wahhab, M. A., 2007. Efficacy of royal jelly against the oxidative stress of fumonisin in rats. *Toxicon*, 50 (2),256-269.
- Elnagar, S., 2010. Royal jelly counteracts bucks' "summer infertility". *Anim.Repr.Sci*, 121,174-180.
- Erem, C., Deger, O., Ovali, E., Barlak, Y., 2006. The effects of royal jelly on autoimmunity in Graves disease. *Endocrine* 30 (2), 175–183.
- Ergün, S., 1997. Doğal ve Sentetik Karotenoid Kaynaklarının Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Pigmentasyona Etkisi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bil. Enst., Su ürünleri Anabilim Dalı, Samsun.
- Fang, F., 2003. Phylogenetic analysis of the Asian cyprinid genus *Danio* (*Teleostei, Cyprinidae*) *Copeia* 4, p714-728.
- Feng P, Catt KJ, Knecht M., 1988. Transforming growth factor- stimulates meiotic maturation of the rat oocyte. *Endocrinology* 122:181–186.
- Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., Kobayashi, K., 1990. A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *Journal of biological chemistry*, 265(19), 11333-11337.

- Furukawa, S., 2008. Stimulatory Effects of Royal Jelly on the Generation of Neuronal and Glial Cells” ,Expectation of Protection Against Some Neurological Disorders, Foods and Food Ingredients J.Jpn 213 (7).
- Gasic, S., Vucevic, D., Vasilijic, S., Antunovic, M., Chinou, I., Colic, M., 2007. Evaluation of the immunomodulatory activities of royal jelly components in vitro 36. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 29 (3-4), 521-536.
- Genç, M., Aslan, A., 1999. Determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content in pure royal jelly and royal jelly products by column liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 839(1), 265-268.
- Gmez-Requeni, P., de Vareilles, M., Kousoulaki, K., Jordal, A. E., Conceio, L. E., Rnnestad, I., 2011. Whole body proteome response to a dietary lysine imbalance in Zebrafish (*Danio rerio*). Comp Biochem Physiol Part D, 6, 178-186.
- Goddars, S., 1996. Feed Manegement in Intensive Aquaculture. Chapman and Hall, New York, USA.
- Gomez-Requeni, P., Kramer, M.N., Canosa, L.F., 2012. Regulation of somatic growth and gene expression of the GH-IGF system and PRP-PACAP by dietary lipid level in early juveniles of a teleost fish, the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). Journal of comperative Physiology B, 182, 517-530
- Grove, D., Genna, R., Paralika, V., Boraston, J., Hornyold, M. G. and Siemens, R. 2001. Effects of dietary water content on meal size, daily food intake, digestion and growth in turbot, (*Scophthalmus maximus L.*), Aquaculture Research, 32, 433-442.
- Guo, Y., Pan, Z., Heflin, J., 2005. LUBM: A benchmark for OWL knowledge base systems. Web Semantics: Science, Services and Agents on the World Wide Web, 3(2), 158-182.
- Halver, J., Hardy, W. R., 2002. Fish Nutrition, Academic Press., Elsevier Science, Third Edition, 417-423, USA.
- Hassan, A., 2009. Effect of royal jelly on sexual efficiency in adult male rats. J.Vet.Sci., 23,155-160.
- Hattori, N., Nomoto, H., Fukumitsu, H., Mishima, S., Furukawa, S., 2007. AMP N1-oxide Potentiates Astrogenesis by Cultured Neural Stem/Progenitor Cells Through STAT3 Activation. Biomedical Research, 28 (6), 295-299.
- Higgs, D.A., Markert, J.R., Plotnikoff, M.D., Mcbride, J.R., Dosanjh, B.S., 1985. Development of nutritional and environmental strategies for maximizing the growth and survival of juvenile pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*), Aquaculture,47: 113–130.
- Higgs, D.A., Sutton, J.N., Kim, H., Oakes, J.D., Smith, J., Biagi, C., Rowshandeli, M., Devlin, R.H., 2009. Influence of dietary concentrations of protein, lipid and carbohydrate on growth, protein and energy utilization, body composition, and plasma titres of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in non-transgenic and growth hormone transgenic coho salmon, (*Oncorhynchus kisutch*) (Walbaum). Aquaculture, 286, 127–137.
- Honda, S., 2011. Lifespan-Extending Effects of Royal Jelly and Its Related Substances on the Nematode *Caenorhabditis elegans*. Plos One, 6 (8).



- Hoşsu B., A.Y. Korkut., A. Fırat., 2003. Balık Besleme ve Yem Teknolojisi I, Balık Besleme Fizyolojisi ve Biyokimyası, 3. Baskı, Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi Yayınları.
- Houseknecht, K.L., Vanden, J.P., Moya-Camarena, S.Y., Portocarrero, C.P., Peck, L.W., 1998. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa / fa rat. *Biochemistry Biophysical Research Communications*, 244, 678–682.
- Howe, C. J., Fearnley, I. M., Walker, J. E., Dyer, T. A., Gray, J. C., 1985. Nucleotide sequences of the genes for the alpha, beta and epsilon subunits of wheat chloroplast ATP synthase. *Plant molecular biology*, 4(6), 333-345.
- Hughes S.G., 1989. Effect of dietary moisture level on response to diet by Atlantic salmon, *Progressive Fish Culturist*, 51: 20-23.
- Husein, M. Q., Haddad, S. G., 2006. A new approach to enhance reproductive performance in sheep using royal jelly in comparison with equine chorionic gonadotropin. *Animal Reproduction Science*, 93 (1-2),24-33.
- Husein, M. Q., Kridli, R. T., 2002. Reproductive responses following royal jelly treatment administered orally or intramuscularly into progesterone-treated Awassi ewes. *Animal Reproduction Science*, 74 (1-2),45-53.
- Inoue, S., Koya-Miyata, S., Ushio, S., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto, M., 2003. Royal Jelly prolongs the life span of C3H/HeJ mice: correlation with reduced DNA damage. *Experimental gerontology*, 38 (9),965-969.
- İpçak, H. H., Işık, R., Alçiçek, A., 2015. Kanatlı Hayvan Üretiminde Yeni Beslenme Uygulamaları: Nutrigenomik.
- Isidorov, V. A., Czy\_Zewska, U., Isidorova, A. G., Bakier, S., 2009. Gas chromatographic and mass spectrometric characterization of organic acids extracted from some preparations containing lyophilized royal jelly. *Journal of Chromatography B*, 877, 3776–3780.
- Jamnik, P., Goranovič, D. and Raspor, P., 2007. Antioxidative action of royal jelly in the yeast cell. *Experimental gerontology*, 42(7), 594-600. *Biotechnology*, 7, 576–587
- Jamnik, P., Goranovic, D., Raspor, P., 2007. Antioxidative Action of Royal Jelly in the Yeast Cell. *Experimental Gerontology*, 42, 594-600.
- Jobling, M., Knudsen, R., Pedersen, P.S., Dos Santos, J., 1991. Effects of dietary composition and energy content on the nutritional energetics of cod, *Gadus morhua*, *Aquaculture*, 92: 243-257.
- Jones, J. I., Clemmons, D. R., 1995. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions. *Endocrine reviews*, 16(1), 3-34.
- Kamakura, M., 2002. Signal transduction mechanism leading to enhanced proliferation of primary cultured adult rat hepatocytes treated with royal jelly 57-kDa protein. *J. Biochem.*, 132 (6), 911–920.
- Kamakura, M., Fukuda, T., Fukushima, M., Yonekura, M., 2001. Storage-dependent degradation of 57-kDa protein in royal jelly: a possible marker for freshness.
- Kanbur, M. G. Eraslan, L. Beyaz, S. Silici, B.C. Liman, Ş., 2009. The effects of royal jelly on liver damage induced by paracetamol in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61(2),123-132.

- Karadeniz, A., Simsek, N., Karakus, E., Yildirim, S., Kara, A., Can, I., Kisa, F., Emre, H., Turkeli, M., 2011. Royal Jelly Modulates Oxidative Stress and Apoptosis in Liver and Kidneys of Rats Treated with Cisplatin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*
- Karanth, S., Lall, S. P., Denovan-Wright, E. M., Wright, J. M., 2009. Differential transcriptional modulation of duplicated fatty acid-binding protein genes by dietary fatty acids in Zebrafish (*Danio rerio*): evidence for subfunctionalization or neofunctionalization of duplicated genes. *BMC Evolutionary Biology*, 9 (1), 219.
- Kataoka, M., Arai, N., Taniguchi, Y., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto, M., 2001. Analysis of anti-allergic function of royal jelly. *Natural Medicines*, 55(4), 174-180.
- Kelley, K. M., Oh, Y., Gargosky, S. E., Gucev, Z., Matsumoto, T., Hwa, V., Ng, L., Simpson, D. M. Rosenfeld, R. G., 1995. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 28, 619–637.
- Kennedy, S.R., Bickerdike, R., Berge, R.K., Dick, J.R., Tocher, D.R., 2007. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) or tetradecylthioacetic acid (TTA) on growth, lipid composition, fatty acid metabolism and lipid gene expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). *Aquaculture*, 272, 489–501.
- Keskin, E.Y., Erdem, M., 2005. Gökkuşacağı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Yetiştiriciliğinde Farklı Oranlarda Ekstrüde Yem Kullanımının Balıkların Gelişmesine Etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi, 1(1), 49-57.
- Kimura, Y., Washino, N., Yonekura, M., 1995. N-linked sugar chains of 350-kDa royal jelly glycoprotein. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(3), 507-509. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 65(2), 277-284.
- Klaudiny, J., Kulifajová, J., Crailsheim, K., Šimúth, J., 1994. New approach to the study of division of labour in the honeybee colony (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 25(6), 596-600.
- Kohguchi, M., Inoue, S. I., Ushio, S., Iwaki, K., Ikeda, M., and Kurimoto, M., 2004. Effect of royal jelly diet on the testicular function of hamsters. *Food science and technology research*, 10(4), 420-423.
- Kohli, G., Hu, S., Clelland, E., Di Muccio, T., Rothenstein, J., Peng, C., 2003. Cloning of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and its type II receptor from zebrafish ovary and role of TGF- $\beta$ 1 in oocyte maturation. *Endocrinology*, 144(5), 1931-1941.
- Kohno, K., Okamoto, I., Sano, O., Arai, N., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto, M., 2004. Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 68 (1), 138-145.
- Korkut, A.Y., Kop, A., Demirtaş, N., Cihaner, A., 2007. Balık Beslemede Gelişim Performansının İzlenme Yöntemleri. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 24: 1-2, 201-205.
- Kramer, K. J., Tager, H. S., Childs, C. N., Speirs, R. D., 1977. Insulin-like hypoglycemic and immunological activities in honeybee royal jelly. *Journal of Insect Physiology*, 23, 293–295.

- Kridli, R. T., AL Khetib, S. S., 2006. Reproductive responses in ewes treated with eCG or increasing doses of royal jelly. *Animal Reproduction Science*, 92 (1-2), 75-85.
- Kridli, R. T., Husein, M. Q., Humphrey, W. D., 2003. Effect of royal jelly and GnRH on the estrus synchronization and pregnancy rate in ewes using intravaginal sponges. *Small Ruminant Research*, 49 (1), 25-30.
- Krylov, V., Sokolskil, C., 2000. Royal jelly, Agroprompoligrafist Krasnodar, 214 pp, 25-30 Russian.
- Kubo, H. D., Hill, B. C., 1996. Respiration gated radiotherapy treatment: a technical study. *Physics in medicine and biology*, 41(1), 83.
- Kutluca, S., Genç, F., Dodoloğlu, A., 1998. Besleyici kolonilere verilen ana arı yüksüklerinin sayısı ile hasat aralığının kolonilerin arı sütü verimine etkileri. *Tr J Vet Anim Sci*, 22, 363-369.
- Langenau, D. M., Traver, D., Ferrando, A. A., Kutok, J. L., Aster, J. C., Kanki, J. P., Lin, S., Prochownik, E., Trede, N. S., Zon, L. I., Look, A. T., 2003. Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. *Science Journal*, 299-5608 ,887-890.
- Lankford, S.E., Weber, G.M., 2010. Temporal mRNA expression of transforming growth factor-beta superfamily members and inhibitors in the developing rainbow trout ovary. *General and Comparative Endocrinology*, 166, 250–258.
- Lannuzzi, J., 1990. "Royal Jelly: Mystery Food, *American Bee Journal* 8, 532–4, 587-9, 659-62.
- Lebold, K.M., Jump, D.B., Miller, G.W., Wright, C.L., Labut, E.M., Barton, C.L., Tanguay, R.L., and Traber M.G., 2011. Vitamin E Deficiency Decreases Long-Chain PUFA in Zebrafish (*Danio rerio*). *The Journal of Nutrition*, 2113- 2118.
- Lee, S.M., Jeon, I.G., Kim, K.S., 1997. Effects of extruded-floating, slow-sinking, fast-sinking or moist pellet diets on the growth and body composition in Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*), *J. Aquacult.*, 10: 163–169.
- Legendre, M., Kerdchuen, N., Corraze, G., Bergot, P., 1995, Larval rearing of an African Catfish *Heterobranchus longifilis* (Teleostei, Clariidae): effect of dietary lipids on growth, survival and fatty acid composition of fry, *Aquatic Living Resources*, 8: 355-363.
- Lensky, Y., Rakover, Y., 1983. Separate protein body compartments of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 75(4), 607-615.
- Lercker, G., Caboni, M. F., Vecchi, M. A., Sabatini, A. G., Nanetti, A., 1992. Characterization of the main constituents of royal jelly, *Apicoltura* (8), 27-37.
- Lercker, G., Capella, P., Conte, L. S., Ruini, F., Giordani, G., 1981. Components of royal jelly: I. Identification of the organic acids. *Lipids*, 16(12), 912-919.
- Li, M., Greenaway, J., Raine, J., Petrik, J., Hahnel, A., Leatherland, j., 2006. Growth hormone and insulin-like growth factor gene expression prior to the development of the pituitary gland in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos reared at two temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 143, 514–522.
- Lie, Ø., Sandvin, A., Waagbø, R., 1993. Influence of dietary fatty acids on the lipid composition of lipoproteins in farmed atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiology and Biochemistry* 12: 249–260.

- Linder, J., 1963. Activity of royal jelly against various Trypanosomidae. *Journal of Apicultural Research*, 2 (1), 71-72.
- Lindhors-Emme, W., 1990. *Forellenzucht*, Verlag Paul Parey, Hamburgund Berlin, 1575.
- Luo, Y., Ai, Q., Mai, K., Zhang, W., Xu, W., Zhang, Y., 2012. Effects of dietary rapeseed meal on growth performance, digestion and protein metabolism in relation to gene expression of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 368, 109-116.
- Mannoor, M. K., Shimabukuro, I., Tsukamoto, M., Watanabe, H., Yamaguchi, K., 2009. Honeybee royal jelly inhibits autoimmunity in SLE-prone NZB x NZW F1 mice. *Lupus*, (1), 44-52.
- Mannoor, M. K., Tsukamoto, M., Watanabe, H., Yamaguchi, K., Sato, Y., 2008. The efficacy of royal jelly in the restoration of stress-induced disturbance of lymphocytes and granulocytes. *Biomedical Research*, 19 (2), 69-77.
- Martins, D.A., Gomes, E., Rema, P., Dias, J., Ozorio, R.O.A., Valente, L.M.P., 2005. Growth, digestibility and nutrient utilization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles fed different dietary soybean oil levels, *Aquaculture*, 14: 285-295.
- Maruyama, H., Yoshida, C., Tokunaga, K., Araki, Y., Mishima, S., 2005. The effect of a peptide (Ile-Val-Tyr) derived from royal jelly treated with protease on blood pressure of spontaneously hypertensive rat. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 52 (10), 491-494.
- Massague´ J., 1998. TGF- $\beta$  signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753–791.
- Matsui, T., Yuki Yoshi, A., Doi, S., Sugimoto, H., Yamada, H., Matsumoto, K., 2002. Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(2), 80-86.
- McLean, S. E., 2012. *Transforming Growth Factor Beta Receptor Partitioning: Molecular Mechanisms and Functional Consequences*. The School of Graduate and Postdoctoral Studies The University of Western Ontario London, Ontario, Canada.
- Mehrad, B., Jafaryan, H., Taati, M. M., 2012. Assessment of the effects of dietary vitamin E on growth performance and reproduction of Zebrafish, (*Danio rerio*). *Journal of Oceanography and Marine Science*, 3(1), 1-7.
- Melliou, E., Chinou, I., 2005. Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8987–8992.
- Miller, G. W., Labut, E. M., Lebold, K. M., Floeter, A., Tanguay, R. L., Traber, M. G., 2012. Zebrafish (*Danio rerio*) fed vitamin E-deficient diets produce embryos with increased morphologic abnormalities and mortality. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(5), 478-486.
- Mishima, S., Suzuki, K. M., Isohama, Y., Kuratsu, N., Araki, Y., Inoue, M., Miyata, T., 2005. Royal jelly has estrogenic effects in vitro and in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1-3), 215-220.
- Moradi, A. R., Malekinejad, H., Farrokhi-Ardabili, F., Bernousi, I., 2013. Royal Jelly improves the sperm parameters of ram semen during liquid storage and serves as an antioxidant source. *Small Ruminant Research*, 113(2), 346-352.

- Mulheron GW, Schomberg DW., 1993. The intraovarian transforming growth factor system. In: Adashi EY, Leung PCK, eds. The ovary. New York: Raven Press; 337–360.
- Münstedt, K., Bargello, M., Hauenschild, A., 2009. Royal Jelly Reduces the Serum Glucose Levels in Healthy Subjects. *J Med Food*, 12, 1170-1172.
- Nagai T., Inouec R., Suzukia N., Nagashima T., 2006. Antioxidant properties of enzymatic hydrolysates from royal jelly. *Journal of Medicinal Food* 9,363-367.
- Nagai, T., Inoue, R., 2004. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food chemistry*, 84(2), 181-186.
- Nagai, T., Sakai, M., Inoue, R., Inoue, H., Suzuki, N., 2001. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chemistry*, 75, 237–240.
- Nagaraj, N. S., and Datta, P. K., 2010. Targeting the transforming growth factor- $\beta$  signaling pathway in human cancer. *Expert opinion on investigational drugs*,19(1), 77-91.
- Noda, N., Kodai, T., Nakatani, T., 2011. The Absolute Configurations of Hydroxy Fatty Acids from the Royal Jelly of Honeybees (*Apis mellifera*).” *Lipids* 46,263–270.
- Oka, H., Emori, Y., Kobayashi, N., Hayashi, Y., Nomoto, K., 2001. Suppression of allergic reactions by royal jelly in association with the restoration of macrophage function and the improvement of Th1/Th2 cell responses. *International Immunopharmacology*, 1(3), 521–532.
- Okamoto, I. Y. Taniguchi, T., Kunikata, K., Kohno, K., Iwaki, M., Ikeda and Kurimoto., 2003. Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. *Life Sciences*, 73, 2029-2045.
- Orsolich, N., Sacases, F., Du Sert, P. P., Basic, I., 2007. Antimetastatic ability of honey bee products. *Periodicum Biologorum*, 109 (2),173-180.
- Pérez-Sánchez, J., Benedito-Palos, L., Estensoro, I., Petropoulos, Y., Calduch-Giner, J. A., Browdy, C. L., Sitjà-Bobadilla, A., 2015. Effects of dietary NEXT ENHANCE® 150 on growth performance and expression of immune and intestinal integrity related genes in gilthead sea bream (*Sparus aurata L.*). *Fish shellfish immunology*, 44(1), 117-128.
- Pfaffl, M.W.,2001.A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR.*Nucleic Acids Research*,29(9):2003-2007.
- Picha, M. E., Turano, M. J., Beckman, B. R., Borski, R. J., 2008. Endocrine biomarkers of growth and applications to aquaculture: a minireview of growth hormone, insulin-like growth factor (IGF)-I, and IGF-binding proteins as potential growth indicators in fish. *North American Journal of Aquaculture*,70(2), 196-211.
- Piedecausa, M.A., Mazon, M.J., Garcia, B., Hernandez, M.D., 2007. Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils in the diets of sharpnose seabream (*Diplodus puntazzo*). *Aquaculture*, 263: 211-219.
- Plisetskaya, E. M., 1998. Some of my not so favorite things about insulin and insulin-like growth factors in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 121(1), 3-11.

- Popinga, J., Kittilson, J., McCormick, S.D., Sheridan, M.A., 2007. Effects of somatostatin on the growth hormone-insulin-like growth factor axis and seawater adaptation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture*, 273, 312–319.
- Ragab, S. S., Ibrahim, M. K., 1999. Evaluation of some chemical, antibacterial and biological properties of fresh and refrigerated royal jelly. *Egyptian Journal of Microbiology*, 34 (1), 115-128.
- Ramos, A., Bandarra, N.M., Rema, P., Vaz-Pires, P., Nunes, M.L., Andrade, A.M., Cordeiro, A.R., Valente, L.M.P., 2008. Time course deposition of conjugated linoleic acid in market size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle *Aquaculture*, 274, 366–374.
- Reindl, K.M., Sheridan, M.A., 2012. Peripheral regulation of the growth hormone-insulin-like growth factor system in fish and other vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology*, 163, 231-245.
- Reinecke, M., 2010. Influences of the environment on the endocrine and paracrine fish growth hormone–insulin-like growth factor-I system. *Journal of Fish Biology*, 76, 1233-1254.
- Rembold, H., 1987. Caste specific modulation of juvenile hormone titers in *Apis mellifera*. *Insect biochemistry*, 17(7), 1003-1006.
- Richard, N., Kaushik, S., Larroquet, L., Panserat, S., Corraze, G., 2006b. Replacing dietary fish oil by vegetable oils has little effect on lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *British Journal of Nutrition*, 96: 299-309.
- Richard, N., Mourente, G., Kaushik, S., Corraze, G., 2006a. Replacement of a large portion of fish oil by vegetable oils does not affect lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in European seabass (*Dicentrarchus labrax L.*), *Aquaculture*, 261: 1077-1087.
- Roelfsema, V., Clark, R. G., 2001. The growth hormone and insulin-like growth factor axis: its manipulation for the benefit of growth disorders in renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 12(6), 1297-1306.
- Rollin, X., Peng, J., Pham, D., Ackman, R.G., Larondelle, Y., 2003. The effects of dietary lipid and strain difference on polyunsaturated fatty acid composition and conversion in anadromous and landlocked salmon (*Salmo salar L.*) parr. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 134, 349–366.
- Rosenlund, G., A. Obach, M. G. Sandberg, H. Standal and K. Tveit., 2001. Effect of alternate lipid sources on long-term growth performance and quality of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Aquacult. Res.*, 32, 323-328.
- Sahinler, N., Kaftanoglu, O., 2005. The effects of season and honeybee (*Apis mellifera L.*) genotype on acceptance rates and royal jelly production. *Tr J Vet Anim Sci*, 29, 499-503.
- Shamblott, M. J., Cheng, C. M., Bolt, D. Chen, T. T., 1995. Appearance of insulin-like growth factor mRNA in the liver and pyloric ceca of a teleost in response to exogenous growth hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 6943–6946.
- Sheridan, M.A., Hagemeister, A.L., 2009. Somatostatin and somatostatin receptors in fish growth. *General and Comparative Endocrinology*, 167, 360–365.

- Shorter, J. R., Geisz, M., Özsoy, E., Magwire, M. M., Carbone, M. A., and Mackay, T. F., 2015. The Effects of Royal Jelly on Fitness Traits and Gene Expression in *Drosophila melanogaster*. *PloS one*, 10 (7), e0134612.
- Siccardi III, A. J., Garris, H. W., Jones, W. T., Moseley, D. B., D'Abramo, L. R., Watts, S. A. 2009. Growth and survival of Zebrafish (*Danio rerio*) fed different commercial and laboratory diets. *Zebrafish*, 6(3), 275-280.
- Siharath, K., Nishioka, R. S., Bern, H. A., 1995. In vitro production of IGF-binding proteins (IGFBP) by various organs of the striped bass, *Morone saxatilis*. *Aquaculture*, 135(1), 195-202.
- Silici, S., Ekmekcioglu, O., Eraslan, G. and Demirtas, A., 2009. Antioxidative Effect of Royal Jelly in Cisplatin-induced Testes Damage. *Urology* 74 (3), 545-551.
- Silici, S., Ekmekcioglu, O., Kanbur, M. and Deniz, K., 2011. The protective effect of royal jelly against cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. *World journal of urology*, 29(1), 127-132.
- Simsek, N., Karadeniz, A., Bayraktaroglu, A. G., 2009. Effects of L-carnitine, Royal jelly and Pomegranate Seed on Peripheral Blood Cells in Rats. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 15 (1),63-69.
- Sirkecioglu, A.N., 2011. Farklı yağ kaynakları ve su sıcaklığının Zebra balığı (*Oncorhynchus mykiss*) yavrularının büyüme performansı, lipit metabolizması ve bazı genlerin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Sissener N.H., Johannessen L.E., Hevrøy, E.M., Wiik-Nielsen C.R., Berdal, K.G., Nordgreen, A. and Hemre G., 2010. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for investigating the safety of GM feed ingredients (soya and maize); performance, stress response and uptake of dietary DNA sequences. *British Journal of Nutrition*,103, 3–15.
- Spence, R., Fatema, M.K., Reichard, M., Huq, K.A., Wahab, M.A., Ahmed, F., Smith, C., 2006a. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*, 69(5), p1435-1448.
- Steffens, W., 1997. Effects of Variation in Essential Fatty Acids in Fish Feeds on Nutritive Value of Freshwater Fish for Humans, *Aquaculture*, 151: 97-119.
- Stocker, A., 2003. Isolation and characterisation of substances from Royal Jelly. PhD Thesis; Université d'Orléans ,Orléans (France), pp 1-202.
- Sugiura, S.H., Dong, F.M., Rathbone, C.K., Hardy, R.W., 1998. Apparent protein digestibility and mineral availabilities in various feed ingredients for salmonid feeds. *Aquaculture*, 159: 177-202.
- Suzuki, K. M., Isohama, Y., Maruyama, H., Yamada, Y., Narita, Y., Ohta, S., Araki, Y., Miyata, T., Mishima, S., 2008. Estrogenic activities of fatty acids and a sterol isolated from royal jelly. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 5 (3), 295-302.
- Takahashi, M., Matsuo, I., Ohkido, M., 1983. Contact dermatitis due to honeybee royal jelly. *Contact Dermatitis*, 9(6), 452-455.
- Thiessen, D.L., 2004. Optimization of feed peas, canola and flaxseed for aqua feeds: the Canadian prairie perspective. In:Cruz Suarez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto Lopez, M.G., Villarreal, D., Scholtz, U.Y., Gonzalez, M., *Avances en Nutricion Acuicola VII. Memorias del VII. Simposium Internacional de Nutricion Acuicola*. 16-19 Noviembre, Hermosillo, Sonora, Mexico.

- Thompson KD, Tatner MF, Henderson RJ., 1996. Effects of dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acid ratio on the immune response of Atlantic salmon, (*Salmo salar* L.) Aquaculture Nutrition 2: 21–31.
- Tocher, D.R., Bell, J.G, Dick, J.R., Sargent, J.R., 1997. Fatty acyl desaturation in isolated hepatocytes from Atlantic salmon (*Salmo salar*): stimulation by dietary borage oil containing gamma-linolenic acid. Lipids 32: 1237–1247.
- Tokunaga, K., Suzuki, K. M., Yoshida, C., Maruyama, H., Futamura, Y., Araki, Y., Mishima, S., 2004. Antihypertensive mechanism of royal jelly treated with protease in spontaneously hypertensive rats. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 51 (1),34-37.
- Tokunaga, K., Suzuki, K., Yoshida, C., Maruyama, H., Futamura, Y., Araki, Y., Mishima, S., 2003. Effect of royal jelly treated with protease on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 50 (10), 457-462.
- Torstensen, B. E., Ø. Li and L. Frøyland. 2000. Lipid metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Effects of capelin-, palm- and oleic acid enriched sunflower oil as dietary lipid sources. Lipids. 35, 653-664.
- Tsafirri A, Vale W, Hsueh AJW., 1989. Effects of transforming growth factors and inhibin-related proteins on rat preovulatory graafian follicles in vitro. Endocrinology 52:43–50
- Vargesson, N.A., 2007. Zebrafish in Manual of Animal Technology (ed. S. Barnett) Blackwell Publishing Ltd: Oxford, UK.
- Vong, Q. P., Chan, K. M. Cheng, C. H., 2003. Quantification of common carp (*Cyprinus carpio*) IGF-I and IGF-II mRNA by real-time PCR: differential regulation of expression by GH. Journal of Endocrinology 178, 513–521.
- Vucevic, D., Melliou, E., Vasilijic, S., Gasic, S., Ivanovski, P., Chinou, I., Colic, M., 2007. Fatty acids isolated from royal jelly modulate dendritic cell-mediated immune response in vitro. International immune pharmacology, 7 (9), 1211-1220.
- Waagbø, R., Sandnes, K., Joergensen, J., Engstad, R., Glette, J., Lie, Ø., 1993a. Health aspects of dietary lipid sources and vitamin E in Atlantic salmon (*Salmo salar*). 2. Spleen and erythrocyte phospholipid fatty acid composition, nonspecific immunity and disease resistance. Fiskeridirektoratets Skrifter. Serie Ernaering 6: 63–80.
- Waagbø, R., Sandnes, K., Lie, Ø., Nilsen, E.R., 1993b. Health aspects of dietary lipid sources and vitamin E in Atlantic salmon (*Salmo salar*). 1. Erythrocyte total lipid fatty acid composition, haematology and humoral immune response. Fiskeridirektoratets Skrifter. Serie Ernaering 6: 47–62.
- Wagner, H., Dobler, I., Thiem, I., 1970. Effect of food-juice of the queen bee (royal jelly) on the peripheral blood and the survival rate of mice after whole body x-irradiation. Radiobiol. Radiother.(Berl), 11 (3),323-328.



- Xu, J., Luo, X., and Chegini, N., 2003. Differential expression, regulation, and induction of Smads, transforming growth factor- $\beta$  signal transduction pathway in leiomyoma, and myometrial smooth muscle cells and alteration by gonadotropin-releasing hormone analog. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 88(3), 1350-1361.
- Yavuzcan, H., Pulatsü, S., Demir, N., Kırkağaç, M., Bekcan, S., Topçu, A., Başçınar, N., 2010. Türkiye’de Sürdürülebilir Su Ürünleri Yetiştiriciliği. TMMOB Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, Bildiriler Kitabı 2, 767-789.
- Yossa, R., Sarker, P. K., Karanth, S., Ekker, M., Vandenberg, G. W., 2011. Effects of dietary biotin and avidin on growth, survival, feed conversion, biotin status and gene expression of Zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 160(4), 150-158.
- Zheng, H.Q., Hu F.L., Dietemann, V., 2011. Changes in composition of royal jelly harvested at different times:consequences for quality standards. *Apidologie*, 42, 39-47.
- Matsui, T., Li, L., Wu, J. C., Cook, S. A., Nagoshi, T., Picard, M. H., Rosenzweig, A., 2002. Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *Journal of Biological Chemistry*, 277(25), 22896-22901.

## ÖZGEÇMİŞ

01.08.1990 yılında Sivas'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Sivas'da tamamladı. 2009-2013 tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nü bitirip aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Hayvansal Biyoteknoloji Bilim dalında yüksek lisans eğitimine başlamıştır. 15.11.2014-15.11.2015 tarihleri arasında TÜBİTAK tarafından desteklenen 114O755 nolu COST projesinde bursiyer olarak görev almıştır.