

**UZUN SÜRELİ AÇLIĞIN ZEBRA BALIĞI
(*Danio rerio*) YAĞ ASİDİ METABOLİZMASINA
MOLEKÜLER ETKİLERİ**

Ayşe ÖLMEZ

**Doktora Tezi
Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı
Doç. Dr. Abdulkadir BAYIR**

2015

Her Hakkı Saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

UZUN SÜRELİ AÇLIĞIN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*)
YAĞ ASİDİ METABOLİZMASINA MOLEKÜLER ETKİLERİ

Ayşe ÖLMEZ

SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ERZURUM
2015

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

UZUN SÜRELİ AÇLIĞIN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) YAĞ ASİDİ METABOLİZMASINA
MOLEKÜLER ETKİLERİ

Doç. Dr. Abdulkadir Bayır'ın danışmanlığında, Ayşe Ölmez tarafından hazırlanan bu çalışma, 09/11/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Anabilim Dalı Su Ürünleri Bilim Dalı'nda doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Telat Yanık

Üye : Prof. Dr. Mevlüt Aras

Üye : Prof. Dr. Şenol Akın

Üye : Doç. Dr. Abdulkadir Bayır

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mehtap Bayır

İmza :

İmza :

İmza :

İmza :

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 03/12/2015 tarih ve ...48/...1632 nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: BAP/2013-355

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

ÖZET

DOKTORA TEZİ

UZUN SÜRELİ AÇLIĞIN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) YAĞ ASİDİ METABOLİZMASINA MOLEKÜLER ETKİLERİ

Ayşe ÖLMEZ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Abdulkadir BAYIR

Bu çalışmada; zebra balığı (*Danio rerio*)’nda 70 gün süren açlığın ve 15 gün süren yeniden beslemenin yağ asit metabolizmasında görev alan bazı genlerin ekspresyonlarına ve tüm vücut asidi kompozisyonuna etkileri araştırılmıştır.

Çalışmanın sonucunda açlık uygulanan grupta doymuş yağ asitleri (SFA) miktarı diğer gruplara göre daha yüksek çıkmıştır. Palmitik asit (16:0) tüm gruplarda baskın SFA olarak bulunmuş ve en düşük miktarı açlık uygulanan grupta belirlenmiştir. Yetmiş gün sonunda açlık uygulanan grupta linolenik asit (18:3 *n*-3), eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA) değerleri yüksek bulunurken yeniden besleme sonunda bu değerlerin kontrol grubu değerlerine döndüğü belirlenmiştir. Tekli doymamış yağ asidi (MUFA) ve *n*-6 çoklu doymamış yağ asit değerleri ise açlık uygulanan grupta düşük miktarda belirlenmiştir ($P<0,05$). Yağ asidi metabolizmasında önemli roller üstlenen sekiz genden yedisinin (*elovl5*, *fads2*, *cpt1-β*, *acox1*, *acadvl*, *fabp7a*, *fabp1a*) ekspresyonları açlık periyodu sonunda önemli derecede düşüş gösterirken *ppar-α* için tersi bir durum belirlenmiştir. Açlık periyodundan sonra 15 gün beslenen balıklarda *elovl5* ve *ppar-α* ekspresyon değerleri kontrol grubu değerlerine dönmüştür.

Sonuç olarak; uzun süre aç kalan zebra balığının yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmek için ihtiyaç duyduğu enerjiyi sırasıyla MUFA, SFA, EPA, DHA ve 18:3 *n*-3’den sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca karaciğerdeki gen ekspresyonları ile yağ asidi kompozisyonu arasında direkt bir ilişkinin olmadığı ve 15 günlük yeniden besleme periyodunun zebra balığında uzun süreli açlıktan kaynaklanan metabolik kayıpları karşılamak için yetersiz olduğu belirlenmiştir.

2015, 63 sayfa

Anahtar Kelimeler: zebra balığı, açlık, qPCR, lipid metabolizması, gen ekspresyonu

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

MOLECULAR EFFECTS OF LONG-TERM STARVATION ON FATTY ACID METABOLISM IN ZEBRAFISH, *Danio rerio*

Ayşe ÖLMEZ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Aquaculture

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Abdulkadir BAYIR

In this research, the effects of a 70-day of starvation and a 15-day of refeeding period on fatty acid metabolism-related gene expressions and fatty acid composition of whole body in zebrafish (*Danio rerio*) was examined.

At the end of the study, the highest amount of saturated fatty acid (SFA) was found in starved fish compared to other groups. Palmitic acid (16:0) was determined as dominant SFA in all groups and its lowest amount was stated in starved groups. After 70 days-starvation, linolenic acid (18:3 *n*-3), eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) values are observed high at the starved group, and it was stated that these values became normal (control) after refeeding period. Monounsaturated fatty acid (MUFA) and *n*-6 PUFA values were observed in low at starved group ($P < 0.05$). While expressions of seven genes (*elovl5*, *fads2*, *cpt1-β*, *acox1*, *acadvl*, *fabp7a*, *fabp1a*) of eight genes having important roles in fatty acid metabolism decreased significantly at the end of starvation period, an opposite situation was observed for *ppar-α*. Expression of *elovl5* and *ppar-α* in refeeding fish for 15 days after starvation period was returned to their expressions in control group.

As a result, zebrafish, which is starved for a long time, provides its vital energy requirement from MUFA, SFA, EPA, DHA and 18:3 *n*-3, respectively. It was also determined that there is no direct relation between gene expressions in liver and fatty acid composition and period of 15 days refeeding which comes after starvation period remains incapable of compensating the loss occurred because of the starvation.

2015, 63 pages

Keywords: zebrafish, starvation, qPCR, gene expression, lipid metabolism

TEŞEKKÜR

Bu tezin konu seçiminden tamamlanmasına kadar her aşamasında bilgi ve görüşleri ile teze ve doktora öğrenimime yön veren hocam Sayın Doç. Dr. Abdulkadir BAYIR'a minnetlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmada desteklerini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehtap BAYIR'a şükranlarımı sunarım. Bir süre doktora danışmanlığımı yapan hocam Sayın Prof. Dr. M. Sıtkı ARAS'a ilmi ve manevi desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans danışmanım olan ve doktora çalışmamda da yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Şenol AKIN'a teşekkürlerimi sunarım. Doktora tezime engin bilgi ve birikimleriyle destek veren çok değerli hocalarım Prof. Dr. Mevlüt ARAS ve Prof. Dr. Telat YANIK'a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamda emeği geçen Almus Meslek Yüksek Okulu Su Ürünleri Laboratuvarından sorumlu Sayın Selim AVŞAR'a ve Erzurum'da desteklerini esirgemeyen arkadaşım Uğur GENÇ'e ayrıca teşekkür ederim. Bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan değerli aileme ve bu zorlu süreçte hep yanımda olup desteklerini esirgemeyen sevgili eşime, kızıma şükranlarımı sunarım.

Ayşe Ölmez

Kasım 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Yağ Asitlerinin Oksidasyonu.....	5
1.2. Zebra Balığı (<i>Danio rerio</i>).....	9
1.3. Zebra Balığı ile Çalışmanın Avantajları.....	10
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	12
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	15
3.1. Balık Ağırlıkları ve Yaşam Oranı Hesaplama.....	16
3.2. Örneklerden Yağın Ekstrakte Edilmesi ve Miktarının Belirlenmesi.....	17
3.3. Balıkların Karaciğerlerinin Çıkarılması.....	18
3.4. Toplam RNA İzolasyonu.....	18
3.5. RNA'nın Kantitatif Tayini.....	19
3.6. Primerlerin Tasarlanması.....	19
3.7. Primer Optimizasyonu ve Primerlerin Çözündürülmesi.....	20
3.8. Reverse transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	20
3.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	21
3.10. Agaroz Jelin Hazırlanması.....	21
3.11. PCR Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklenmesi ve Görüntülenmesi.....	22
3.12. Kantitatif PCR (qPCR).....	22
3.13. Tris-HCl, Borik asit, EDTA (TBE) Tamponunun Hazırlanması.....	23
3.14. Sonuçların Hesaplanması ve İstatistik Analizler.....	23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	24
4.1. Balık Ağırlıkları ve Yaşam Oranı Sonuçları.....	24
4.2. Yağ Asidi Kompozisyonuna İlişkin Sonuçlar.....	25
4.2.1. Doymuş yağ asitleri.....	25
4.2.2. Toplam tekli doymamış yağ asitleri.....	26

4.2.3. <i>n</i> -3 çoklu doymamış yağ asitleri	27
4.2.4. <i>n</i> -6 çoklu doymamış yağ asitleri	30
4.2.5. <i>n</i> -3/ <i>n</i> -6 PUFA ve EPA+DHA sonuçları	31
4.3. Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları	32
4.3.1. Çok uzun zincirli yağ asit elongasyon 5 gen sonuçları	32
4.3.2. Yağ asit desaturasyon 2 gen sonuçları	33
4.3.3. Çok uzun zincirli Açıl-Koenzim A Dehidrogenaz gen sonuçları.....	34
4.3.4. Karnitin Palmitoltransferaz 1 β gen sonuçları	35
4.3.5. Peroksizomal Açıl-Koenzim Oksidaz 1 gen sonuçları.....	36
4.3.6. Peroksizom proliferatör-aktivite reseptör α gen sonuçlarıI	37
4.3.7. Beyin tipi yağ asidi bağlayıcı protein gen sonuçları	38
4.3.8. Karaciğer tipi yağ asidi bağlayıcı protein gen sonuçları	39
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	42
5.2. Yağ Asidi Profillerine İlişkin Tartışma	43
5.1.1. Doymuş yağ asitlerinin profillerine ilişkin tartışma.....	44
5.1.2. Tekli doymamış yağ asitleri profillerine ilişkin tartışma	44
5.1.3. <i>n</i> -3 çoklu doymamış yağ asidi profillerine ilişkin tartışma.....	45
5.1.4. <i>n</i> -6 çoklu doymamış yağ asidi profillerine ilişkin tartışma.....	46
5.1.5. <i>n</i> -3/ <i>n</i> -6 PUFA ve EPA+DHA profillerine ilişkin tartışma.....	47
5.2. Gerçek Zamanlı PCR Sonuçlarına İlişkin Tartışma	48
5.3. Genel Sonuçlar ve Öneriler	52
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	64

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AA	Araşidonik Asit
ATP	Adenozintrifosfat
<i>acadv1</i>	Çok Uzun Zincirli Açıl-Koenzim Dehidrogenaz Geni
<i>acox1</i>	Peroksizomal Açıl-Koenzim Oksidaz 1 Geni
<i>cpt1-β</i>	Karnitin Palmitoltransferaz 1-Beta Geni
DHA	Dokosaheksaenoik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EPA	Eikosapentaenoik Asit
EDTA	Diamintetra Asetik Asit
<i>elov15</i>	Çok Uzun Zincirli Yağ Asit Elongasyon 5 Geni
<i>fads2</i>	Yağ Asit Desaturasyon 2 Geni
<i>fabp7a</i>	Beyin Tipi Yağ Asidi Bağlayıcı Protein Geni
FABP7A	Beyin Tipi Yağ Asidi Bağlayıcı Protein
<i>fabp1a</i>	Karaciğer Tipi Yağ Asidi Bağlayıcı Protein Geni
FAD	Yağ Asidi Sentetaz-II
GC	Gaz Kromatografisi
HUFA	Yüksek Doymamış Yağ Asidi
MUFA	Tekli Doymamış Yağ Asidi
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asidi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyon
<i>ppar-α</i>	Peroksizom Proliferatör-Aktivite Reseptör α Geni
RT-PCR	Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyon
RNA	Ribonükleik Asit
<i>rpl7</i>	Ribozomal Protein 7 Geni
<i>rpl13a</i>	Ribozomal Protein 13 α Geni
SFA	Doymuş Yağ Asidi
TCA	Trikarboksilik Asit
TBE	Tris-HCL Borikasit EDTA

YO Yaşama Oranı
qPCR Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Linolenik asit'ten çoklu doymamış yağ asitlerinin sentez basamakları	5
Şekil 1.2. Yağ asitlerinin oksidasyon basamakları	7
Şekil 1.3. Zebra balıklarının genel morfolojisi	9
Şekil 3.1. Denemenin yürütüldüğü akvaryumlar	15
Şekil 4.1. Grupların balık başı ortalama ağırlıkları (gr).....	24
Şekil 4.2. Deneme gruplarının toplam <i>n</i> -3 PUFA değerleri (%)	27
Şekil 4.3. Deneme gruplarının 18:3 <i>n</i> -3 değerleri (%).....	28
Şekil 4.4. Deneme gruplarının EPA değerleri (%)	29
Şekil 4.5. Deneme gruplarının DHA değerleri (%)	29
Şekil 4.6. Deneme gruplarının <i>n</i> -3/ <i>n</i> -6 PUFA değerleri (%).....	31
Şekil 4.7. Deneme gruplarının EPA+DHA (%).....	32
Şekil 4.8. <i>elovl5</i> geninin deneme grubu balıklarının karaciğerindeki ekspresyon miktarı	33
Şekil 4.9. <i>fads2</i> geninin deneme grubu balıklarının karaciğerindeki ekspresyon miktarı	34
Şekil 4.10. <i>acadvl</i> geninin deneme grubu balıklarının karaciğerindeki ekspresyon miktarı	35
Şekil 4.11. <i>cpt1-β</i> geninin deneme grubu balıklarının karaciğerindeki ekspresyon miktarı	36
Şekil 4.12. <i>acox1</i> geninin deneme grubu balıklarının karaciğerindeki ekspresyon miktarı	37
Şekil 4.13. <i>ppar-α</i> geninin deneme grubu balıklarının karaciğerindeki ekspresyon miktarı	38
Şekil 4.14. <i>fabp7a</i> geninin deneme grubu balıklarının karaciğerindeki ekspresyon miktarı	39
Şekil 4.15. <i>fabp1a</i> geninin deneme grubu balıklarının karaciğerindeki ekspresyon miktarı	40
Şekil 4.16. Araştırmada kullanılan <i>acox1</i> gen örneğinin gerçek zamanlı PCR ile elde edilen amplifikasyon görüntüsü.....	40

Şekil 4.17. Araştırmada kullanılan *acox1* gen örneğinin gerçek zamanlı PCR ile elde edilen melting sıcaklığının görüntüsü.....41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Deneme yeminin yağ asidi kompozisyonu (%).....	16
Çizelge 3.2. Kullanılan primerlerin nükleotit dizilimi ve optimum bağlanma sıcaklıkları (Tm)	20
Çizelge 4.1. Grupların yaşam oranları (YO).....	25
Çizelge 4.2. Deneme gruplarının SFA kompozisyonu (Toplam yağ asitlerinin %'si) ...	26
Çizelge 4.3. Deneme gruplarının MUFA kompozisyonu (Toplam yağ asitlerinin %'si).....	27
Çizelge 4.4. Deneme gruplarının <i>n</i> -6 PUFA kompozisyonu (Toplam yağ asitlerinin %'si).....	30

1. GİRİŞ

Her canlının yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmesi ve kaliteli yaşam koşulları için dengeli beslenmesi gerekmektedir. Balık beslemedeki amaç; yem ve toplam tüketim giderlerinin azaltılmasının yanı sıra çevreye daha az zarar verecek üretim ve besleme protokollerinin belirlenmesidir. Beslemenin canlıların biyolojik yapıları üzerine olduğu kadar yetiştiricilik sektöründeki maliyetler üzerine de etkisi vardır. Bu nedenle hem yetiştiricilik sistemlerine ekonomik anlamda katkı sağlayabilmesi hem de ürünün besin kalitesini bozmadan besleme faaliyetlerinin gerçekleştirilebilmesi için yapılan bu araştırmalar önem arz etmektedir. Balık besleme konusunda yapılan çalışmalar, balığın biyolojisi ile yem alımı ve büyümesi üzerine etki edebilecek en uygun yem ve besleme modellerini bulmaya yönelik olmuştur. Canlı, yaşam ortamındaki çevresel faktörlerin değişmesi, besin kaynaklarındaki kıtlık veya ani sıcaklık değişimleri gibi mevsimsel sebeplerden dolayı açlıkla mücadele etmek zorunda kalabilmektedir. Bundan dolayı balık besleme çalışmaları kadar bir balığın açlığı esnasında meydana gelen morfolojik, fizyolojik, moleküler, biyokimyasal ve davranışsal değişimlerin araştırılması ve diyetin en iyi şekilde uygulanmasında açlıkla ilgili çalışmaların önemli ipuçları verebileceği düşünülmektedir (Sanchez-Paz *et al.* 2006).

Açlık; bir hayvanın besininin kısıtlı olduğu durumda metabolik veya hormonal faaliyetlerin yardımıyla beslenmeden hayatını devam ettirebilmesi olarak ifade edilmektedir (Doucett *et al.* 1999; Tripathi and Verma 2003). Açlık dokularda ciddi miktarlarda karbonhidrat, lipid ve protein kayıplarına sebep olduğu bilinmekle beraber türlerin enerji ve metabolik faaliyetlerini etkilemektedir (Guderley *et al.* 2003). Türler arasında, enerji gereksinimlerinde farklılıklar görülebilir. Bu farklılıkların, beslenme çeşitliliği, besinlerin biyokimyası, canlının fizyolojisi ve yaşam ortamlarıyla ilgili ilişkili olduğu düşünülmektedir (McCue 2010). Açlık metabolik aktiviteyi etkilediği için canlı enerji ihtiyacını iç enerji depolarından karşılar; bu durumun da genelde ağırlık kaybı ile sonuçlandığı belirlenmiştir (Comoglio *et al.* 2008). Çeşitli sebeplerden ötürü belirli bir süre açlığa maruz kalan canlının beslenmeye başlamasıyla yem alımında ve ağırlığında çok hızlı bir şekilde artış gösterdiği tespit edilmiştir (Wilson and Osbourn 1960; Dobson

and Holmes 1984; Russell and Wootton 1992; Kim and Lovell 1995; Hayward *et al.* 1997; Jobling and Johansen 1999). Bu tip büyüme tepkisi “telafi büyüme” olarak adlandırılır. Belirli bir süre yeterli yemin sağlanmaması halinde aç kalan balıkların çoğu kez bu eksikliği telafi edebildikleri görülmüştür. Bu balıklarda yem tüketimi daha iyi, yem değerlendirme oranı ise daha kötüdür (Ali *et al.* 2003). Balıklar doğal ortamlarında çevre faktörleri, sıcaklık, yumurtlama göçleri ve üreme gibi çeşitli sebeplerden dolayı beslenme alışkanlıklarını açlık periyotlarına göre değiştirmektedirler. Kültürü yapılan balıklar ise bazı çevresel etkenler ve rutin üretim yöntemleri sebebiyle benzer şartlara maruz kalmaktadırlar. Doğal veya kültür koşullarında besinin kısıtlı olması durumunda balıklar; enerji üretimi için lipidler, karbohidratlar ve amino asitleri harekete geçirmektedirler. Karaciğer glikojeni genelde açlık sırasında harekete geçirilen ilk substrattır (Navarro and Gutierrez 1995). Bununla birlikte doku glikojen düzeyleri ve plazma glukoz konsantrasyonları genellikle açlık sırasında koruma altına alınır (Mommsen *et al.* 1980; Love and Siyah 1990; Gerrits 1994; Blasco *et al.* 1992; Navarro and Gutierrez 1995) ve bu durumda glukoneogenez oranı karaciğer ve böbrekte artar. Glukoneogenez periferal dokulardan hareketle esas amino asitlerden meydana gelir (Machado *et al.* 1988; Blasco *et al.* 1992). Balıklar enerji üretimi için açlığın ilk safhalarında protein depolarını kullanmak yerine daha çok lipid rezervlerini kullanılmayı tercih ederler (Black and Love 1986; Love and Black 1990; Navarro and Gutierrez 1995). Lipidler karbohidrat sentezlenmesi için kullanılamaz fakat yağların oksidasyonu ile diğer fonksiyonlar için gerekli enerjiyi sağlayabilirler. Lipid depolarının tükenmesiyle serbest amino asitler, vücut dokularında enerji kaynağı olarak önemli hale gelir (Navarro and Gutierrez 1995).

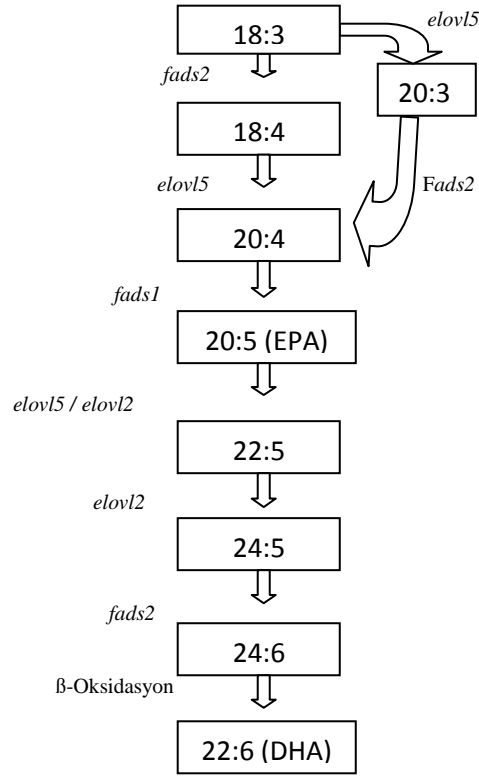
Açlık özellikle karaciğer, kas ve viseral yağ depolarının yağ asidi kompozisyonlarını etkilemektedir. Açlık boyunca yağ asidi, kullanımının doğasına bağlı olarak türler arasında değişmektedir. Balık yağlarının kompozisyonunu oluşturan üç temel yağ asidi tipi vardır: Bunlar doymuş (SFA), tekli doymamış (MUFA) ve çoklu doymamış yağ (PUFA) asitleridir (Halver 1989). Başlıca doymuş yağ asitleri miristik (14:0), palmitik (16:0) ve stearik (18:0) asitlerdir. Balıklar tekli doymamış yağ asitlerini besinlerden biyosentez yoluyla sağlar ve C 18:1’den C 22:1’e kadar tekli doymamış yağ asitlerini

uzatma yeteneğine sahiptirler. Çoklu doymamış yağ asitleri ikiye ayrılır: Bunlar omega-3 (ω -3 veya n -3) ve omega-6 (ω -6 veya n -6) yağ asitleridir. Çoklu doymamış yağ asitleri içerisinde yaygın olarak bilinen en yüksek doymamışlık derecesi C 22:6 (dokosaheksaenoik asit)'dir. ω -3 ve ω -6 yağ asitleri karboksil (-COOH) grubunun tersine metil (-CH₃) grubundan sayıldığı zaman 3. ve 6. karbon atomunda çift bağ içeren yağ asitleridir. Balık yağları %70-80 oranında doymamış yağ asitlerini, %20-30 oranında doymuş yağ asitlerini içerir. Balık yağlarındaki PUFA'nın miktarı %25-30 olup bunun önemli bir kısmını ω -3 yağ asitleri teşkil etmektedir (Ackman 1988; Weatherley and Gill 1989; Skorski 1990). Deniz ve tatlı su canlılarında n -3/ n -6 oranı değişiklik göstermektedir. Bu oran tatlı sularda %1-5 arasında iken denizlerde %5-15'e kadar çıktığı görülmüştür (Aras vd 2002). Steffens (1997) ve Okumuş (2000) n -3 PUFA bakımından özellikle eikosapentaenoik asidin (EPA; 20:5 n -3) ve dokosaheksaenoik asidin (DHA; 22:6 n -3) deniz ürünlerinde bol miktarda bulunduğunu söylemişlerdir. Rasoarahona *et al.* (2005) 3 Tilipya türünün (*Oreochromis niloticus*, *Oreochromis macrochir*, *Tilapia rendalli*) yağ asit kompozisyonları analizinde yüksek oranda palmitik (16:0), stearik (18:0), oleik (18:1 n -9), linoleik (18:2 n -6) ve palmitoleik asiti (16:1 n -7) belirlemişlerdir. Yılmaz (1995) Siraz balığı (*Capoeta capoeta umbla*) erkek ve dişilerinin mevsimsel olarak yağ asidi kompozisyonlarının değiştiğini ve doymamış yağ asitlerinden n -3'ün n -6'dan fazla olduğunu tespit etmiştir. Yağlar ve yağ asidi profilleri; türlere, cinsiyete, fiziksel ve kimyasal özelliklerine, coğrafik yapıya, mevsimlere, besin farklılığına, suyun biyolojik yapısına, balıkların demersal veya pelajik olmalarına ve göçler gibi birçok faktöre bağlı olarak değişebilmektedir (Ackman 1967; Christiansen *et al.* 1989; Yılmaz 1995).

Balıklar yağlarını karaciğer ve kas dokularında depo ederler. Depo edilen lipitlerin bu organlardan gonadlar gibi vücudun diğer ihtiyaç olan yerlerine taşındığı bildirilmiştir (Uysal ve Aksoylar 2003). Balıklar lipitleri kolaylıkla sindirdiği ve enerji kaynağı olarak kullandığı için lipitleri karbonhidratlara göre daha çok tercih ettikleri bilinmektedir. Balıklarda baskın olarak bulunan ω -3 yağ asitlerinin ana kaynağı sudaki besin zincirinin ilk halkasını oluşturan planktonik organizmalardır (Canpolat vd 1999). ω -3'ler özellikle EPA ve DHA besin zinciri vasıtasıyla önce küçük zooplanktonlara,

oradan da balıklara geçerler. Deniz ürünlerindeki yağlar hayvan ve bitki yağlarına göre daha kompleks yapıdadırlar. Karbon zincir uzunluğu C:14 ve C:24 arasındadır hatta C:12 ile C:26 bile bulunabilmektedir. C:14 ile C:16 tekli doymamış bağ içerirken C:20 ile C:22 yağ asitleri 4, 5 hatta 6 çift bağ içerirler (Keskin 1981).

Yağ asitlerinin sentezi karaciğer ve yağ dokusu hücrelerinde gerçekleşir. Yağ asitlerinin sentezinin birincisi "De Nova" sentez denilen yağ asitlerinin hücrenin sitozol kısmında yeniden yapılmasıdır ve oldukça karmaşık reaksiyonlar zincirinden oluşur. İkincisi ise hücre içinde mevcut olan yağ asitlerinin, mikrozomlarda ve mitokondri 2C atomlu birimlerin ilavesiyle daha uzun zincirli yağ asitlerine dönüştürülmesidir. Ve genellikle de asetik asetin aktif şekli olan asetil-KoA'lerden başlar. Bunun için asetil-KoA verebilen tüm maddelere; örneğin karbonhidratlar, aminoasitler ve yağ asitlerine yağ asidi sentezinin alternatif kaynağı olarak bakılır (Ası 1999). İn vivo sentezde canlılar asetik aseti-KoA'dan doymuş yağ asitlerini in vitro sentezde ise diyetlerle alınan 18:3 *n*-3 (linoenik asit) ve 18:2 *n*-6 (linoleik asit) yağ asitleri desaturasyon ve elangasyon enzimleri tarafından canlının gereksinim duyduğu DHA, EPA ve araşidonik asit (AA; 20:4 *n*-6) gibi PUFA'lara dönüştürler (Gurr and James 1975; Los and Murata 1998; Warude *et al.* 2006).



Şekil 1.1. Linolenik asit'ten çoklu doymamış yağ asitlerinin sentez basamakları (Gurr 2002).

1.1. Yağ Asitlerinin Oksidasyonu

Karaciğere gelen trigliseritler, burada gliserol ve yağ asitlerine parçalanırlar. Yağ asitleri β -oksidasyon adı verilen bir yoldan oksidasyona uğrarlar. Bu oksidasyon olayı en çok karaciğer ve böbrek dokusunda, en az yağ dokusu, düz kaslar ve mitokondri içerisinde meydana gelir. β -oksidasyonda yağ asidi zinciri β -karbon atomundan yani COOH grubuna en yakın 2. karbon atomundan oksitlenir ve sonunda 1 molekül asetil-KoA ile oksidasyona uğrayan yağ asidinin 2 karbon noksanı yağ asidi kalır. Örneğin 18 karbonlu bir yağ asidi β -oksidasyon olayına maruz kalırsa sonunda 1 mol asetik asit ile 16 karbonlu yağ asidi oluşur ve olay her seferinde yağ asidi 2 mol kaybederek tamamı asetil-KoA birimlerine parçalanana kadar devam eder. β -oksidasyon beş basamakta meydana gelir (Fulco and Mead 1960; Bingöl 1976; Bartke and Hannun 2009).

1) Aktivasyon (Yağ asitlerinin aktifleşmesi)

Bu reaksiyonda yağ asidinin KoA türevi meydana gelerek yağ asidini aktifleştirir. Olayı tiyokinaz enzimi katalize eder. Üç tip tiyokinaz vardır: Birincisi, asetik asit ve propiyonik asit üzerine, ikincisi 4-12 C'lu yağ asitlerine, üçüncüsü ise 12 C'ludan fazla yağ asitlerini etkiler (Ası 1999; Vance and Vance 2002).

2) Desaturasyon

Aktifleşen yağ asidi açıl dehidrogenazlar tarafından α ve β C'lardan dehidrojenize edilir. Yani bu noktalarda 2 H kaybederek çift bağ oluşur. Olayda yağ asit sentataz-II (FAD) de rol oynar. Reaksiyonun geri dönüşü redüktaz enzimi aracılığı ile gerçekleşir ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP) rol alır. FAD'ler H alarak solunum zincirine girerler ve 2 adenozintrifosfat (ATP) sentez edilir (Ntambi 1999; Paton and Ntambi 2009).

3) Hidrasyon

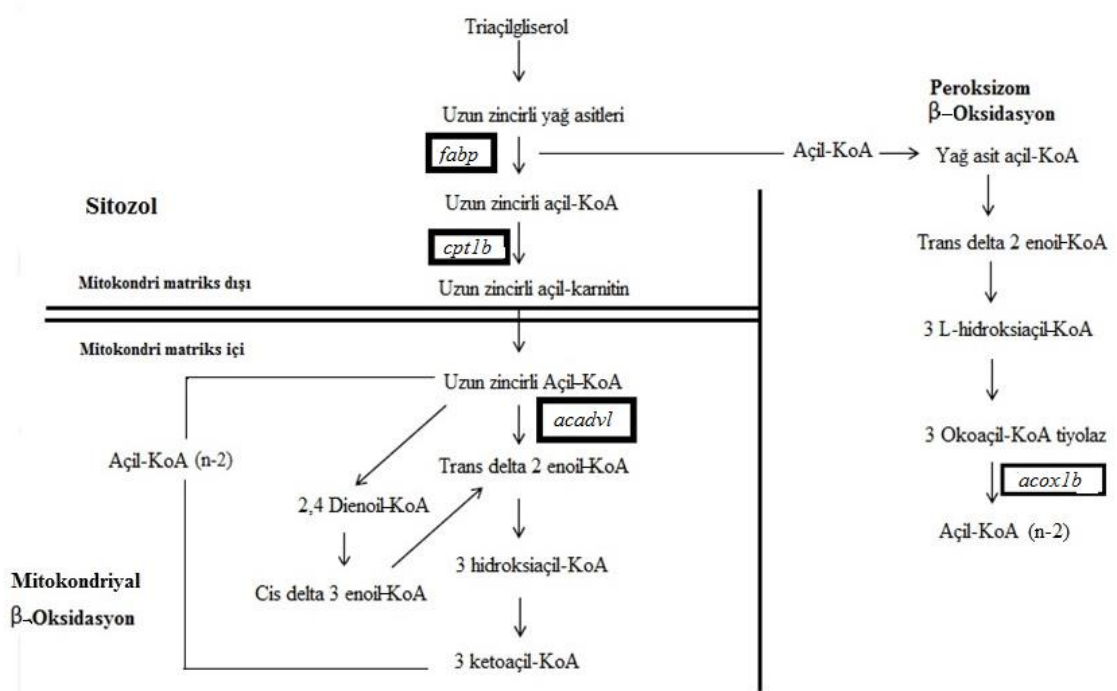
Bu basamakta desaturasyon olayında meydana gelen çift bağa bir molekül su bağlanır ve sonuçta β -hidroksiaçil KoA oluşur. Bu reaksiyonu enoil hidraz enzimi katalizler (Ası 1999; Sprecher 2000).

4) Oksidasyon

Bir önceki basamakta meydana gelen β -hidroksiaçil KoA'nın OH grubu bir keto grubuna oksitlenir ve β -ketoaçil KoA meydana gelir. Reaksiyonu β -hidroksiaçil dehidrogenaz enzimi katalizler. Hidrojenleri NAD'ler alır ve sonuçta solunum zincirine girerek 3 ATP sentezlenir (Wakil 1989; Ası 1999; Spector 1999).

5) Tiyolitik parçalanma

Bu son basamakta, β -ketoaçil KoA yeni bir KoA ile reaksiyona girerek 1 mol asetil KoA ayrılır. Geriye 2 C'nu eksilmiş yağ asidinin KoA türevi, yani aktifleşmiş şekli kalır. β -oksidasyon tekrarlanırken bu şekilde artık 1. basamak yani aktivasyon olayı atlanarak 2. kısalarak, sonunda tümüyle asetil-KoA'lara bölünür. Elde edilen asetil-KoA'ler yeniden yağ asidi sentezinde ve steroid sentezinde kullanılabilirdiği gibi, asetoasetil-KoA'larla birleşerek trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne dahil olarak enerji üretimi içinde kullanılabilirler (Wallis *et al.* 2002; Moon and Horton 2003).



Şekil 1.2. Yağ asitlerinin oksidasyon basamakları (Anonymous 2014a; Anonymous 2014b).

Bu çalışmada uzun süreli açlığın zebra balığı (*Danio rerio*) yağ asidi metabolizmasına moleküler etkilerini belirlemek amacıyla balıklarda yağ asidi metabolizmasında kritik rolleri olan 8 gen belirlenmiştir. Belirlenen genlerden; çok uzun zincirli yağ asit elongasyon 5 (*elovl5*) geni tarafından kodlanan protein uzun zincirli doymamış yağ asitleri zincir uzatmasında rol oynar, yağ asit desaturasyon 2 (*fads2*) geni tarafından

kodlanan protein yağ asit zincirinde tanımlanan karbon arasındaki çift bağların getirilmesi ile yağ asitlerinin doymamışlıklarını düzenler, çok uzun zincirli açıl-KoA dehidrogenaz (*acadvl*) geni tarafından kodlanan protein mitokondriyal yağ asit β-oksidadasyon yolunun ilk kataliz aşamasında mitokondriyal zarın içinde görev alır ve palmitol-KoA, mistritoil-KoA ve stearoil-KoA gibi uzun zincirler ve çok uzun zincir yağ asitlerinin esterlerine doğru aktiftirler. Yirmi dört karbondan daha uzun zincir açıl tabakalarına daha uygunken on iki karbondan daha az substratlarda daha az aktivite gösterir, Karnitin/Kolin asetil transferaz ailesinin bir üyesi olan karnitin palmitoltransferaz 1-Beta (*cpt1-β*) geni tarafından kodlanan protein mitokondri de uzun zincirli yağ asit β-oksidadasyon yolunda enzim oranını kontrol eder ve uzun zincirli yağ asit açıl KoA'ların net taşınmasında görev alır, Peroksizomal açıl-koenzim oksidaz 1 (*acox1*) geni tarafından kodlanan protein 2 trans-ersil-KoA'ların açıl-KoA'lara desaturasyonunu katalize eden yağ asit β-oksidadasyon yolunun ilk enzimidir, peroksizom proliferatör-aktive reseptör (*ppar*) geninin üç yakın alt tipi (alfa-beta/delta ve gamma) tespit edilmiştir. Bu gen nükleer transkripsiyon faktörünün altı peroksizom proliferatör-aktive reseptör α (*ppar-α*)'dır. *ppar-α* geni tarafından kodlanan nükleer reseptör proteini karaciğerde, bir transkripsiyon faktörü ve lipid metabolizmasının bir ana düzenleyicisidir. *Ppar-α* enerji yoksunluğu durumlarında aktiftir ve uzun bir açlıktan sonra anahtar adaptasyondan sorumlu Ketogenesin'in işleminde gereklidir. Beyin tipi yağ asiti bağlayıcı geni (*fabp7a*) tarafından kodlanan beyin yağ asit bağlayıcı protein uzun zincirli yağ asitlerinin ve diğer hidrofobik ligandları bağlanan küçük yüksek düzeyde korunmuş sitoplazmik bir protein ailesidir. *Fabp7a* yağ asidi alımı, ulaşımı ve metabolizmada rol oynadığı düşünülmektedir, karaciğer tipi yağ asidi bağlayıcı geni (*fabp1a*) karaciğerde bulunan yağ asidi bağlayıcı proteini kodlar. *Fabp1a* yağ asidi alımı, taşıma ve metabolizma dahil olduğu düşünülmektedir (Price *et al.* 2000; Leonard *et al.* 2004; Gregersen *et al.* 2004; Glaser *et al.* 2010; Boukouvala *et al.* 2010; Tuğlu ve Uysal 2011; Anonymous 2014).

1.2. Zebra Balığı (*Danio rerio*)

Zebra balığı (*Danio rerio*) cyprinidae familyasına ait tropikal bir türdür. Anavatanı Güneydoğu Asya olan bu tür baskın olarak Pakistan ve Hindistan'da bulunmaktadır. Balığın gövdesi ışığa bağlı olarak koyu mavi, gümüş beyazı veya altın sarısı çizgilerle örtülüdür (Mills, 1986). Uygun koşullar altında bakımının kolay olması, çok sayıda yumurta vermesi ve yumurtalarının transparan olması nedeniyle 1930'lu yıllardan beri yaygın olarak üzerinde bilimsel araştırmaların yapıldığı bir türdür. Genç bireylerin boyları 4,5-5 cm uzunluktadır (Şekil 1). Erkek bireyler dişi bireylerden morfolojik olarak farklılık göstermektedir. Erkek bireylerin anal yüzgeçleri dişi bireylere göre daha büyük ve genital papillaya sahiptirler (Timur 2006).



Şekil 1.3. Zebra balıklarının genel morfolojisi

Zebra balığının gelişimi, insanlar da dahil olmak üzere daha yüksek omurgalıların embriyogenesine çok benzer ancak memelilerden farklı olarak şeffaf bir yumurta dışında ovipar üreme göstermektedir (Wixon 2000). Zebra balığının embriyonik gelişimi çok hızlıdır, döllenmeden sonra ilk 24 saat içinde tüm önemli organları gelişmiş ve üç gün içinde yumurtadan çıkışını takiben birkaç gün içerisinde vitellus kesesini tüketmeden dışarıdan yem almaya başlar hale gelir. Döllenmeden sonraki 72. saatten itibaren zebra balıklarında larva dönemi başlar. Bu dönemde larvalar 3.5 mm uzunluğunda ve nadiren de olsa yüzme hareketi görülür. 74-75 günlük zebra balıklarından erkekler yaklaşık 23,1 mm uzunluğuna, dişi bireyler ise 24,9 mm

uzunluğa ulaştıklarında üreme davranışı gösterebilmektedirler. Dişi zebra balığı bir üreme döneminde 150-400 arasında yumurta üretebilmekte ve yaşamı boyunca 1500-1800 arasında yumurta verebilmektedir (Westerfield 1995; Stern and Zon 2003; Reim 2003; Timur 2006).

1.3. Zebra Balığı ile Çalışmanın Avantajları

Sucul omurgalılar çevreden yayılan çeşitli stres faktörlerine diğer canlılardan daha fazla maruz kalmalarından dolayı balıklarla ilgili yapılan araştırmalar oldukça önemlidir. Son yıllarda çalışmalarda Zebra balığı yumurtaları ve embriyoları sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Zebra balığının dayanıklı bir tür olması, kolay bulunması, laboratuvar ortamında kolay beslenebilmesi ve çoğalması, ergin dişilerin haftalık aralıklarla yüzlerce yumurta bırakabilmesi, dış döllenmeyle üremesi, yumurta ve embriyosunun saydam oluşu, yumurta ve larva gelişiminin kolay izlenebilmesi, jenerasyon zamanının kısa olması ve embriyolarının toksik ajanlara duyarlı oluşu nedenleriyle bilimsel çalışmalarda en sık kullanılan model organizmalardan biridir (Hisaoka and Battle 1958; Kimmel *et al.* 1995; Lele and Krone 1996). Zebra balığı insan ve diğer omurgalıların hastalıklarının araştırılmasında mükemmel bir model organizma olarak kullanılmaktadır. Bu türün model organizma olarak kullanılmasının başlıca nedenleri: İnsan ve diğer omurgalıların genom yapılarının birbirine benzer oluşu, metabolizmalarının ve embriyonik gelişimlerinin hemen hemen aynı olmasıdır. Zebra balığının hayat döngüsünün laboratuvar farelerine göre daha kısa sürede tamamlanması, farelerle yapılan deneylerin aynılarının bu balık türüyle de yapılabilmesi ve hatta daha fazla neslin takip edilebilmesi (özellikle teratojenik testlerde) diğer bir tercih nedeni olmuştur. Keza farelerde embriyo gelişimi anne vücudu içinde olduğu için araştırmacıya embriyoyu en başından takip etme şansını vermemektedir. Oysa zebra balığı embriyoları anne vücudu dışında gelişmekte ve böylece döllenmeden itibaren zigotun gelişimi takip edilebilmektedir. Zebra balığının tercih edilmesinin diğer bir nedeni uygulanan testin kısa oluşu ve sonuçların tartışmasız net oluşudur (Din 2002).

Bütün bu veriler ışığında; çalışmanın amacı açlık periyodu boyunca Zebra balığının (*Danio rerio*) tüm vücudunda yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi ve açlığın yağ asit metabolizmasında görev alan bazı genlerin ekspresyon miktarlarına etkilerinin araştırılmasıdır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Larsson and Lewander (1973) 8, 95 ve 145 gün boyunca aç bırakılan Avrupa yılan balığında (*Anguilla anguilla*) serbest yağ asitleri seviyesinde artış olduğunu ve karaciğer glikojen seviyesinde bir azalma tespit etmişlerdir.

Dave *et al.* (1976) Avrupa yılan balıklarını uzun süreli açlığa maruz bırakarak kas ve karaciğerdeki yağ asidi miktarlarındaki değişimleri incelemişlerdir. Miristik asit (14:0) karaciğerde ve kasta azalırken palmitoleik asit (16:1 *n*-7), oleik asit (18:1 *n*-9), gondoik asit (20:1 *n*-9), araşidonik asit (20:4 *n*-6), EPA ve dokosapentaenoik asit (DPA 22:5 *n*-3) karaciğerde arttığını bildirmişlerdir.

Satoh *et al.* (1984) 50 gün boyunca aç kalan Nil tilapyası (*Tilapia nilotica*) canlı ağırlığının, toplam kas ve karaciğer yağ asit miktarı ve triaçilgliserol miktarında bir azalma olduğunu belirlemişlerdir. Açlık boyunca *n*-3 PUFA'ların korunduğunu ve 18:1 *n*-9'un kas ve karaciğerde azaldığını belirtmişlerdir.

Black and Love (1986) Atlantik morinalarının (*Gadus morhua*) açlık periyodu boyunca karaciğer yağ asitlerinin ve beyaz kas glikojen seviyesinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir.

Koven *et al.* (1989) 17 gün beslendikten sonra 6 gün aç bırakılan çipura (*Sparus aurata*) larvalarının nötral ve polar lipidlerindeki yağ asidi kaybının aç bırakılan larvalarda *n*-6>*n*-9>*n*-3 şeklinde olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca açlık boyunca DHA'nın EPA'dan daha iyi korunduğu bulunmuştur.

Tidwell *et al.* (1992) kanal yayın balığı (*Ictalurus punctatus*) dokularındaki yağ asiti kompozisyonuna açlık ve yeniden beslenmenin etkilerini incelemişlerdir. Çalışma neticesinde 28 gün süresince aç bırakılan grubun kas dokusu *n*-3 PUFA seviyelerinin kontrol grubu balıklarınınkinden daha yüksek olduğu bulunmuştur: sırasıyla %10,7 ve

%8. Ayrıca EPA da açlık grubu balıklarının karaciğerinde kontrol grubundan fazla çıkmıştır.

Webster *et al.* (1994) 80 gün boyunca aç kalan kanal kedi balıklarının (*Ictalurus punctatus*) DHA miktarının karaciğer ve kaslarda saklandığı ve viseral yağların yağ asidi kompozisyonunda çok az bir değişimin söz konusu olduğunu rapor etmiştir.

Zamal and Ollevier (1995) Afrika Yayın balığının (*Clarias gariepinus*) açlık periyodu süresince karaciğer yağ asidi profilinde, kasta olduğundan daha fazla değişime uğradığı ve ihtiyaca göre 14:0>16:1 *n-7*>18:1 *n-9* yağ asitlerini kullandığı, 22:6 *n-3*>20:1 *n-9* yağ asitlerini ise saklanma eğilimi gösterdiği belirtilmiştir.

Silva *et al.* (1997) yaklaşık 53 gr ağırlığındaki melez kırmızı Tilapia (*Oreochromis mossambicus* X *Oreochromis niloticus*) 45 gün aç bırakılması sonucu yağ asiti profilinde oluşan değişiklikleri incelemişlerdir. Beslenen ve aç bırakılan balıkların 0, 24 ve 45. gün karaciğer ve kaslarında yağ asidi profilleri belirlenmiş ve aç bırakılan balıklarda PUFA miktarının dişilerde %18,3'den %39,9'a; erkeklerde ise %16,9'dan %46,2'ye çıktığı bulunmuştur. Ayrıca açlık boyunca DHA miktarının sürekli arttığını belirtmişlerdir.

Mourente *et al.* (1999) sinarit (*Dentex dentex*) larvalarının açlık periyodu boyunca 22:6 *n-3*, 20:5 *n-3* ve 20:4 *n-6* yağ asitlerinin öncelikli olarak tüketildiğini ve 16:0 ve 18:1 *n-9* yağ asitlerini koruma altına alındığını tespit etmişlerdir.

Liu *et al.* (2004) zebra balığında merkezi sinir sisteminin erken gelişimi sırasında beyin tipi yağ asiti bağlayıcı protein (*fabp7a* ve *fabp7b*) genlerini incelemişlerdir. Beyindeki *fabp7b* transkripsiyonu seviyeleri *fabp7a* transkripsiyondan düşük bulunmuştur. Zebra balığı *fabp7a* transkripsiyonun erken gelişen merkezi sinir sisteminde yayıldığı görülmüştür. Zebra balığı *fabp7b* mRNA'sını embriyonik gelişim boyunca hava kesesi ve yutakta saptamışlardır.

Jeziarska *et al.* (2006) gökkuşığı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) açlık boyunca yağ taşınımını incelemiştir. Araştırmada karaciğerde MUFA miktarı azalmış, PUFA miktarı ise sabit kalmıştır. Bu değişimlerin bir sonucu olan nispi yağ asiti bileşimi UIS (doymamış yağ asitlerinin doymuş yağ asitlerine oranı) oranı iç organlar ve karaciğerde yükselirken kaslarda azalmıştır.

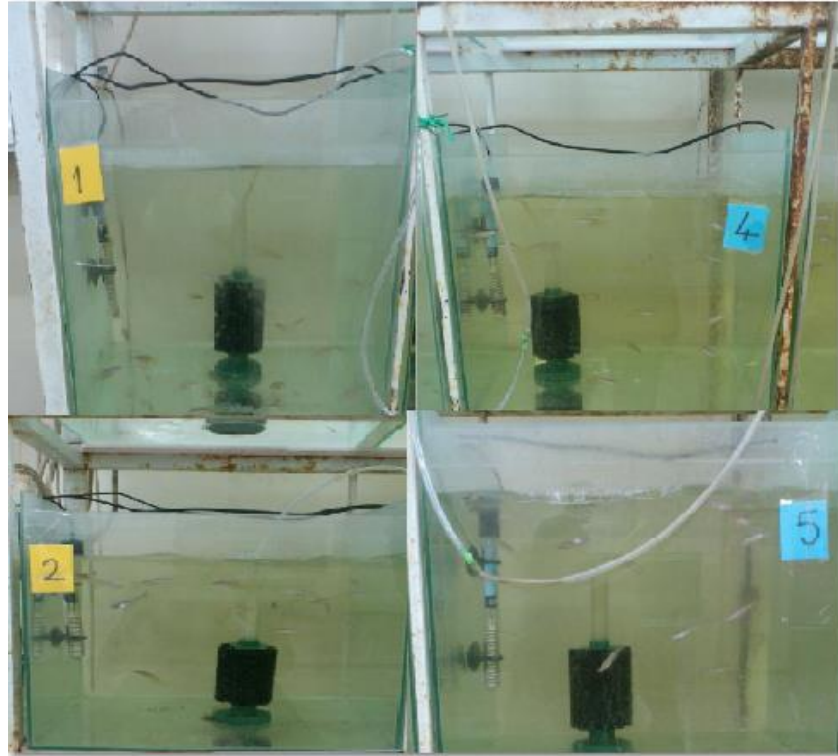
Drew *et al.* (2008) yetişkin dişi zebra balığında beyin ve karaciğer gen transkripsiyonuna açlığın etkisini araştırmışlardır. Bu süreçte sadece agrp1 (agouti-related protein 1) proteininin aç olan balığın beyindeki ekspresyonun artmasıyla anlamlı tepki vermiş. Buna karşın 21 gün aç bırakılan balıklarda karaciğer metabolik aktivitesi ve lipid metabolizması protein biyosentezi, proteoliz ve hücre solunum azalırken glukoneogenez artış göstermiştir. Açlık boyunca zebra balığının hepatik transkripsiyon yanıtının gökkuşığı alabalığındakine benzediğini belirtilmiştir.

Luo *et al.* (2009) özellikle amino asit ve yağ asidi değişikliği üzerine çalışılan yavru kanal yayın balığının (*Ictalurus punctatus*) vücut ağırlığı ve vücut kompozisyonundaki uzun süreli (80 gün) açlığın etkilerini incelemiştir. Kas dokusundaki toplam MUFA ve $n-6$ PUFA azalmış fakat toplam SFA, $n-3$ PUFA ve de $n-3/n-6$ PUFA oranı artmıştır. Bunun aksine karaciğerde toplam MUFA nispeten artarken $n-3$ yağ asitleri içeriği ve $n-3/n-6$ yağ asitleri oranı azalmıştır. Bu verilere dayanarak yağlar ve glikojenin karaciğerde enerji kaynağı olarak çok önemli seviyelerde katabolize edildikleri sonucuna varılmıştır.

Enyu and Shu-Chien (2011) zebra balığının açlık sırasında ve beslemenin yeniden başlamasıyla karaciğerindeki mitokondriyal proteom değişikliklerini belirlemeye çalışmışlardır. Proteinlerin açlık sırasında glikoz seviyesi düşürülmesinde ve glikoliz seviyesinin arttırılmasında aktivitelerinde artış gözlemlenmiş, açlık sona erdiğinde aktiviteleri normal seviyelerine geri dönmüştür. Yağ asidi ve amino asit metabolizması ile ilgili çeşitli proteinlerin ekspresyonunda da açlık koşullarında enerji için karbonhidrat olmayan kaynaklarını kullanıldığı belirlenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Araştırma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Almus Meslek Yüksek Okulu Su Ürünleri Bölümü Laboratuvarında bulunan 6 adet 30×15×20 cm ebatlarındaki akvaryumlarda yürütülmüştür. Deneme için 120 adet yavru zebra balığı her bir akvaryuma 20 adet paylaştırılmıştır. 1, 2 ve 3 nolu akvaryumdaki balıklar 70 gün boyunca tamamen aç bırakılmış ardından 15 gün boyunca sabah 9.00, öğlen 12.30 ve akşam 16.30'da 3 kez 4, 5 ve 6 nolu akvaryumdaki kontrol grubu balıklar ise yine 3 tekerrürlü olarak 85 gün boyunca yukarıda verilen saatlerde *ad libitum* olarak ticari bir zebra balığı yemi ile yemlenmişlerdir. Araştırmada kullanılan yemin yağ asidi profili Çizelge 3.1'de verilmiştir. Çalışma esnasında tüm akvaryumlar Atman marka (AT-338) dış filtre ile temizlenmiştir. Su sıcaklığı termostatlı ısıtıcılar ile 28,5°C'de sabit tutulmuştur. İlk örnekleme açlık periyodunun sonunda (70. gün), ikinci örnekleme ise açlık uygulanan balıkların 15 gün yemleme periyodunun sonunda (85. gün) yapılmıştır.



Şekil 3.1. Denemenin yürütüldüğü akvaryumlar

Çizelge 3.1. Deneme yeminin yağ asidi kompozisyonu (%)

Yağ Asidi	Yağ Asitlerinin %'si
14:0	1,8
16:0	21,2
18:0	3,9
Σ SFA	28,4
16:1 <i>n</i> -7	3,5
18:1 <i>n</i> -9	25,3
Σ MUFA	31,0
18:3 <i>n</i> -3	3,2
20:5 <i>n</i> -3	13,5
22:5 <i>n</i> -3	1,2±
22:6 <i>n</i> -3	11,4±
Σ <i>n</i> -3	26,2
18:2 <i>n</i> -6	11,9
20:4 <i>n</i> -6	2,0
Σ <i>n</i> -6	14,1
EPA+DHA	12,6
Σ <i>n</i> -3/ Σ <i>n</i> -6	1,8

3.1. Balık Ağırlıkları ve Yaşam Oranı Hesaplama

Çalışma boyunca balıklar başlangıçta, birinci ve ikinci örneklemede 0,01 gr'a hassas terazi ile tartılmışlardır. Araştırmaya her bir akvaryuma 20 şer balık konularak başlanmıştır fakat açlık ve bazı fiziksel nedenlerden dolayı akvaryumlarda ölümler gözlenmiştir. Bu sebeple her akvaryum için yaşama oranı hesaplanmıştır. Yaşama oranı (YO)'nın hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır (Atay 1989; Gökoğlu ve Baran 1991);

$$\text{Yaşama Oranı} = (N2 / N1) \times 100$$

N1 : İlk birey sayısı

N2 : Son birey sayısı

3.2. Örneklerden Yağın Ekstrakte Edilmesi ve Miktarının Belirlenmesi

Çalışma materyalinin yağ ekstraksiyonu Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Kromatografi Laboratuvarında yapılmıştır. Deneme için alınan birinci ve ikinci örneklemelerdeki bütün halindeki balıklar ayrı ayrı ezilerek kıyma haline getirilmiş ve iyice karıştırılarak homojen bir karışım elde edilmiştir. Ardından toplam yağ elde etmek için karışımlardan 6 adet 1'er gr örnek tartılarak 50 ml'lik tüplere aktarılmış (n=6) ve üzerlerine %0,01 (w/v) bitulated hidroksi tolien içeren kloroform/methanol (2:1 v/v) karışımından 20 ml ilave edilmiştir. Daha sonra örnekler 1 dak. ultratüraks ile parçalanıp vakum altında Whatman No:1 filtre kağıdı kullanılarak süzülmüştür. Süzme işlemi bittikten sonra örnekler temiz ve kuru tüplere aktarılarak her bir çözeltinin %2'si kadar $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 'dan (20 ml çözelti için 4 ml olacak şekilde) ilave edilmiştir. Daha sonra tüplere azot doldurulup gazı kaçmayacak şekilde kapatıldıktan sonra 1 dak. vortekslenerek faz oluşumu için bir gün süreyle oda sıcaklığında bırakılmıştır (Folch *et al.* 1954).

İkinci aşamada bir gün süreyle bekletilen tüplerde faz oluşumu görüldükten sonra pastör pipeti yardımıyla alt faz alınarak temiz ve kuru daraları alınmış, küçük tüplere aktarılmıştır. Aktarma işleminden sonra tüpler azot evaporatör sistem içerisine yerleştirilerek ısıtma ve azot gazına tabi tutulmuştur. Buharlaştırma işlemi sırasında belli aralıklarla tüpler tartılmıştır. Tartımlar sabitleninceye kadar devam etmiştir. Böylece saf olarak elde edilen yağlardan 50 mg tartılarak temiz tüplere aktarılmış ve üzerine 1,5 ml 2 M NaOH ilave edilmiştir. Sonra tüplere azot gazı doldurulup sıkıca ağızları kapatılarak 1 saat süreyle 80°C sıcaklıkta etüve bırakılmıştır. Bu işlemden sonra soğuyan örneklerin üzerine 2 ml BF₃ (brontrifluoride methanol %25'lik) ilave edilerek tüplere tekrar azot doldurulup 80°C etüvde yarım saat daha bekletilmişlerdir. İnkübasyon süresinin bitmesinden sonra tekrar soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan tüplerin üzerlerine 1 ml hekzan ilave edilerek vortekslenip iyice karışması sağlandıktan sonra 1ml ultra saf su ilave edilerek tekrar vortekslenmiştir. Tüpler içerisindeki hekzan tabakası alınarak sodyum sülfat içeren yeni tüplere aktarılmış ve 1 ml hekzan daha ilave edilerek tekrar vortekslenmiştir. Örnekler 6000 rpm'de 10 dak. santrifüjlendikten sonra

üstte kalan hekzan tabakası 2 ml'lik gaz kromatografisi (GC) viallerine aktarılmış ve viallere azot gazı doldurulmuştur. Bütün bu işlemlerden sonra tüpçükler GC'ne analizler için yerleştirilmiştir (Metcalf and Schmitz 1961).

Enjeksiyon için hazırlanan örnekler 100'lü otomatik örnek tablasına yerleştirilerek gaz kromatografisi çalıştırılmıştır. Supelco Component FAME Mix standartının yürütüldüğü sistem piklerin çıkış zamanlarına göre yağ asitlerine kalibre edilmiş ve yağ asitlerinin miktarları (toplam yağ asitlerinin %'si) internal standarda (19:0) göre belirlenmiştir (David *et al.* 2003).

3.3. Balıkların Karaciğerlerinin Çıkarılması

Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) analizleri için açlık ve yeniden besleme dönemlerini takiben her gruptan rastgele seçilen 6 adet balık (her bir akvaryumdan 2 balık) bir kapta bulunan kar üzerine konulup şoka sokularak bayıltılmıştır. Ardından steril aletlerle ve bir büyüteç yardımıyla karaciğerleri çıkarılmış ve TRIzol içerisinde -80°C'lik derin dondurucuda toplam RNA izolasyonuna kadar muhafaza edilmiştir.

3.4. Toplam RNA İzolasyonu

Örnekler derin dondurucudan çıkartılarak oda sıcaklığına getirildikten sonra TRIzol içerisinde steril blender çubuğu kullanılarak homejenize edilmiş ve aşağıdaki protokole göre toplam RNA izolasyonu yapılmıştır (Parmar *et al.* 2012).

1. Homojenize edilen örnekler 5 dak. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
2. 200 µl kloroform eklendikten sonra el ile 15 sn alt üst edilerek karıştırılmıştır.
3. 12500 rpm de 15 dak. 4°C'de santrifüj edilmiştir.
4. Santrifüj sonrası oluşan üst faz alınmış ve 50 µl izopropanol içeren yeni tüpe aktarılmıştır.
5. Bu tüpler alt üst edilerek karıştırılmış ve 10 dak. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
6. 12500 rpm de 10 dak. 4°C'de santrifüj edilmiştir.

7. Daha sonra süpernatant dikkatli bir şekilde dökülmüş ve pelet üzerine %75'lik steril soğuk etanol eklendikten sonra çok düşük hızda vortekslenmiştir.
8. 9500 rpm'de 5 dak. 4°C'de santrifüj yapılmıştır.
9. %75 etanol dökülmüş ve tüplerin kapakları açık bırakılarak toplam RNA peleti bir gece kurutulmaya bırakılmıştır.
10. Ertesi gün tüplere 40 µl steril-DNAse/RNAse free su eklenmiştir.
11. Son olarak sirkülasyonlu su banyosunda tüplerin içine su girmemesine dikkat edilerek 55-60°C'de 10 dak. bekletilmiş böylece toplam RNA peletinin çözünmesi sağlanmış ve analizlere kadar -80°C'lik derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.5. RNA'nın Kantitatif Tayini

İzole edilen RNA'ların kantitatif analizi Nanodrop ile (OD_{260} ve OD_{280} nm'de) yapılmıştır. Bu amaçla örneklerin 260 ve 280 nm dalga boyunda köre karşı absorbansları okunmuş ve OD_{260}/OD_{280} oranının 2'den küçük olması durumunda izolasyon yenilenmiştir. Bu oranın 2 civarında olması durumunda ise reverse transkripsiyon basamağına geçilmiştir (Bayır *et al.* 2015).

3.6. Primerlerin Tasarlanması

Ensembl genom veri tabanından (www.ensembl.org) her bir genin cDNA dizilimi elde edildikten sonra NCBI genom veri tabanında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) PCR ürününe heterojenik RNA veya genomik DNA karışmasını engellemek amacıyla "Exon-Exon Junction" modeline göre primerler tasarlanmıştır. Çizelge 3.1'de primerlere dizayn edilen nükleotit dizileri mevcuttur.

Çizelge 3.2. Kullanılan primerlerin nükleotit dizilimi ve optimum bağlanma sıcaklıkları (T_m)

Gene	Forward primer (5' → 3')	Reverse Primer (5' → 3')	T _m (°C)
<i>elovl5</i>	CTAAAGGTTGAAGATGGAGACG	CGTCCAGCAGAAACCATCCT	60,6
<i>fads2</i>	CCCGTGGAGTATGGCGTTA	TGTGGCTCATCTGTGTGACC	58,1
<i>acadvl</i>	GCAGTCGTTAGTGTGGAATCA	GACCAAAGGCTCCCATCTCC	60,2
<i>cpt1-β</i>	GTCCTGAGACGGATTCTTTCC	TGACTGCTAACTGGTGCTGG	62,6
<i>acox1</i>	CCAGGTGGATTGGGTA AAAAC	CGAATGGGTGTGATGAAAGCA	60,6
<i>ppar-α</i>	CTCCGCCCTTCGTCATTCA	CGTATTTTCAGCAGCGTCACC	62,6
<i>fabp7a</i>	GCTACCAGGCAAGTAGGCAA	CCAAGGATACAGTAGACTTCACA	60,6
<i>fabp1a</i>	GAAGGCAGTCGGTGTGC	CCGTCACAGACTCAATCCCC	63,4
<i>rpl13a</i>	AGCAAGTGCTGTTGGGCCAC	GTGTGGCGGTGATGGCCTGG	63,1
<i>rpl7</i>	CAGAGGTATCAATGGTGTGTCAGCCC	TTCGGAGCATGTTGATGGAGGC	65,6

3.7. Primer Optimizasyonu ve Primerlerin Çözündürülmesi

Primer çiftlerinin en etkin çalıştıkları bağlanma sıcaklıklarını bulmak için forward ve reverse primerlerinin sıcaklıklarının ortalaması alınıp ortalamanın $\pm 4^{\circ}\text{C}$ alınarak dört tane sıcaklık belirlenmiştir. Daha sonra belirlenen bu dört sıcaklıkta PCR yapıp ürünler agaroz jelde yürütülmüş ve gözlenen en kalın bant optimum sıcaklık olarak seçilmiştir. Primerler öncelikle yoğunluklarına göre Tris-EDTA tamponu (pH: 8) ile çözündürülmüş, daha sonra steril DNase/RNase free tüplere 450 μl steril DNase/RNase free ve 50 μl çözündürülmüş primerlerden konularak vortekslenip kullanıma hazır hale getirilmiştir (Bayır *et al.* 2015).

3.8. Reverse transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Toplam RNA'dan cDNA sentezi için Omniscript Reverse Transcription Kiti (Qiagen, Valencia, CA, USA) kullanılmıştır. Öncelikle mRNA örnekleri buz üzerinde 5 dak. tutularak çözündürülmüştür. Daha sonra 0,2 ml'lik steril-DNase/RNase free polimeraz zincir reaksiyon (PCR) tüplerine 2 μl 10 X Reverse Transkripsiyon tamponu, 2 μl Omniscript Reverse Transkripsiyon kiti, 2 μl Oligo dT, 2 μl dNTP, 12 μl DNase/RNase free saf su ve 1 μl toplam RNA (buzda çözündürülmüş) konularak PCR cihazında 37°C 'de 60 dak. bekletildikten sonra cDNA'lar elde edilmiştir. Başarılı bir

RT-PCR işlemi için cihaza verilmesi gereken optimum RNA miktarı 2 µg'dır ve bu miktarın RT-PCR işlemine tabi tutulacak tüm örneklerde eşit olması gerekmektedir. Tüplere standart prosedür olarak 1 µl toplam RNA eklenmektedir. Ancak tüm dokulardaki saflaştırma işlemi aynı derecede başarılı olamayacağından veya dokular eşit oranda RNA içermeyebileceklerinden bir örnek için 1 µl toplam RNA yeterli olurken başka bir örnek için bu rakam 13 µl olabilmektedir. Bütün bu hesaplamalar nanodrop cihazında otomatik olarak yapılmıştır (Parmar and Wright 2013).

3.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR analizleri için 0,2 ml'lik PCR tüplerine 22 µL Platinum PCR Süpermiks, 1 µl forward primer, 1 µl reverse primer ve 1 µl cDNA eklenip ve aşağıdaki prosedüre göre PCR yapılmıştır (Liu *et al.* 2003).

- 1- Başlangıç Denatürasyonu: 95°C'de 2 dakika
- 2- Denatürasyon: 95°C'de 20 saniye (35 döngü)
- 3- Annealing: Her bir genin primerlerinin optimum Tm sıcaklıkları 30 saniye (35 döngü)
- 4- Elongasyon: 72°C'de 30 saniye (35 döngü)
- 5- Final Elongasyonu: 72°C'de 5 dakika.

3.10. Agaroz Jelin Hazırlanması

Jel hazırlığı için öncelikle 0,7 gr agaroz hassas terazide tartılır. Ana stokta 5X olarak hazırlanmış, dH₂O ilavesiyle 1X olacak biçimde seyreltilmiş olan Tris-HCl, Borik asit, EDTA (TBE), 0,7 gr agaroz 70 ml olacak biçimde ilave edilir. Hazırlanan bu karışımın mikrodalga fırında çözünmesi sağlanır. Çözelti hazırlandıktan sonra bir süre soğuması beklenir, 1 µl etidyum bromide (EtBr) eklenir. İyiye karıştırılmasının ardından çözelti, donması için jel tablasına dökülerek 25-30 dak. katılaşmaya kadar bekletilir (Bayır *et al.* 2015).

3.11. PCR Ürünlerinin Agaroz Jele Yüklenmesi ve Görüntülenmesi

Katılaşılan agaroz jel elektroforez tankına yerleştirilir. 10 µl PCR ürünü, 2 µl yükleme boyası ile karıştırılarak ikinci kuyudan itibaren jele yüklenir. Birinci kuyuya markır (4 µl distele su, 1 µl yükleme boyası, 1 µl DNA belirteci) koyulur ve jel 120 voltta yürütülür. Ardından jel görüntüleme sistemi kullanılarak UV altında görüntülenip optimum sıcaklıkları belirlenir (Bayır *et al.* 2015) (Çizelge 3.1).

3.12. Kantitatif PCR (qPCR)

Çalışmada belirlenen genlerin transkriptlerinin miktarlarını hesaplamak (kopya sayısı/µL) için SYBR Green PCR Kit metodu ile qPCR yapılmıştır (Bustin *et al.* 2005). Her bir örnek 2 tekrür olacak şekilde qPCR tüplerine 10 µl SYBR Gren, 5 µL DNase/RNase free saf su, 2 µl forward primer, 2 µl reverse primer ve 1 µl cDNA konulmuştur. Ayrıca 1 qPCR tüpüne cDNA hariç diğer tüm kimyasallar konularak örneklerde kontaminasyon ihtimaline karşı kör olarak kullanılmıştır. qPCR prosedürü şu şekilde gerçekleştirilmiştir (Parmar *et al.* 2012);

Başlangıç denatürasyonu: 95°C'de 15 dakika

Denatürasyon: 95°C'de 20 saniye

Annealing: 30 saniye

Elongasyon: 72°C'de 30 saniye

Toplam döngü sayısı: 40

Tüm dokulardaki ekspresyon miktarları eşit bulunan ribozomal protein 7 (*rpl7*) ve ribozomal protein L 13α (*rpl13α*) referans genler olarak kullanılmışlardır (Tang *et al.* 2007, Zhang and Hu 2007). Her bir gen transkriptinin miktarının hesaplanması için genlerin kopya sayıları referans gen kopya sayılarına bölünerek normalize edilmiştir.

3.13. Tris-HCl, Borik asit, EDTA (TBE) Tamponunun Hazırlanması

5 x Tris-HCl, Borik asit, EDTA (TBE) tamponu için 54 gr Trisma Base ve 27,5 gr Borik asit 500 ml saf su içerisinde çözülmüştür. Daha sonra 20 ml 0,5 M (pH=8) etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ilave edilip çözündürüldükten sonra çözelti saf su ile 1000 ml ye tamamlanmıştır (Brody and Kern 2004).

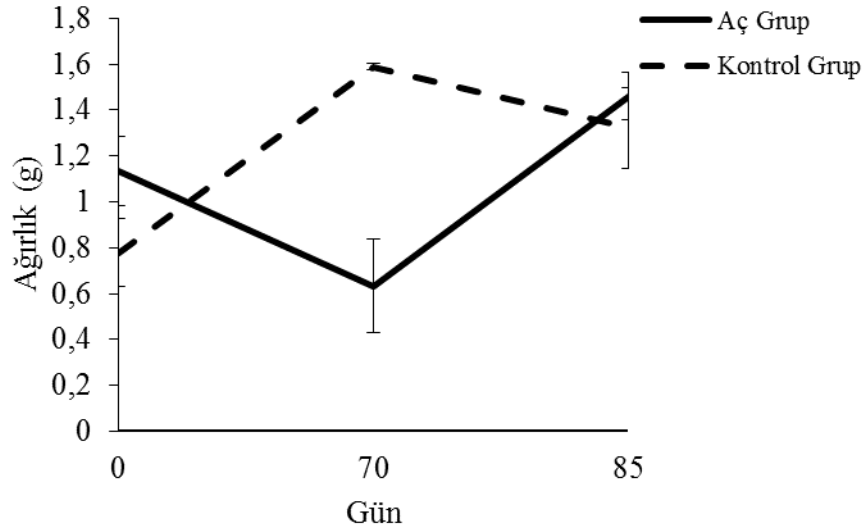
3.14. Sonuçların Hesaplanması ve İstatistikî Analizler

Gen ekspresyon değerleri iki referans genin ekspresyon değerlerine bölünerek normalize edilmiştir. Daha sonra yağ asidi değerlerinin istatistikî analizleri için SPSS 17.0 paket programında ANOVA testi yapılmıştır. ANOVA testi analizleri sonucunda önemli çıkan grup ortalamaları arasındaki farklılığı tespit etmek için Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır (Zar 1984).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Balık Ağırlıkları ve Yaşam Oranı Sonuçları

Yaptığımız çalışmada başlangıçta kontrol grubu balıkların ortalama ağırlıkları 0,78 gr, açlık uygulanan gruptaki balıkların ortalama ağırlıkları 1,13 gr olarak tespit edilmiştir. Bu değerler 70 günün sonunda kontrol grubu balıklarda ortalama ağırlık 1,59 gr olurken açlık uygulanan grupta 0,63 gr'a düşmüştür (Şekil 4.1). Açlık uygulanan grubun 15. gün yemle beslenmesinin ardından balıkların 85. gün sonundaki ağırlık artışı değerlerine bakıldığında kontrol grubu arasında istatistiksel olarak farklılığın olmadığı tespit edilmiştir ($P<0,05$). Yaşam oranı açlık uygulanan grupta ortalama %55 bulunurken kontrol grubunda ortalama %91 tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). İstatistiksel analizler neticesinde grupların yaşam oranı değerleri arasındaki farkın önemli olduğu tespit edilmiştir ($P<0,05$).



Şekil 4.1. Grupların balık başı ortalama ağırlıkları (gr)

Çizelge 4.1. Grupların yaşam oranları (YO)

	Aç Grup	Kontrol Grubu
YO (%)	55±5 ^a	91±5,7 ^b

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

4.2. Yağ Asidi Kompozisyonuna İlişkin Sonuçlar

4.2.1. Doymuş yağ asitleri

Toplam doymuş yağ asitlerinde (SFA) dominant yağ asidi tüm gruplarda 16:0 (palmitik asit) yağ asididir. Palmitik asitin en yüksek değeri %21,56±0,30 ile kontrol grubunda en düşük değeri ise açlık uygulanan grupta (%15,59±0,35) görülmüştür. Toplam doymuş yağ asitlerinde palmitik asitten sonra en yüksek oranda belirlenen yağ asidi ise 18:0 (stearik asit)'dir. Stearik asit sırasıyla %12,40±0,07 ile açlık uygulanan grup, %4,66±0,02 ile açlık periyodundan sonra 15 günlük yemleme periyoduna alınan balıklar, %3,87±0,17 ile kontrol grubu belirlenmiştir. Çizelge 4.2'de görülebileceği üzere en yüksek toplam SFA %30,42±0,40 ile 70. gün açlık uygulanan grupta bulunurken daha sonra %28,65±0,28 ile kontrol grup ve %25,68±0,28 ile açlık periyodundan sonra 15 günlük yemleme periyoduna alınan balıklar gelmiştir. İstatistiksel analizler neticesinde grupların toplam SFA değerleri arasındaki farkın önemli olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$).

Çizelge 4.2. Deneme gruplarının SFA kompozisyonu (Toplam yağ asitlerinin %'si)

Yağ Asidi	70.Gün		85.Gün	
	Kontrol	Aç	Kontrol	Aç *
14:0	1,3±0,0 ^a	0,6±0,0 ^b	1,3±0,1 ^a	1,3±0,0 ^a
16:0	21,5±0,3 ^a	15,6±0,3 ^c	17,7±0,5 ^b	17,7±0,3 ^b
18:0	3,9±0,2 ^c	12,4±0,1 ^a	3,7±0,3 ^c	4,7±0,0 ^b
∑ SFA	28,6 ±0,3^b	30,4±0,4^a	24,8±0,4^d	25,7±0,3^c

$X \pm S_x$ =Ortalama±Ortalamanın Standart Sapması, n=3. Farklı harfler birbirinden farklı olan grupları göstermektedir, $p<0,05$. *: 70 günlük açlık periyodundan sonra 15 gün boyunca *ad libitum* beslenen balıklar.

4.2.2. Toplam tekli doymamış yağ asitleri

Toplam tekli doymamış yağ asitlerinin (MUFA) grubunun dominant yağ asidi tüm gruplarda 18:1 *n*-9 (oleik asit) yağ asididir. Oleik asitin en yüksek değeri %31,25±0,21 ile açlık uygulanan ardından 15 günlük yemleme periyoduna alınan balıklarda belirlenirken en düşük değeri %22,35±0,03 ile 70 gün açlık uygulanan grupta bulunmuştur ($P<0,05$). Toplam tekli doymamış yağ asitlerinde 18:1 *n*-9'dan sonra en fazla bulunan yağ asidi 16:1 *n*-7 (palmitoleik asit)'dir. Palmitoleik asitin en yüksek değeri %3,80±0,08 ile kontrol grubu, en düşük değeri ise %1,62±0,06 ile 70 gün açlık uygulanan grupta bulunmuştur (Çizelge 4.3). Toplam MUFA miktarının %35,96±0,18 (açlık periyodundan sonra 15 günlük yemleme periyoduna alınan balıklar) ile %28,57±0,00 (70 gün açlık uygulanan grup) aralığında değişim gösterdiği saptanmıştır. Gruplar arasında MUFA bakımından farklılığın istatistiki açıdan önemli olduğu görülmüştür ($P<0,05$) (Çizelge 4.3).

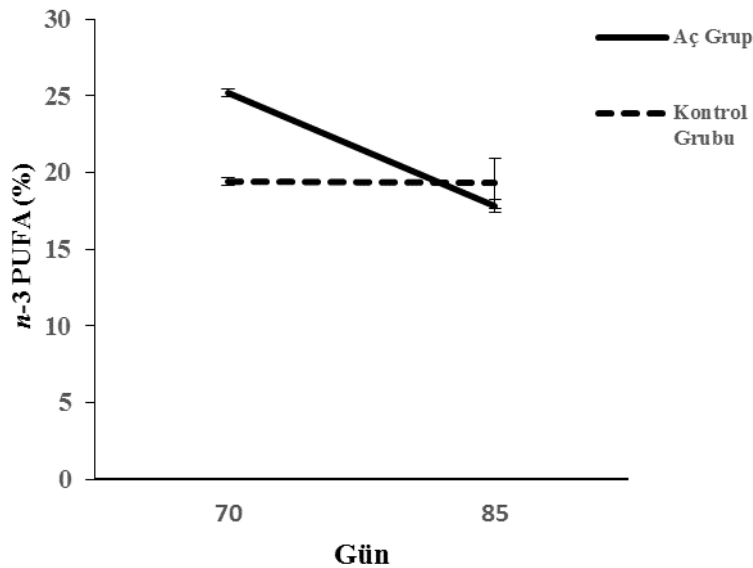
Çizelge 4.3. Deneme gruplarının MUFA kompozisyonu (Toplam yağ asitlerinin %'si)

Yağ Asidi	70.Gün		85.Gün	
	Kontrol	Aç	Kontrol	Aç *
16:1 <i>n</i> -7	3,8±0,1 ^a	1,6±0,1 ^c	3,5±0,2 ^{ab}	3,3±0,0 ^b
18:1 <i>n</i> -9	26,7±0,0 ^c	22,3±0,0 ^d	28,9±0,9 ^b	31,2±0,2 ^a
Σ MUFA	31,7±0,1^c	28,6±0,0^d	33,8±1,1^b	35,9±0,2^a

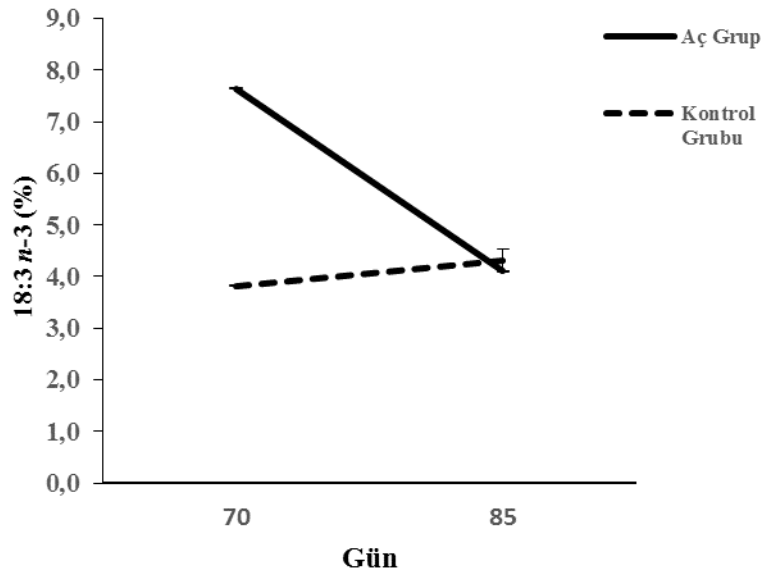
$\bar{X} \pm S_x$ =Ortalama±Ortalamanın Standart Sapması, n=3. Farklı harfler birbirinden farklı olan grupları göstermektedir, $p < 0,05$. *: 70 günlük açlık periyodundan sonra 15 gün boyunca *ad libitum* beslenen balıklar

4.2.3. *n*-3 çoklu doymamış yağ asitleri

Şekil 4.2'de görüldüğü üzere toplam *n*-3 PUFA miktarının en yüksek değeri %25,19±0,25 ile 70 gün açlık uygulanan grupta bulunurken en düşük değer %17,84±0,43 ile açlık periyodundan sonra 15 günlük yemleme periyoduna alınan balıklarda belirlenmiştir. İstatistiksel analizler neticesinde açlık uygulanan grubun diğer gruplar ile arasındaki farkın önemli olduğu anlaşılmıştır ($P < 0,05$).

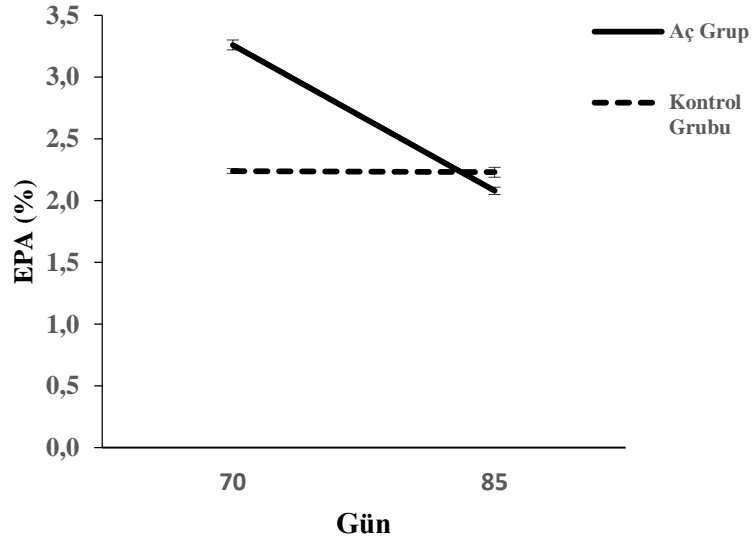
**Şekil 4.2.** Deneme gruplarının toplam *n*-3 PUFA değerleri (%)

Linolenik asitin (18:3 *n*-3) en yüksek değeri %7,64±0,01 ile 70 gün açlık uygulanan grupta belirlenirken en düşük değer %3,82±0,02 ile kontrol grubunda bulunmuştur (Şekil 4.3). Bu yağ asidi açlık periyodundan sonra 15 günlük yemleme periyoduna alınan balıklarda %4,10±0,02 olarak tespit edilmiştir. Açlık uygulanan grubun istatistiki açıdan kontrol grubu ile arasındaki farkın önemli olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$).



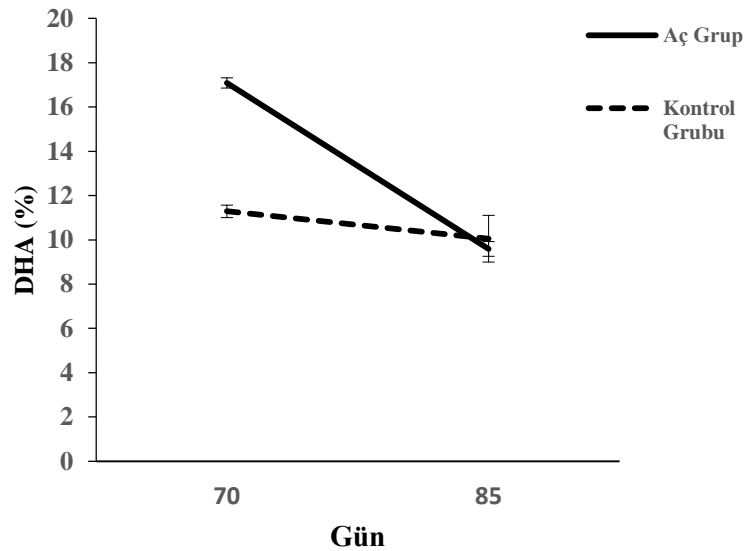
Şekil 4.3. Deneme gruplarının 18:3 *n*-3 değerleri (%)

Eikosapentaenoik asitin (EPA; 20:5 *n*-3) gruplar arasındaki en yüksek değeri %3,26±0,04 ile 70 gün açlık uygulanan grupta bulunurken en düşük değer %2,08±0,03 ile açlık periyodundan sonra 15 günlük yemleme periyoduna alınan balıklarda belirlenmiştir. 70 ve 85 gün sonunda kontrol grubu değerleri sırasıyla %2,24±0,02 ve %2,23±0,04 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.4). İstatistiksel analizlerin sonucunda açlık uygulanan grubun 70 ve 85 gün sonundaki değerleri ile kontrol grubu değerleri arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P<0,05$).



Şekil 4.4. Deneme gruplarının EPA değerleri (%)

Dokosaheksaenoik asitin (DHA; 22:6 *n*-3) en yüksek değeri %17,09±0,23 ile 70 gün açlık uygulanan grupta bulunurken en düşük değer %9,59±0,33 ile açlık periyodundan sonra 15 günlük yemleme periyoduna alınan balıklarda belirlenmiştir. 70 ve 85. günün sonunda belirlenen kontrol grubu değerleri sırasıyla %11,29±0,28, %10,05±1,05 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.5). İstatistiksel analizler neticesinde 70 günlük açlık uygulanan grup ile kontrol grubu arasındaki farkın önemli olduğu saptanmıştır ($P < 0,05$).



Şekil 4.5. Deneme gruplarının DHA değerleri (%)

4.2.4. *n*-6 çoklu doymamış yağ asitleri

Toplam *n*-6 çoklu doymamış yağ asitleri (*n*-6 PUFA) sonuçları incelendiğinde en yüksek değer %17,36±0,32 ile 85. günün sonunda belirlenen kontrol grubu balıklarda belirlenmiştir. Bu grubu sırasıyla açlık periyodundan sonra 15 günlük yemleme periyoduna alınan balıklar, 70. gün kontrol grubu ve 70. gün açlık uygulanan grup (sırasıyla, %16,30±0,01, %15,76±0,06, %11,62±0,22) takip etmiştir (Çizelge 4.4). İstatistiksel analizler neticesinde gruplar arasındaki farkın önemli olduğu bulunmuştur (P<0,05).

n-6 PUFA'larda baskın yağ asidi olan linoleik asit (18:2 *n*-6) en yüksek ve en düşük değerleri sırasıyla 85. gün belirlenen kontrol grubu (%14,46±0,41) ve 70 gün açlık uygulanan grupta (%3,58±0,08) bulunmuştur (Çizelge 4.4). Gruplar arasındaki fark istatistiki açıdan önemli çıkmıştır (P<0,05).

Araşidonik asitin (20:4 *n*-6) en yüksek değeri %6,95±0,06 ile 70 gün açlık uygulanan grupta en düşük değeri ise %1,77±0,02 ile açlık periyodundan sonra 15 günlük yemleme periyoduna alınan balıklarda belirlenmiştir. 70 ve 85. gün sonunda gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (P<0,05).

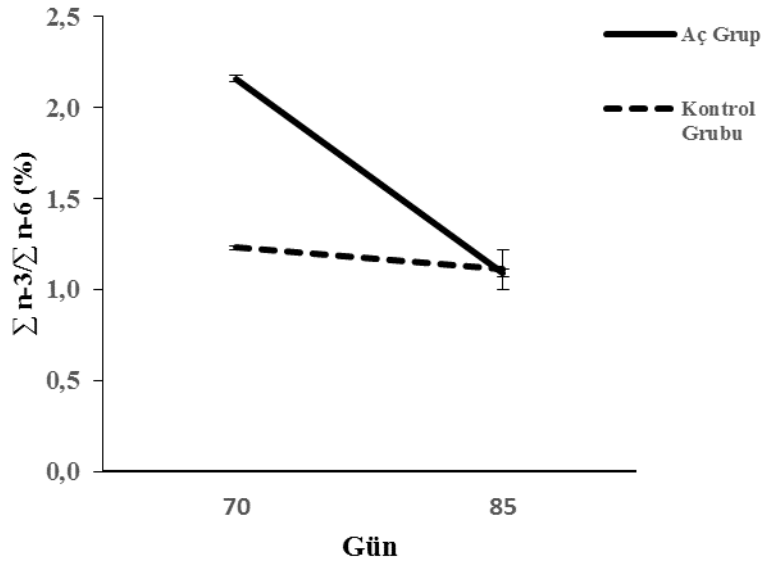
Çizelge 4.4. Deneme gruplarının *n*-6 PUFA kompozisyonu (Toplam yağ asitlerinin %'si)

Yağ Asidi	70.Gün		85.Gün	
	Kontrol	Aç	Kontrol	Aç *
18:2 <i>n</i> -6	12,3±0,0 ^c	3,6±0,1 ^d	14,5±0,4 ^a	13,5±0,0 ^b
18:3 <i>n</i> -6	0,1±0,0 ^b	0,4±0,1 ^a	0,2±0,0 ^b	0,2±0,0 ^b
20:3 <i>n</i> -6	1,2±0,0 ^a	0,7±0,0 ^c	0,8±0,0 ^b	0,8±0,0 ^b
20:4 <i>n</i> -6	2,0±0,0 ^b	6,9±0,1 ^a	1,9±0,1 ^c	1,8±0,0 ^d
∑ <i>n</i> -6	15,8±0,1 ^c	11,6±0,2 ^d	17,4±0,3 ^a	16,3±0,0 ^b

$X \pm S_x$ =Ortalama±Ortalamanın Standart Sapması, n=3. Farklı harfler birbirinden farklı olan grupları göstermektedir, p<0,05. *: 70 günlük açlık periyodundan sonra 15 gün boyunca *ad libitum* beslenen balıklar.

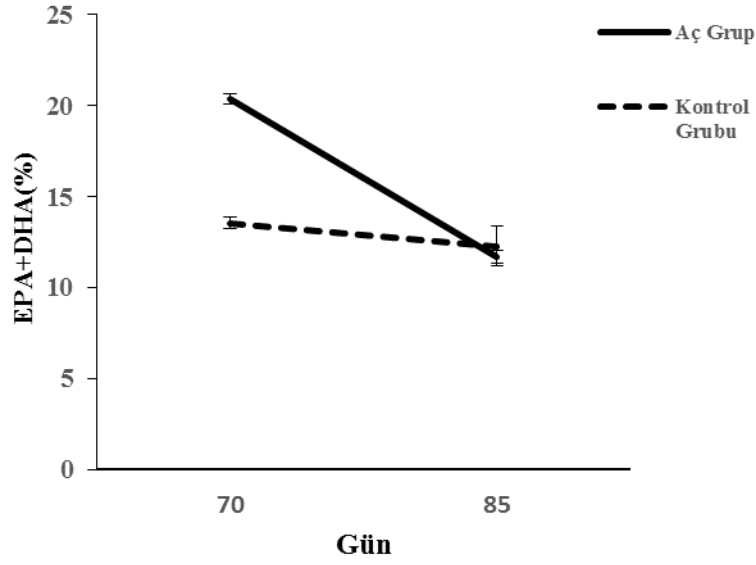
4.2.5. $n-3/n-6$ PUFA ve EPA+DHA sonuçları

$n-3/n-6$ PUFA oranı en yüksek $2,16 \pm 0,02$ değeri ile 70 gün açlık uygulanan grupta bulunmuştur. 70 ve 85. gün sonunda belirlenen kontrol grubu değerleri sırasıyla $1,23 \pm 0,01$ ve $1,11 \pm 0,11$ bulunurken açlık periyodundan sonra 15 günlük yemleme periyoduna alınan balıklarda $1,09 \pm 0,02$ olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.6). İstatistiksel analizler neticesinde 70 gün açlık uygulanan grup ile kontrol grubu arasındaki farkın önemli olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$).



Şekil 4.6. Deneme gruplarının $n-3/n-6$ PUFA değerleri (%)

EPA+DHA sonuçları incelendiğinde en yüksek değer $20,36 \pm 0,27$ ile 70 gün açlık uygulanan grupta belirlenirken 70 ve 85. günün sonunda belirlenen kontrol grubu balıkların değerleri sırasıyla $13,54 \pm 0,31$, $12,28 \pm 1,09$ ve açlık periyodundan sonra 15 günlük yemleme periyoduna alınan balıklarda $11,68 \pm 0,36$ olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.7). İstatistiksel analizler sonucunda 70 gün açlık uygulanan grup ile kontrol grubu arasındaki farkın önemli olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$).

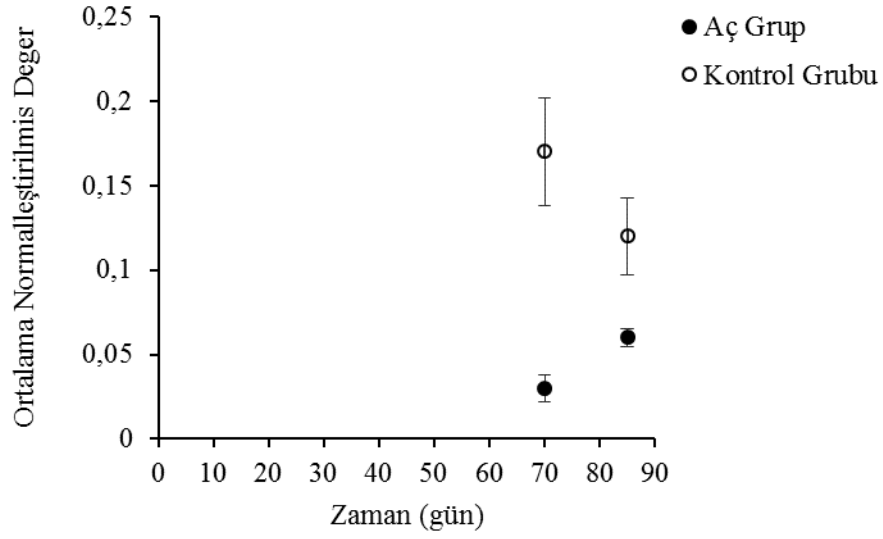


Şekil 4.7. Deneme gruplarının EPA+DHA (%)

4.3. Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları

4.3.1. Çok uzun zincirli yağ asit elongasyon 5 gen sonuçları

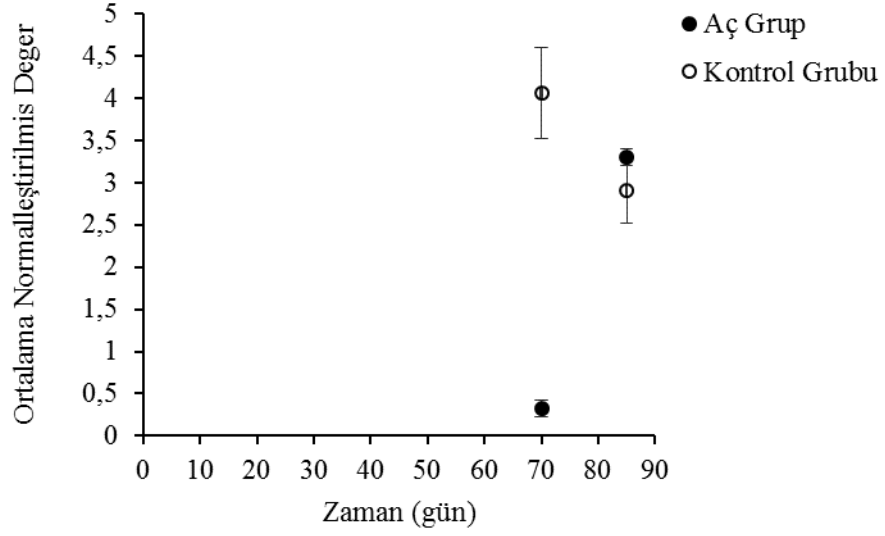
Çok uzun zincirli yağ asit elongasyon 5 (*elovl5*) gen ekspresyonu, gruplar arasında karşılaştırıldığında; en yüksek değer 0,16 ile kontrol grubu (yağ asitlerinden MUFA baskın) balıklarda, en düşük değer ise 0,03 ile 70 gün açlık uygulanan grupta (yağ asitlerinden *n*-3 PUFA baskın) belirlenmiştir. Ayrıca açlık periyodundan sonra 15 günlük yemleme periyoduna alınan balıkların (yağ asitlerinden DHA baskın) değeri ise 0,06 olarak bulunmuştur (Şekil 4.8). *elovl5* geninin ekspresyonu 70 günlük açlık periyodu sonunda 5,3 kat azaldığı belirlenmiştir. Açlık uygulanan grubun 15 günlük besleme döneminin ardından dramatik bir düşüş gösteren *elovl5* gen ekspresyonu normal değerlere dönebilmiştir.



Şekil 4.8. *elovl5* geninin deneme grubu balıklarının karaciğerindeki ekspresyon miktarı

4.3.2. Yağ asit desaturasyon 2 gen sonuçları

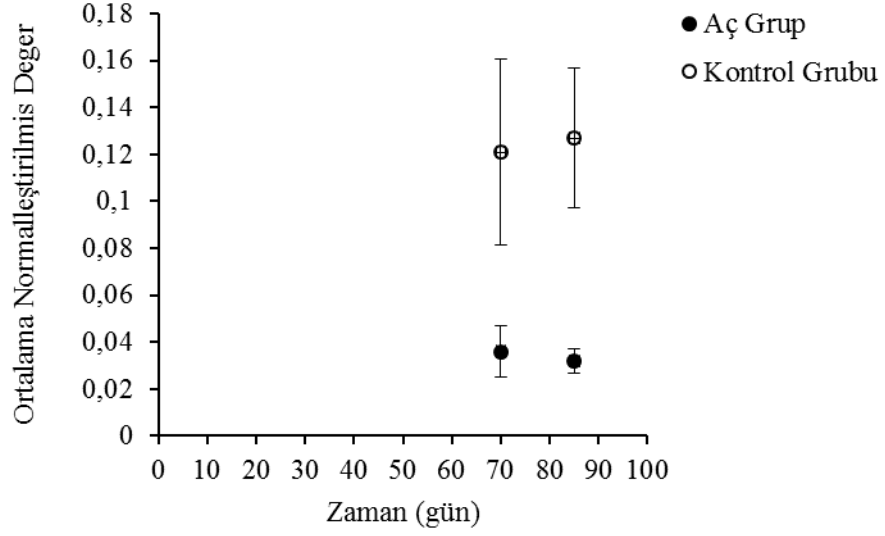
En yüksek yağ asit desaturasyon 2 (*fads2*) değeri 4,06 ile kontrol grubu (yağ asitlerinden MUFA baskın) balıklarda en düşük değer ise 0,32 ile 70 gün açlık uygulanan grupta (yağ asitlerinden *n*-3 PUFA baskın) belirlenmiştir. Ayrıca açlık periyodundan sonra 15 günlük yemleme periyoduna alınan balıkların (yağ asitlerinden DHA baskın) değeri ise 3,30 ve 85. günün sonunda kontrol grubu balıkların (yağ asitlerinden linolenik asit baskın) değeri 2,91 olarak bulunmuştur (Şekil 4.9). *fads2* geninin ekspresyonu 70 günlük açlık periyodu sonunda 12,6 kat azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.9. *fads2* geninin deneme grubu balıklarının karaciğerindeki ekspresyon miktarı

4.3.3. Çok uzun zincirli Açıl-Koenzim A Dehidrogenaz gen sonuçları

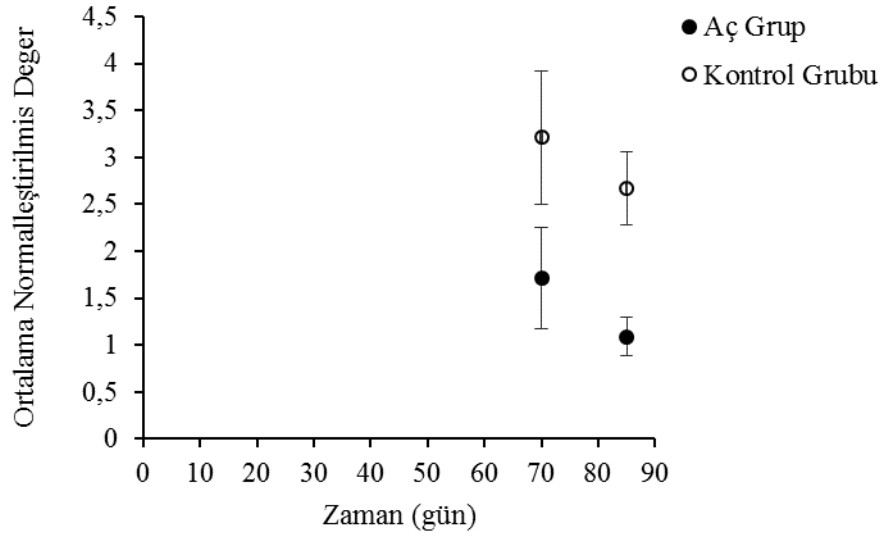
Çok uzun zincirli Açıl-Koenzim Dehidrogenaz (*acadvl*) gen ekspresyonu 0,12 ile en yüksek değer kontrol grubu (yağ asitlerinden MUFA baskın) balıklarda bulunmuştur. 70 gün açlık uygulanan grup (yağ asitlerinden *n*-3 PUFA baskın)'un 15 günlük yemleme periyodu sonunda balıkların gen ekspresyon değerleri birbirine yakın (0,03) bulunmuştur (Şekil 4.10). *acadvl* geninin ekspresyonu 70 günlük açlık periyodu sonunda 4 kat azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.10. *acadvl* geninin deneme grubu balıklarının karaciğerindeki ekspresyon miktarı

4.3.4. Karnitin Palmitoltransferaz 1 β gen sonuçları

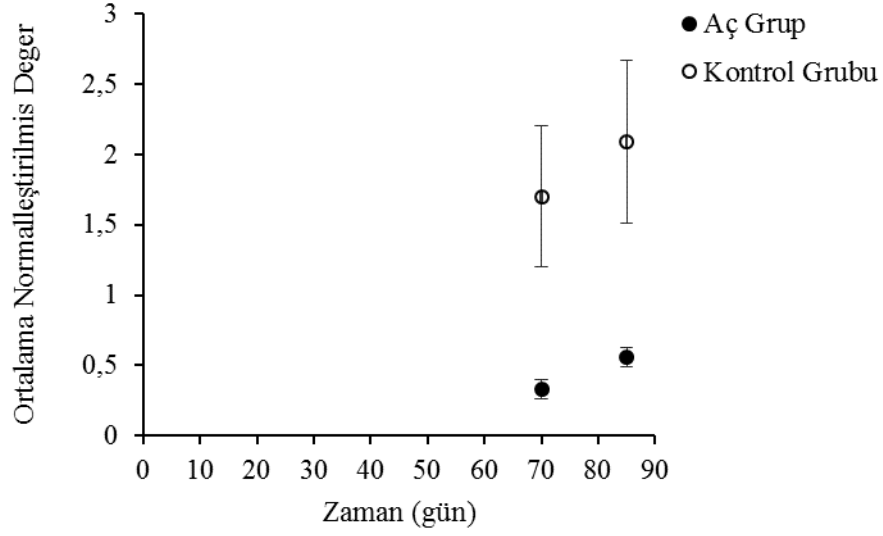
Karnitin palmitoltransferaz 1 β (*cpt1- β*) gen ekspresyonları en yüksek 3,21 kontrol grubu (yağ asitlerinden MUFA baskın) balıklarda belirlenmiştir. En düşük değer ise 1,09 ile açlık periyodundan sonra 15 günlük yemleme periyoduna alınan balıklarda (yağ asitlerinden DHA baskın) belirlenmiştir. Açlık *cpt1- β* ekspresyonunu 1,9 kat düşürmüştür. Kontrol grubu *cpt1- β* ekspresyon değerleri öteki gruplardan önemli derecede fazla bulunmuştur (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. *cpt1-β* geninin deneme grubu balıklarının karaciğerindeki ekspresyon miktarı

4.3.5. Peroksizomal Açıl-Koenzim Oksidaz 1 gen sonuçları

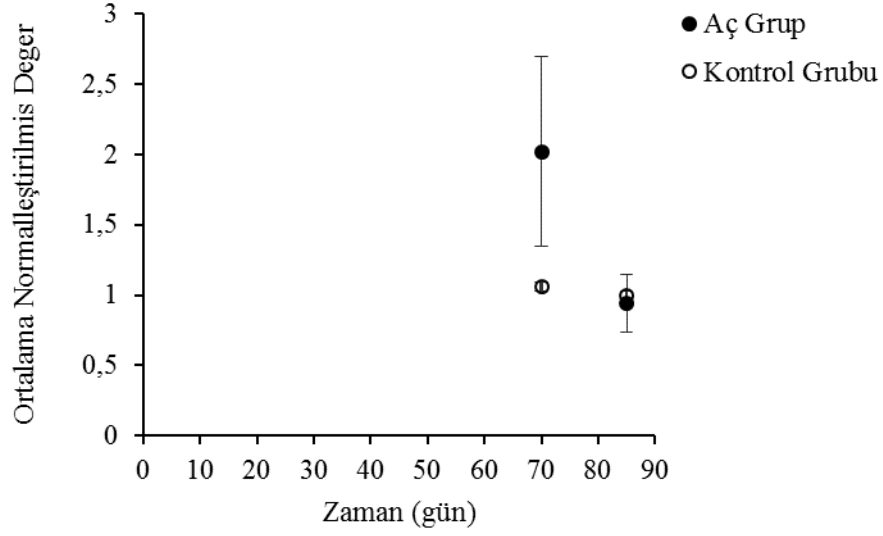
Deneme gruplarındaki peroksizomal Açıl-Koenzim oksidaz 1 (*acox1*) gen ekspresyon değerleri incelendiğinde, en yüksek değer 2,09 ile 85. günün sonunda kontrol grubu balıkların (yağ asitlerinden linolenik asit baskın) olduğu ve en düşük değerin ise 0,33 ile 70 gün açlık uygulanan grupta (yağ asitlerinden *n*-3 PUFA baskın) olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.12). Kontrol grubu (yağ asitlerinden MUFA baskın) balıklarda ve açlık periyodundan sonra 15 günlük yemleme periyoduna alınan balıkların (yağ asitlerinden DHA baskın) ortalama değeri ise sırasıyla 1,07 ve 0,56 olarak bulunmuştur. *acox1* geninin ekspresyonu 70 günlük açlık periyodu sonunda 3,2 kat azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.12. *acox1* geninin deneme grubu balıklarının karaciğerindeki ekspresyon miktarı

4.3.6. Peroksizom proliferatör-aktivite reseptör α gen sonuçları

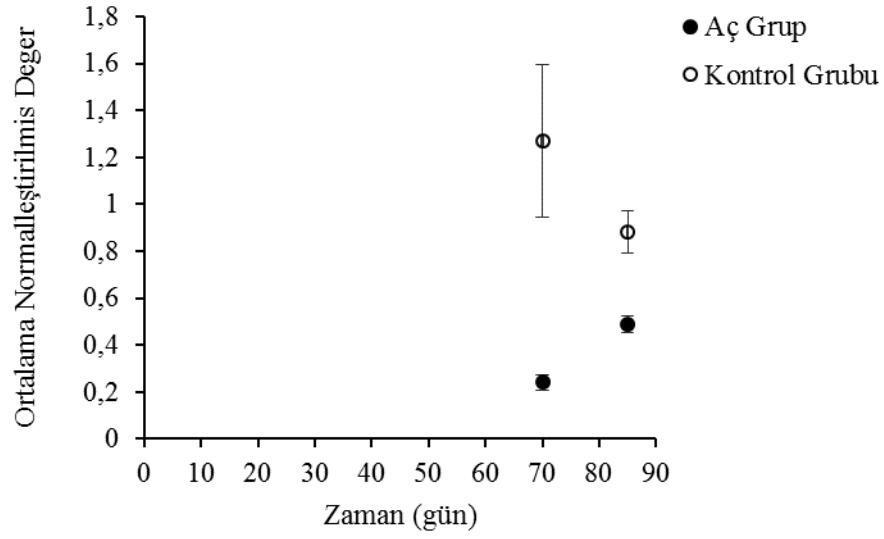
Grupların peroksizom proliferatör-aktivite reseptör α (*ppar- α*) gen ekspresyonları karşılaştırıldığında en yüksek değer 2,02 ile 70 gün açlık uygulanan grupta (yağ asitlerinden *n*-3 PUFA baskın), en düşük değer ise 0,94 ile açlık periyodundan sonra 15 günlük yemleme periyoduna alınan balıklarda (yağ asitlerinden DHA baskın) bulunmuştur (Şekil 4.13). Diğer tüm genlerin aksine *ppar- α* geninin ekspresyonu 70 günlük açlık periyodu sonunda 1,9 kat arttığı belirlenmiştir.



Şekil 4.13. *ppar-a* geninin deneme grubu balıklarının karaciğerindeki ekspresyon miktarı

4.3.7. Beyin tipi yağ asidi bağlayıcı protein gen sonuçları

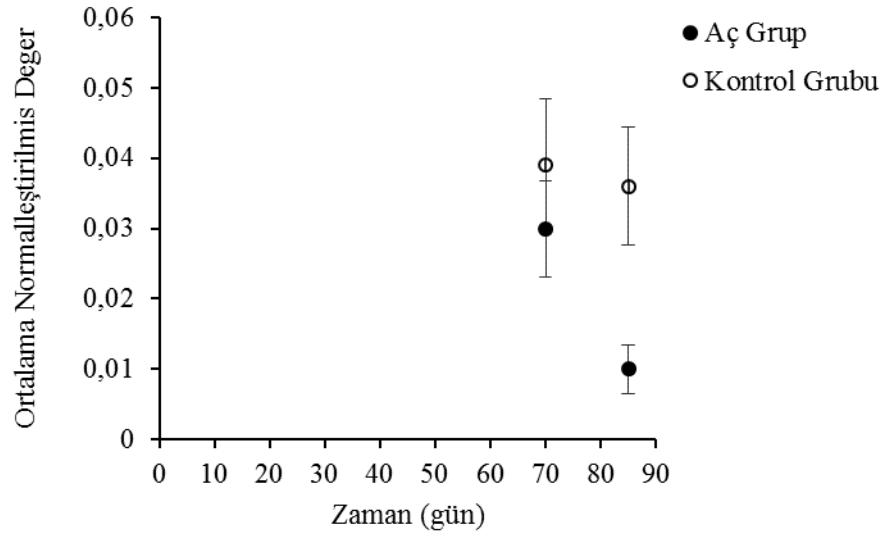
Beyin tipi yağ asidi bağlayıcı protein (*fabp7a*) geninin gruplar arasında en yüksek değeri 1,27 ile kontrol grubu (yağ asitlerinden MUFA baskın) balıklarda en düşük değer ise 0,24 ile 70 gün açlık uygulanan grupta (yağ asitlerinden *n*-3 PUFA baskın) belirlenmiştir (Şekil 4.14). *fabp7a* geninin ekspresyonu 70 günlük açlık periyodu sonunda 5,2 kat azaldığı belirlenmiştir. Açlık periyodundan sonra 15 günlük yemleme periyoduna alınan balıkların *fabp7a* gen ekspresyonu artış göstermesine rağmen normal değerlerine ulaşamamıştır.



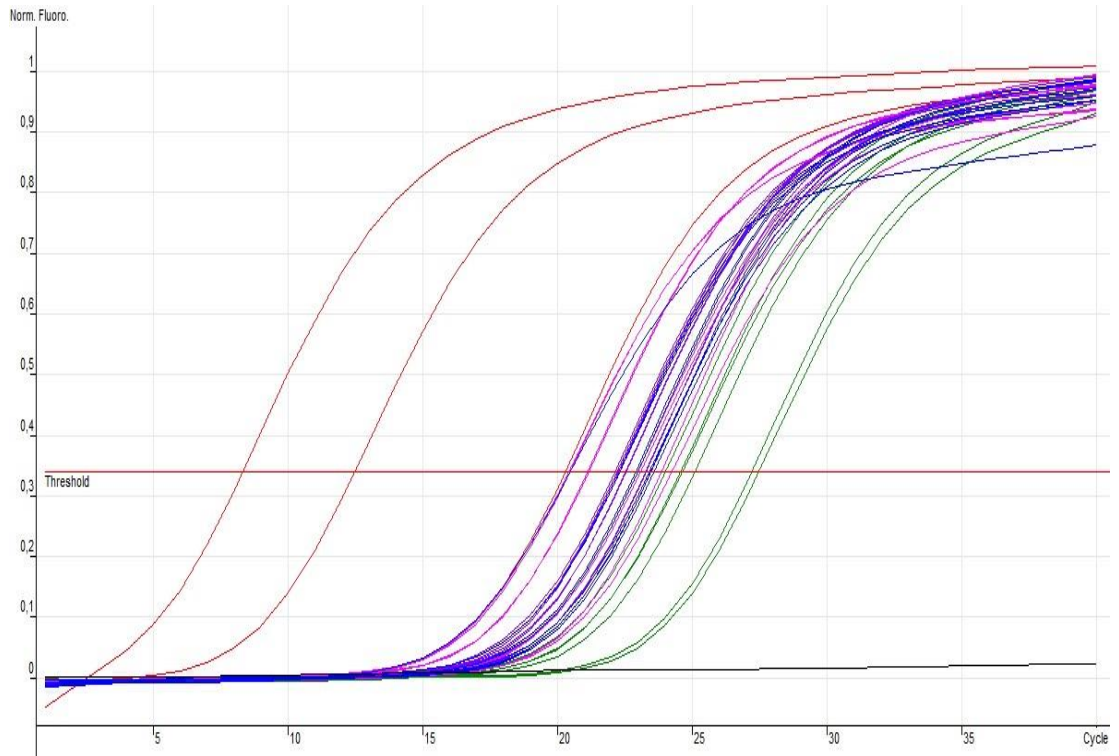
Şekil 4.14. *fabp7a* geninin deneme grubu balıklarının karaciğerindeki ekspresyon miktarı

4.3.8. Karaciğer tipi yağ asidi bağlayıcı protein gen sonuçları

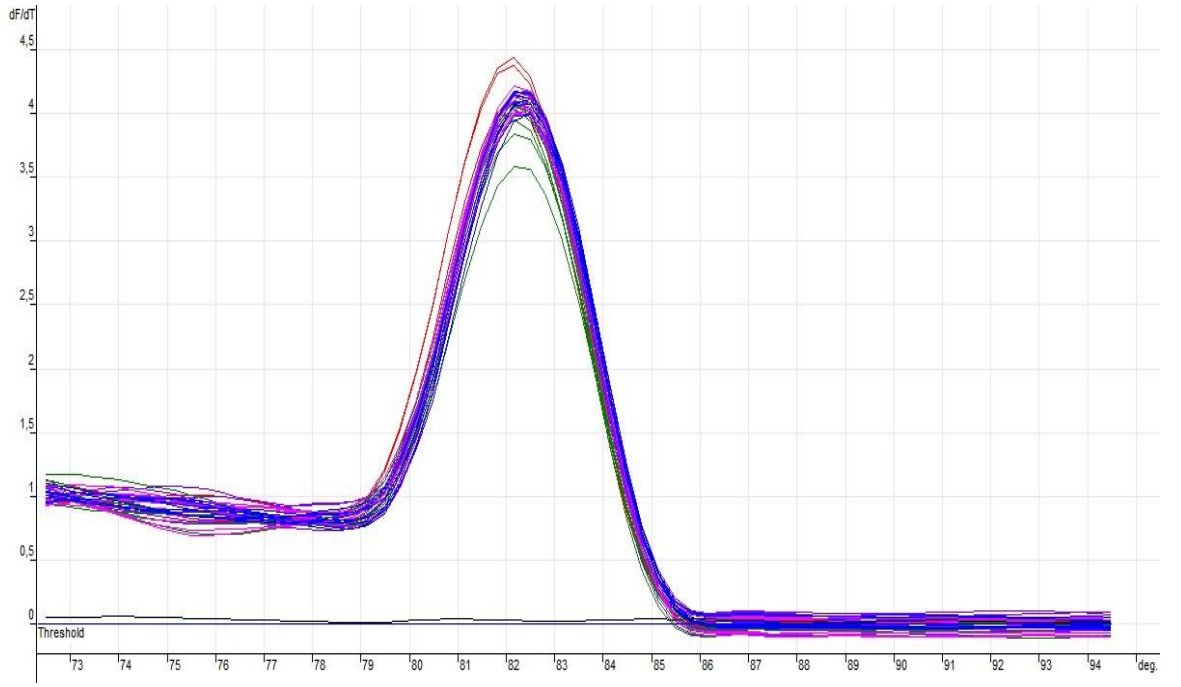
Karaciğer tipi yağ asidi bağlayıcı protein (*fabp1a*) gen ekspresyon değerleri incelendiğinde, en yüksek değer 0,039 ile kontrol grubu (yağ asitlerinden MUFA baskın) balıklarda olduğu ve en düşük değer ise 0,01 ile açlık periyodundan sonra 15 günlük yemleme periyoduna alınan balıklarda (yağ asitlerinden DHA baskın) belirlenmiştir (Şekil 4.15). *fabp1a* geninin ekspresyonu 70 günlük açlık periyodu sonunda 1,2 kat azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.15. *fabp1a* geninin deneme grubu balıklarının karaciğerindeki ekspresyon miktarı



Şekil 4.16. Araştırmada kullanılan *acox1* gen örneğinin gerçek zamanlı PCR ile elde edilen amplifikasyon görüntüsü.



Şekil 4.17. Araştırmada kullanılan *acox1* gen örneğinin gerçek zamanlı PCR ile elde edilen melting sıcaklığının görüntüsü.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu araştırmada zebra balıkları (*Danio rerio*) uzun süreli (70 gün) açlığa maruz bırakılmış ve ardından açlığa maruz bırakılan balıklar 15 gün boyunca yemleme yapılmıştır. Bu sırada kontrol grubu balıklarda yemlenmeye devam edilmiştir. 70 ve 85. gün sonunda örnekleme yapılarak balıkların tüm vücut yağ asidi kompozisyonu belirlenmiştir ve balıkların karaciğer örneklerinden de yağ asidi sentezinde görev alan sekiz genin ekspresyon değerleri araştırılmıştır. Böylece uzun süreli açlığın zebra balığı yağ asidi metabolizmasına moleküler etkilerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar bu bölümde tartışılmaya çalışılmıştır.

5.1. Büyüme ve Yaşam Gücü İle İlgili Tartışma

Canlılar beslenmeyle kazandıkları enerjiyi yaşamlarını ve yaşamsal metabolizma faaliyetlerini sürdürebilmek için kullanırlar. Bu nedenle tüm canlılar için beslenme önemlidir. Balıklar beslenmeyle kazanılan enerjiyi yaşamsal metabolizma faaliyetlerine kullandıktan sonra geri kalan enerjiyi doku kazanımında kullanırlar. Genel anlamda büyüme, ağırlık ve boy artışı olarak bilinse de balıklarda büyüme; ağırlık artışıdır yani balık dokularındaki enerji rezervlerinin artmasıdır (Halver and Hardy 2002; Hoşsu vd 2003). Yaptığımız çalışmada başlangıçta kontrol grubu balıkların ortalama ağırlıkları 0,78 gr, açlık uygulanan balıkların ortalama ağırlıkları 1,13 gr olarak tespit edilmiştir. Bu değerler 70. günün sonunda kontrol grubunda ortalama 1,59 gr olurken aç grupta 0,63 gr olarak tespit edilmiştir. Açlık uygulanan grubun ağırlığındaki bu azalmanın başlıca nedenlerinden birinin depo enerjilerini hayatta kalma ve rutin metabolizmaları için kullandıkları düşünülmektedir. Birçok araştırmacı balıkların açlığa verdiği en belirgin ve en sık sonuçlanan tepkisinin vücut ağırlığındaki azalma olduğunu belirtmişlerdir (Kristoffersson and Broberg 1971; Moon 1983; Reinitz 1983; Hung *et al.* 1997; Einen *et al.* 1998; Regost *et al.* 2001; Hervant *et al.* 2001; Guderley *et al.* 2003; Comoglio *et al.* 2004; Luo *et al.* 2009). Açlık periyodundan sonra 15 günlük yemleme periyoduna alınan balıkların ağırlıkları ortalama 1,46 gr olarak kontrol grubunun değerlerine ulaşmıştır. Yaşam gücü oranları ise kontrol grubu balıklarda ortalama %91

iken açlık uygulanan balıklarda bu oran %55 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak uzun süreli açlık beklenildiği üzere zebra balıklarında yaşam gücünün azalmasına ve ağırlık kaybına neden olmuştur.

5.2. Yağ Asidi Profillerine İlişkin Tartışma

Açlık süresince balıklarda tüketilen ilk rezervler glikojen, lipitler ve enerji kaynağı olarak kullanılan yapı lipitleri trigliseritlerdir (Carefoot *et al.* 1993). Doymuş ve doymamış yağ asitleri açlık sürecinde balıkların genellikle kullandıkları ilk yağ asitleri grupları olup canlının enerji ihtiyacı yanı sıra hücre yapısı ve geçirgenliği için önemlidir (Durazo-Beltrán *et al.* 2004). Bu sebeple, bazı spesifik yağ asitlerinin açlık süresi ile ters orantılı olarak arttığı belirlenmiştir (Sargent *et al.* 2002).

Açlık esnasında ve beslenen balıkların dokularındaki, kaslarındaki ve karaciğerlerindeki yağ miktarı içeriğinin karşılaştırılması ile ilgili bilgiler şöyledir: Silva *et al.* (1997) aç bırakılan ve beslenen *Oreochromis mossambicus* ve *Oreochromis niloticus*'un yağ asitleri oranını karşılaştırdıklarında iki balığın dokularında arttığını fakat karaciğerde açlıkla beraber düştüğünü bildirmişler. Tidwell *et al.* (1992) ise aç bırakılan balıkların beslenen balıklara göre kaslardaki ve karaciğerdeki yağ asitleri miktarını daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Diğer yandan, Luo *et al.* (2009), kanal yayın (*Ictalurus punctatus*) balığının açlıkla birlikte karaciğerinde yağ ve karbonhidrat miktarında azalma görülürken kaslarında yağ miktarının arttığını bildirmişlerdir. Ritar *et al.* (2003) açlık çalışmaları enerji rezervleri gibi en kritik besin ve artan gıda yoksunluğu karşısında katabolizma veya korunumu belirlemek için yardımcı olabileceğini ve aynı zamanda balık fizyolojisini besin metabolizmasının daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacağını bildirmişlerdir.

5.1.1. Doymuş yağ asitlerinin profillerine ilişkin tartışma

Yetmiş günlük açlık süresinin SFA miktarını %1,77 oranında arttırdığı belirlenmiştir. 85. günün sonunda ise kontrol grubu SFA miktarının açlık uygulanan gruba göre daha az olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde Sargent *et al.* (1999) açlık ile kaslardaki SFA miktarında artış olduğunu bildirmişlerdir. SFA'nin aç bırakılan tatlısu levreğinde (*Perca fluviatilis*) enerji substratı olarak kullanılmadığı (Abi Ayad *et al.* 2000) ve aç bırakılan sudak balığının (*Sander lucioperca*) SFA katabolizmasının MUFA'ya göre daha düşük olduğunu belirlenmiştir (Abi Ayad *et al.* 2004). Jezierska *et al.* (2006) gökkuşuğu alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) MUFA yüzdesinin açlık ile azaldığını ve bu düşüşün SFA'da önemli bir artışa yol açtığını belirtmişlerdir. Balıklarda büyüme sırasında metabolik enerjinin kaynağı olarak kullanılan 16:0 (Henderson *et al.* 1987) tüm gruplarda dominant SFA olarak belirlenmiştir. Daha önce yapılan bir çok çalışmada da balıklarda toplam SFA içerisinde 16:0'ın baskın olduğu bildirilmektedir (Ashton *et al.* 1993; Czesny and Dobrowski 1998; Einen *et al.* 1998; Sargent *et al.* 1999; Aras vd 2009; Luo *et al.* 2009; Sirkecioğlu vd 2010; Mohamed and Sabahi 2011). 16:0 miktarı 70 günlük açlık süresinin sonunda %15,59 oranında azalmıştır. 85. günün sonunda kontrol grubu balıklarda 16:0 miktarının 15 günlük yemleme periyoduna alınan aç balıklar ile eşit olduğu belirlenmiştir. Doymuş yağ asitleri insan ve hayvan vücudunda sentezlenebilmelerinden ve kolay oksidasyona uğramamalarından dolayı savunma sisteminde önemli görevler üstlendikleri bilinmektedir (Hazel 1984; Stryer 1995; Turchini *et al.* 2006). Bu sebeple açlık uygulanan balıklarda SFA'nın vücudun savunmasında ve yaşama fonksiyonlarının devamı için koruma altına alındığı sonucuna varılmıştır.

5.1.2. Tekli doymamış yağ asitleri profillerine ilişkin tartışma

Çalışma sonunda 70 günlük açlık süresinin zebra balığında toplam MUFA miktarını %3,15 oranında azalttığı belirlenmiştir. 85. günün sonunda kontrol grubu balıklarında MUFA miktarının açlık periyodundan sonra 15 gün beslenen balıklar ile karşılaştırıldığında daha az olduğu belirlenmiştir. MUFA'ların aç bırakılan balık

türlerinde başlıca enerji kaynağı olarak kullanıldığı bilinmektedir. Aç bırakılan gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), Avrupa levreği (*Perca fluviatilis*) ve kanal yayın balığı (*Ictalurus punctatus*) gibi türlerde daha önce belirlendiği üzere MUFA'lar başlıca enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır (Abi-Ayad *et al.* 2000; Gunasekera *et al.* 2001; Jezierska *et al.* 2006). Luo *et al.* (2009) kanal yayın balığının uzun süreli açlıkla kas ve karaciğer dokularındaki toplam MUFA değerinde azalma olduğunu belirlemişler ve yağların karaciğerde enerji kaynağı olarak çok önemli seviyelerde katabolize edildikleri sonucuna varmışlardır. Dolayısıyla çalışmamızda belirlenen balıklarda MUFA'nın enerji kaynağı olarak kullanıldığı sonucu literatür verileri ile paralellik göstermektedir. Bazı çalışmalarda açlık boyunca kaslarda ilk katabolizma edilen MUFA'lar oleik asit (18:1 *n*-9) ve palmitoleik asit (16:1 *n*-7) olarak belirlenirken (Murata and Higashi 1980; Takeuchi and Watanabe 1982; Satoh *et al.* 1984; Zamal and Ollevier 1995; Abi-Ayad *et al.* 2000; Luo *et al.* 2009), Mourente *et al.* (1999) sinarit (*Dentex dentex*) larvalarının açlık boyunca 18:1 *n*-9'u koruma altına aldığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da toplam MUFA'nın içerisinde baskın bulunan 18:1 *n*-9 ve 16:1 *n*-7'nin 70 günlük açlık periyodu neticesinde sırasıyla %22,35 ve %1,62 oranında azaldığı ve 85. gün sonunda önemli miktarlarda artarak normal değerlerine ulaştıkları tespit edilmiştir.

5.1.3. *n*-3 çoklu doymamış yağ asidi profillerine ilişkin tartışma

Çalışma sonunda 70 günlük açlık süresinin zebra balığında toplam *n*-3 PUFA miktarını %5,79 oranında artırdığı belirlenmiştir. Açlık periyodundan sonra 15 gün beslenen balıklar sonunda ise artan *n*-3 PUFA miktarının normal değerlerine ulaştığı belirlenmiştir. Bütün omurgalılarda olduğu gibi balıklar da normal büyüme, gelişme ve üremeleri için PUFA'lardan üç yağ asidine ihtiyaç duymaktadırlar. Bu yağ asitleri, *n*-3 HUFA'lardan EPA (20:5 *n*-3) ve DHA (22:6 *n*-3) ve *n*-6 HUFA'lardan AA (20:4 *n*-6)'dır (Sargent *et al.* 1999, 2002; Almada-Pgan *et al.* 2007; Bessonarat *et al.* 1999; Piedecausa *et al.* 2007). Daha önce yapılan çalışmalarda kanal yayın balığı (*Ictalurus punctatus*), çipura (*Sparus aurata*), tatlısu levreği (*Perca fluviatilis*) ve Alp alabalığı (*Salvelinus alpinus*)'nda açlık ile DHA ve EPA'nın arttığı belirlenmiştir (Koven *et al.*

1989; Ringo *et al.* 1990; Tidwell *et al.* 1992; Ronnestad *et al.* 1994; Zamal ve Ollevier 1995; Abi-Ayad *et al.* 2000; Luo *et al.* 2009) fakat Ronnestad *et al.* (1995), Mourente *et al.* (1999), Abi-Ayad *et al.* (2004) Atlantik halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), sinarit (*Dentex dentex*)’te açlık boyunca DHA ve EPA’nın azaldığını belirlemişlerdir. Hendersorn and Tocher (1987) aç kalan balıkların MUFA’yı enerji için kullandıklarını ve *n-3* PUFA’ların biyolojik zarda fiziksel özellikleri için gerekli olduğunu *n-3* PUFA’ların korunma altına alındığını söylemişlerdir. PUFA’ların bazı organogenezislerde yapısal bileşenler olarak önemli bir rol oynadığı (Sargent 1995; Estevez *et al.* 1997; Ishizaki *et al.* 2001), eikosanoidler ve prostaglandinler için öncü olduğu (Bell *et al.* 1995) ve hatta erken larva öğrenme performansı gibi bazı davranış özelliklerini etkilediği bilinmektedir (Ishizaki *et al.* 2001). Dolayısıyla aç bırakılan zebra balıklarında *n-3* PUFA miktarında meydana gelen artışla fizyolojik ve metabolik olarak oldukça önemli rol oynadığı sonucuna ulaşılmıştır. Gunasekera *et al.* (2001) kısa süreli açlıktan sonra 15 gün beslenen cod (*Maccullochella macquarensis*) larvalarının *n-3* PUFA miktarında azalma olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızın sonucunda 15 günlük yemleme periyoduna alınan aç grup balıklarda DHA miktarı normal değerlerine ulaşırken EPA miktarı normal değerlere (kontrol grubu değeri) ulaşamamıştır. Genel olarak literatürdeki sonuçlarla paralellik gösteren çalışmamız zebra balığında *n-3* PUFA ve DHA miktarının uzun süreli açlıktan sonra yemleme neticesinde kontrol değerlerine döndüğünü, dolayısıyla açlığın negatif etkilerinin kısa sürede elemine edebildiğini göstermiştir.

5.1.4. *n-6* çoklu doymamış yağ asidi profillerine ilişkin tartışma

Yetmiş günlük açlık süresinin zebra balığında toplam *n-6* PUFA miktarını %4,14 oranında azalttığı belirlenmiştir. 85. gün sonunda *n-6* PUFA miktarının kontrol grubu balıklarda daha fazla olduğu belirlenmiştir. Abi-Ayad *et al.* (2000) ve Luo *et al.* (2009) kanal yayın balığı (*Ictalurus punctatus*) ve tatlısu levreği (*Perca fluviatilis*)’nde *n-6* PUFA’ların açlık boyunca enerji kaynağı olarak katabolize edildiğini, kanal yayın balığı (*Ictalurus punctatus*)’nda *n-6* PUFA’nın büyük bir miktarını oluşturan 18:2 *n-6*’nın ise enerji substratı olarak kullanılmadığını bildirilmişlerdir (Tidwell *et al.* 1992; Silva *et al.*

1997). Bizim çalışmamızda ise baskın yağ asidi olan 18:2 *n*-6'nın en düşük miktarı (%3,58) açlık uygulanan balıklarda belirlenmiştir. Literatür ile mevcut çalışma sonuçları arasındaki bu uyumsuzluğun bizim çalışmamızdaki açlık süresinin zebra balığı hayat döngüsüne göre çok uzun süreli olması ve bu süreç sonunda 18:2 *n*-6'nın da kullanılması ile açıklanmıştır. Benzer şekilde Murata and Higashi (1980) ve Takeuchi and Watanabe (1982) aç bırakılan sazanlarda (*Cyprinus carpio*) gerekli enerjilerini 18:2 *n*-6'dan sağladıklarından dolayı azaldığını bildirmişlerdir. Araştırma sonunda açlık ile 20:4 *n*-6'nın önemli miktarlarda artış gösterdiği belirlenmiştir. Silva *et al.* (1997) açlık boyunca kırmızı hibrit tilapyalarda (*Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis niloticus*) 20:5 *n*-3 ve 20:4 *n*-6 miktarlarının dişilerde arttığı ve bu iki yağ asidi biyolojik açıdan aktif moleküller olan eikosanoidler, tromboksanlar, lökotrienler ve prostaglandin öncüleri olduğundan balıklar tarafından korunduğu bildirilmiştir. 20:4 *n*-6'dan türetilen eikosanoidler balıklarda birçok fizyolojik fonksiyona sahip olduğu bilinmektedir (Mustafa and Srivastava 1989). Toplam *n*-6 PUFA'nın açlık uygulanan grupta azalmasının temel nedeni açlık uygulanan balıklarda dramatik biçimde azalan 18:2 *n*-6 miktarına bağlanmıştır: bu yağ asidi açlık uygulanan grupta kontrol grubuna nazaran yaklaşık 3,5 katlık bir azalma göstermiştir. Bütün bu azalmaların balıklara açlığa maruz kaldıklarında normal metabolik faaliyetlerinin devamı amacıyla gerekli enerjinin sağlanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Rio *et al.* (2006) ve Öçal (2013) açlığa maruz kalan balıklarda *n*-6 PUFA oranının azaldığını geri beslenmeyle bu oranın arttığını belirlemişlerdir. Çalışmamızda ise 70 gün sonunda açlık uygulanan grupta *n*-6 PUFA oranındaki dramatik azalmanın 15 günlük yemleme periyodundan sonra artış göstermesine rağmen kontrol grubu değerlerine ulaşamadığı tespit edilmiştir.

5.1.5. *n*-3/*n*-6 PUFA ve EPA+DHA profillerine ilişkin tartışma

n-3/*n*-6 PUFA oranı genellikle tatlı su balıklarında 0,5-3,8 iken deniz balıklarında 4,7-14,4 arasında değişmektedir (Hendersorn and Tocher 1987; Ackman *et al.* 2002). Luo *et al.* (2009) uzun süreli açlıkta kanal yayın balıklarının *n*-3/*n*-6 PUFA oranında artış olduğu tespit etmişlerdir. Silva *et al.* (1997) açlık boyunca kırmızı hibrit tilapyalarda (*Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis niloticus*) karaciğerinde *n*-3/*n*-6 PUFA

oranının arttığını fakat kaslarda azaldığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada 70 günlük açlık periyodunun zebra balığında $n-3/n-6$ PUFA miktarını %0,93 arttırdığı belirlenmiştir. Bu artışın açlık uygulanan grupta $n-3$ PUFA oranının yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir. 85. gün sonunda $n-3/n-6$ PUFA miktarı kontrol grubu ile açlık periyodundan sonra 15 gün beslenen balıklar ile karşılaştırıldığında fark olmadığı belirlenmiş ve açlık periyodundan sonra 15 gün beslenen balıklarda $n-3/n-6$ PUFA miktarının azalmanın $n-3$ PUFA miktarındaki azalmadan kaynaklandığı neticesine varılmıştır.

70 günlük açlık periyodunun zebra balığında EPA+DHA miktarını %6,82 artırdığı belirlenmiştir. Bu artışa açlık uygulanan gruptaki EPA ve DHA miktarındaki artışın sebep olduğu düşünülmektedir. Aynı şekilde açlık periyodundan sonra 15 gün beslenen balıklarda açlık ile EPA ve DHA miktarlarındaki azalmaya paralel olarak EPA+DHA miktarının kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir. Sonuçlarımıza ters olarak Rio *et al.* (2006) açlık sürecinde EPA+DHA'nın önemli düzeyde azaldığını ve visceral yağlardaki bu yağ asitlerinin daha sonra tüketildiğini bildirmişlerdir.

5.2. Gerçek Zamanlı PCR Sonuçlarına İlişkin Tartışma

Uzun süreli açlığın zebra balığı yağ asidi metabolizmasına moleküler etkilerini belirlemek için balıklarda yağ asidi metabolizmasında kritik rolleri olan 8 genin açlık ile ilişkileri aşağıda tartışılmaya çalışılmıştır. Genel olarak bu 8 genin ekspresyon miktarlarının *ppar-α* hariç aç bırakılan zebra balığının karaciğerinde önemli derecede azaldığı belirlenmiştir.

Onsekiz ve yirmi karbonlu PUFA'ların elongasyonunda görev alan *elovl5* geninin ekspresyonunun (Wang *et al.* 2008; Moon *et al.* 2009) 70 günlük açlık periyodu sonunda %81,25 azaldığı belirlenmiştir. 85. gün sonunda kontrol grubu *elovl5* ekspresyon miktarı ile açlık uygulanan grup arasında fark olmadığı belirlenmiştir. Balıklar 18:3 $n-3$ 'ü EPA ile DHA'ya ve linoleik asit (18:2 $n-6$)'i AA'ya dönüştürürler (Kanazawa *et al.* 1979; Sargent *et al.* 2002). 18:3 $n-3$ ve 18:2 $n-6$ balıklarında içerisinde

bulunduğu omurgalılar tarafından vücutta sentezlenemezler, dolayısıyla esansiyel yağ asitleri olarak adlandırılır. Bu esansiyel yağ asitlerinin desaturasyon ve elongasyonu alternatif zincirler vasıtasıyla HUFA'ya dönüştürülebilir. Bu iki üretim yağ asitlerinin elongasyonu ardından desaturasyon vasıtasıyla AA ve EPA'ya dönüşür (Sargent *et al.* 2002; Nakamura and Nara 2004). DHA, daha ileriki elongasyon ve desaturasyonla ve kısa zincirli tepkimelerle üretilir (Sprecher *et al.* 1995). De Gomez Dumm *et al.* (1970) ve De Alaniz *et al.* (1980) aç bırakılan salmonlar ilgili çalışmalarında DHA ve EPA değerlerinde ve desaturasyon aktivitesinde artış olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca balıklarda 18:2 *n*-6 ve 18:3 *n*-3'ün miktarının artması ile HUFA'ların üretimi için desaturasyon aktivitesinde artış olduğu belirlenmiştir (Tocher *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2004; Ling *et al.* 2006). Ancak bu çalışmada *n*-3 PUFA miktarı bakımından zengin olan aç grup balıklarda *elovl5* gen ekspresyon miktarı düşük bulunmuştur. Drew *et al.* (2008) yetişkin dişi zebra balığında beyin ve karaciğer gen ekspresyonuna açlığın etkisini araştırmışlar ve karaciğerde *elovl5* genin ekspresyonunun azaldığını bunun azalan plazma lipidlerinin lipid transportu için ihtiyacının azalmasıyla çakışmasından kaynaklandığını düşünmüşlerdir. Zhang *et al.* (2009) gobi balığında (*Rachycentron canadum*) yağ asit desaturasyon ve elongasyon genlerinin ekspresyonun fiziksel rollerini araştırmışlardır ve *elovl5* geninin C24 HUFA'lara doğru aktivitesinin düştüğünü belirlemişlerdir. Mourente *et al.* (2005) deniz levreğini (*Dicentrarchus labrax*) bitkisel yağ içerikli yemlerle besleyerek yağ asit metabolizmasındaki değişiklikleri incelemişler ve 18:3 *n*-3'nin EPA ve DHA'ya ve EPA'nın DHA göre desaturasyon ve elongasyonunu çok düşük olduğunu belirlemişler ayrıca EPA'dan 18:3 *n*-3'e β -oksidasyonu ve bütün desaturasyon ve oksidasyon aktiviteleri hepatositlerden enterositlerde daha yüksek bulmuşlardır. Bu çalışmada açlık ile tüm vücut *n*-3 PUFA, EPA ve DHA miktarının artmasına rağmen karaciğer *elovl5* gen ekspresyon miktarının düşmesinin muhtemel nedeninin karaciğerin vücudun diğer organlarına göre açlıktan çok daha fazla etkilenmesi olarak açıklanmıştır. 70 günlük açlık uygulanan grubun daha sonra 15 günlük besleme neticesinde karaciğerin *elovl5* geni bakımından normalleştiği çalışmanın başka bir sonucu olarak karşımıza çıkmıştır.

Yağ asit desaturasyon 2 (*fads2*) geninin ekspresyonunun 70 günlük açlık periyodu sonunda %94,96 azaldığı belirlenmiştir. 85. günün sonunda ise kontrol grubu *fads2* ekspresyon miktarının açlık periyodundan sonra 15 gün beslenen balıklara göre daha az olduğu belirlenmiştir. *fads2* O₂ kullanan karaciğer mikrozomal lipogenik stearil-KoA desaturasyon sisteminin bir terminal bileşenidir ve indirgenmiş sitokrom b5 elektronlar palmitik-KoA ve stearik-KoA içeren yağ açıl-KoA tabakalarına bir çift bağın eklemesini katalize etmektedir (Kaestner *et al.* 1989). *fads2* çeşitli fosfolipidler ve yüzey ana bileşenleri için biyolojik sinyal molekülleri olan PUFA'lerden EPA, DHA ve AA'nın biyosentezinde ilk adımı katalizler (Stoffel *et al.* 2008; Stroud *et al.* 2009). Çalışmamızda MUFA bakımından zengin olan kontrol grubu balıklarda düşük miktarlarda belirlenen EPA, DHA ve AA miktarının azalması ile karaciğerde HUFA'ların üretimi için desaturasyon enzim aktivitesi artmasıyla *fads2* gen ekspresyonu da arttığı ve *n-3* PUFA bakımından zengin açlık uygulanan balıklarda yüksek miktarlarda LA, EPA ve DHA bulunmasından dolayı *fads2* gen ekspresyon miktarının azaldığı sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde Salem *et al.* (2007) aç bırakılan gökkuşuğu alabalıklarında *fads2* gen ekspresyon miktarının azaldığını belirlemişlerdir.

Çok uzun zincirli açıl-KoA dehidrogenaz (*acadvl*) geni tarafından kodlanan protein mitokondriyal yağ asit β-oksidasyon yolunun ilk kataliz aşamasında mitokondriyal zarın içinde görev almaktadır. *acadvl* geninin ekspresyonu 70 günlük açlık periyodu sonunda %87,5 azaldığı belirlenmiştir. 85. gün sonunda *acadvl* ekspresyon miktarı kontrol grubu balıklar ile açlık periyodundan sonra 15 gün beslenen balıklarla karşılaştırıldığında eşit olduğu belirlenmiştir. *acadvl* geni yirmidört karbondan daha uzun zincir açıl tabakalarına daha uygunken 12 karbondan daha az substratlarda daha az aktivite gösterir. Kontrol grubunda MUFA miktarı ile *acadvl* gen ekspresyonu arasındaki pozitif ilişki beklenen bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır. Agazzia *et al.* (2010) *n-3* yağ asitlerince zengin diyetlerle beslenen keçilerde *acadvl*, *cpt1-β* ve *ppar-α* ekspresyon seviyelerinin arttığını belirlemişlerdir.

Peroksizom ve mitokondriyal yağ asidi oksidasyon enzim oranlarını sınırlayıcı karnitin palmitoltransferaz 1 β (*cpt1-β*) geninin ekspresyon miktarının açlık ile önemli derecede

düştüğü ve açlık periyodundan sonra 15 gün beslenen grubun *cpt1-β* ekspresyon miktarının kontrol grubu değerlerine dönemediği saptanmıştır. *cpt1-β* dış mitokondriyal zarından yağ asitlerinin taşınmasına aracılık yapmaktadır. Boukouvala *et al.* (2010) çipura balıklarında yaptığı bir çalışmada en son beslenmeden 12 saat sonra *cpt1-β* ekspresyon miktarının azaldığını fakat beslenmeden 24 saat sonra ise arttığını belirtmişlerdir. Bu araştırmada açlık uygulanan gruptaki *cpt1-β* gen ekspresyon değerlerinin kontrol grubuna nazaran üç kat azalması açlıkla birlikte mitokondriyal zarından yağ asit taşınımının azalmasıyla açıklanmıştır.

Peroksizom β-oksidasyon ilk adımını katalize eden açıl-koenzim oksidaz 1 (*acox1*) geni aynı zamanda peroksizomal β-oksidasyon oranını sınırlayıcı bir adımdır (Inestrosa *et al.* 1979; Tugwood *et al.* 1992). *ppra* dışındaki diğer tüm genlerde olduğu gibi açlık zebra balığı karaciğerindeki *acox1* gen ekspresyonunu da çok önemli derecede azaltmıştır. Bu genin aç balıklarda düşük miktarlarda bulunma sebebi enerji ihtiyacının karşılaması için yağ asitlerinin oksidasyonunda görev alması amacıyla kas dokusuna transfer edilmesi ile açıklanmıştır. Açlık periyodundan sonra 15 gün beslenen grubun *acox1* ekspresyon değerinde artış gözlenmiş ancak istatistiki olarak anlamsız bulunmuştur. Morais *et al.* (2007) ve He *et al.* (2013) balıklarda besin alınımıyla beraber yağ asit β-oksidasyon genlerinin arttığını belirtmişlerdir.

Peroksizom proliferon aktivasyon reseptör alfa (*ppar-α*) karaciğerde yağ asit peroksizom β-oksidasyonuna dahil hedef genlerin transkripsiyonunu artıran retinoid-X reseptörleri ile heterodimer karşılıklı elementlerini bağlanmasını düzenleyen nükleer reseptör ligantıdır. Bu şekildeki *ppar-α* yağ asidi metabolizmasının modülasyonunda bir lipid sensörü olarak hareket eder (Desvergne and Wahli 1999; Hihi *et al.* 2002). Farklı seviyelerde bulunan *ppar-α* SFA, 16:1 *n*-7 ve PUFA'lar ile aktive edilebilir (Pawar and Jump 2003). Çalışmamızda *ppar-α* gen ekspresyonunun açlık ile dramatik şekilde artış gösterdiği bulunmuştur (1,7 kat). Bu sonuç söz konusu genin açlık ile artan *n*-3 PUFA'nın miktarı ile aktive edilmesi ile açıklanmıştır. Açlık periyodundan sonra 15 gün beslenen grubun *ppra* ekspresyonunun kontrol grubu değerine yaklaştığı belirlenmiştir.

Yağ asidi bağlayıcı proteinler (FABP) olarak bilinen hücre içi lipid paperonları, hücrelerde lipid cevabını düzenleyen bir grup moleküldür ve aynı zamanda metabolik ve inflamatuvar yollarla güçlü bir şekilde ilişkilidir (Furuhashi and Hotamisligil 2008). FABP ailesinden olan beyin tipi yağ asit bağlayıcı proteinlerini (FABP7A) kodlayan *fabp7a* gen ekspresyonunu açlık ile sekiz kat düşmüştür. *fabp7a* gelişmekte olan sinir sistemi için gerekli olan DHA gibi yağ asitlerinin taşınmasında önemli roller almaktadır (Liu *et al.* 2004). Yüksek hızda yağ metabolizmasına sahip olan bağırsak, karaciğer, yağ ve kas gibi dokular yağ asidi alınımına ve kullanımına paralel olarak yüksek *fabp* düzeylerine sahiptir (Storch 2008). Açlık periyodundan sonra 15 gün beslenen grubun *fabp7a* ekspresyon değerlerinin kontrol grubu değerine döndüğü saptanmıştır.

Serbest yağ asitleri plazma membranından protein taşıyıcıları ile hücreler içine alınmaktadır ve FABP'ler ile hücre içinde taşınmaktadırlar. Karaciğer tipi FABP proteini kodlayan karaciğer tipi yağ asit bağlayıcı protein geninin (*fabp1a*) ekspresyonu açlık ile kontrol grubuna nazaran 4,5 kat düşüş göstermiştir. Wolfrum and Spener (2000) karaciğer tipi *fabp* (L-Fabp) ekspresyonunun azalması ile insanlarda genetik yağ emilim sendromları gibi hastalıkların meydana geldiğini bildirmişlerdir. Açlık periyodundan sonra 15 gün beslenen grup ile kontrol grubu *fabp1a* ekspresyonu arasında fark bulunamamıştır.

Çalışmamızda 70 gün boyunca açlık uygulanan balıklarda *fabp7a* ve *fabp1a* ekspresyon miktarları önemli derecede düşüş göstermesi ile karaciğerdeki yağ asidi metabolizmasının olumsuz etkilendiği sonucuna ulaşılmıştır.

5.3. Genel Sonuçlar ve Öneriler

Zebra balığının uzun açlık periyodu sırasında lipitleri etkin bir şekilde katabolize ederek enerji gereksiniminde kullanabildiği ve açlığın yaşam gücünün azalmasına ve ağırlık kaybına neden olduğu görülmüştür.

Genel olarak zebra balığının tüm vücudundaki baskın yağ asitlerinin 16:0, 18:0, 18:1 *n*-9, 18:2 *n*-6 ve 22:6 *n*-3 olduğu belirlenmiştir.

Açlık uygulanan zebra balığının tüm vücudunda miktar olarak ilk sırada PUFA, ikinci sırada SFA ve üçüncü sırada MUFA'nın yer aldığı tespit edilmiştir.

Açlık uygulanan zebra balığının normal yaşamsal faaliyetleri için ihtiyaç duyduğu enerjiyi sırasıyla MUFA, SFA, EPA, DHA ve 18:3 *n*-3'den sağladığı sonucuna varılmıştır. Toplam *n*-6 PUFA'ların açlık uygulanan grupta azalmasının temel nedeninin bu balıklarda dramatik biçimde azalan 18:2 *n*-6 miktarına bağlanmış ve açlık süresinin zebra balığı hayat döngüsüne göre çok uzun süreli olması nedeniyle 18:2 *n*-6'nın da kullanıldığı belirlenmiştir.

Açlık periyodu boyunca özellikle artış gösteren PUFA ve HUFA yağ asitlerinin zebra balığının normal fizyolojisi açısından önemli olduğu yorumlanmıştır.

Uzun süreli açlığın zebra balığı yağ asidi metabolizmasında görev alan sekiz genden yedisinin (*ppar-α* hariç) ekspresyon miktarlarını önemli derecede azalttığı belirlenmiştir. Bu azalma uzun süreli açlığın zebra balığı yağ asidi kompozisyonundaki dalgalanmalardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışma sonunda balıklarda açlık durumunda dokulardaki depo lipit kaynaklarına ve lipid metabolizmasına moleküler etkilerinin belirlenmesiyle literatüre katkı sağlayacağı kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abi-Ayad, S.E., Boutiba, Z., Melard, C., 2004. Dynamics of total body Fatty acids during early ontogeny of pikeperch (*Sander lucioperca*) larvae. *Fish physiology and Biochemistry* 30: 129–136.
- Abi-Ayad, S.E., Kestmont, P., Melard, C., 2000. Dynamics of total lipids and fatty acids during embryogenesis and larval development of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Fish Physiol. Biochem.* 23: 233–243.
- Ackman, R. G., 1967. Characteristics of the fatty acid composition and biochemistry of some fresh-water fish oils and lipids in comparison with marine oils and lipids. *Comparative Biochemistry and Physiology* 22: 907–922.
- Ackman, R. G., 1988. Concerns for utilization of marine lipids and oils. *Food Technol* 151-160.
- Ackman, R.G., Mcleod, C., Rakshit, S., Misra, K.K., 2002. Lipids and fatty acids of five freshwater food fishes of india. *Journal of food lipids* 9: 127-145.
- Agazzia, A., Invernizzia, G., Campagnolib, A., Ferronia, M., Fanelli, A., Cattaneo, D., Galmozzi, A., Crestanic, M., Dell, V., Savoinia, G., 2010. Effect of different dietary fats on hepatic gene expression in transition dairy goats. *Small Ruminant Research* 93 : 31–40.
- Ali, M., Nicieza, A., Wootton, R.J., 2003. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. *Fish and Fisheries* 4: 147-190.
- Almaida-Pagan, P.F., Hernández, M.D., García, B. G., Madrid, J.A., Costa, J.D. and Mendiola, P. 2007. Effects of total replacement of fish oil by vegetable oils on n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid desaturation and elongation in sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) hepatocytes and enterocytes. *Aquaculture*, 272, 589–598.
- Anonymous, 2014. <http://www.genecards.org>.
- Anonymous, 2014a. <http://themedicalbiochemistrypage.org/fatty-acid-oxidation.php>
- Anonymous, 2014b. http://en.wikipedia.org/wiki/Beta_oxidation.
- Aras, N. M., Güneş, M., Bayır, A., Sirkeioğlu, A. N., Haliloğlu, H., İ., 2009. Tuzla Çayı ve Tercan Baraj Gölü'ndeki *Capoeta capoeta umbla* HECKEL, 1843'nin Bazı Biyo-Ekolojik Özellikleri ile Total Yağ ve Yağ Asitleri Kompozisyonlarının Karşılaştırılması. *Ekoloji* 19, 73: 55-64.
- Aras, N.M., Haliloğlu, H. İ., Atamaalp M., 2002. Balıklarda Yağ Asitlerinin Önemi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 33 (3), 331-335.
- Ashton HJ, Farkvan DO and March BE 1993. Fatty acid composition of lipids in the eggs and alevins from wild and cultured chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50, 648-655.
- Ası, T., 1999. *Tablolarla Biyoloji* Cilt2. Ankara.
- Atay, D., 1989. *Populasyon Dinamiği*, A. Ü., Ziraat Fak. Yayınları, Ankara.
- Bartke, N., Hannun, YA., 2009. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res.* 50(Suppl):S91–96.
- Bayır, M., Bayır, A., Wright, J. M. 2015. Divergent spatial regulation of duplicated fatty acid-binding protein (fabp) genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D* 14 (2015) 26–32.

- Bell, J.G., Castell, J.D., Tocher, R.G., MacDonald, F.M. and Sargent, J.R. 1995. Effects of different dietary arachidonic acid: docosahexaenoic acid ratios on phospholipid fatty acid compositions and prostaglandin production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Physiol. Biochem.* 14: 139–151.
- Bessonarat, M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Hernandez, C.M., Gonzalez, M.M., and Palacios, H.F., 1999, Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture.* 179, 265-275.
- Bingöl, G., 1976. Lipidler. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayın Evi, 41.
- Black, D., Love, R. M., 1986. The sequential mobilisation and restoration of energy reserves in tissues of Atlantic cod during starvation and re-feeding. *Journal of Comparative Physiology* 156B: 469–479.
- Blasco, J., Fernandez, J., Gutierrez, J., 1992. Variations in tissue reserves, plasma metabolites and pancreatic hormones during fasting in immature carp, *Cyprinus carpio*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 103A: 357–363.
- Boukouvala, E., Leaverb, M. J., Kreya, L. F., Theodoridoua, M., 2010. Molecular characterization of a gilthead sea bream (*Sparus aurata*) muscle tissue cDNA for carnitine palmitoyltransferase 1B (CPT1B). *Comparative Biochemistry and Physiology* 157: 189-197.
- Bustin SA., Benes V., Nolan T., Pfaffl MW., 2005. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J. Mol. Endocrinol.* Jun;34(3):597-601.
- Brody, J.R.; Kern, S.E., 2004. "History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis". *Anal Biochem* 333 (1): 1–13.
- Canpolat, A., Yılmaz, Ö., Gürsu, F., 1999. *Capoeta trutta* ve *Barbus rajanorum mystaceus* 'un Kas Dokularındaki Total Lipit ve Yağ Asidi Miktar ve Bileşimlerinin Üreme Periyodu Süresince Değişimi. *Tr. J. of Biology* 2: 319–330.
- Carefoot, J. M., Bole, J.B. and Conner, R.L., 1993. Effect of timing of application on the recovery of fertilizer N applied to irrigated soft White wheat. *Can. J. Soil Sci.* 73: 503-513.
- Christiansen, J.S., Ringo, E., Farkas, T., 1989. Effect of sustained exercise on growth and body composition of first feeding fry of arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L), *Aquaculture*, 79: 329-335.
- Comoglio, L.I., Gaxiola, G., Roque, A., Cuzon, G., Amin, O., 2004. The effect of starvation on refeeding, digestive enzyme activity, oxygen consumption, and ammonia excretion in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Shellfish constituents of the pike (Esox lucius L.)*. *Ann. Zool. Fennici* 8: 427–433.
- Comoglio, L., Goldsmit, J., Amin, O., 2008. Starvation effects on physiological parameters and biochemical composition of the hepatopancreas of the southern king crab *Lithodes santolla* (Molina, 1782). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43(2): 345-353.
- Czesny S and Dobrowski K 1998. The effect of egg fatty acid concentrations on embryo viability in wild and domesticated walleye (*Stizostedion vitreum*). *Aquatic Living Resources* 11: 371-378.
- Dave, G., Johansson-sjobeck, M., Larsson, A., 1976. Metabolic and hematological effects of starvation in the European eel, *Anguilla anguilla* L.III. *Comp. Biochem. Physiol.*, 53B, 509-515.

- David, F., Sandra, P. and Wylie, P.L., 2003. Improving the analysis of fatty acid methyl esters using retention time locked methods and retention time databases. Application Note. <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5988-5871EN.pdf>.
- De Alaniz, M.J.T., De Gomez Dumm, I.N.T., Brenner, R.R., 1980. Effect of fasting on D5-desaturation activity in rat liver microsomes and HTC cells. *Mol. Cell Biochem.* 33, 165–170.
- De Gomez Dumm, I.N.T., De Alaniz, M.J.T., Brenner, R.R., 1970. Effect of diet on linoleic acid desaturation and on some enzymes of carbohydrate metabolism. *J. Lipid Res.* 11, 96–101.
- Desvergne, B., Wahli, W., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.* 20 (5), 649–688.
- Din, 2002. Basisvalidierung genormter Verfahren zur wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung- Validierungsdokument (38415- T6), p. 27.
- Dobson, S.H., Holmes, R.M., 1984. Compensatory growth in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal Fish Biology* 25: 649–656.
- Doucett, R.R., Booth, R.K., Power, G., McKinley, R.S., 1999. Effects of the spawning migration on the nutritional status of anadromous Atlantic salmon (*Salmo salar*): insights from stable-isotope analysis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56, 2172–2180.
- Drew, R. E., Rodnick, K. J., Settles, M., Wacyk, J., Churchill, E., Powell, M. S., Hardy, R. W., Murdoch, G. K., Hill, R. A., Robison, B. D., 2008. Effect of Starvation on Transcriptomes of Brain and Liver in Adult Female Zebrafish (*Danio rerio*). *Physiol Genomics* 35: 283–295.
- Durazo-Beltran, E., Viana, M.T., Abramo, L.R., Toro-Vazquez, J.Z., 2004. Effects of starvation and dietary lipid on the lipid and fatty acid composition of muscle tissue of juvenile green abalone (*Haliotis fulgens*). *Aquaculture* 238:329-341.
- Einen, O.; Waagen, B.; Thomassen, M. S., 1998. Starvation prior to slaughter in Atlantic salmon (*Salmo salar*): I. Effects on weight loss, body shape, slaughter and fillet-yield, proximate and fatty acid composition. *Aquaculture* 166: 85–104.
- Enyu, Y. L., Shu-Chien, A. C., 2011. Proteomics Analysis of Mitochondrial Extract From Liver of Female Zebrafish Undergoing Starvation and Refeeding. *Aquaculture Nutrition* 17: e413-e423.
- Estevez, A., Ishikawa, M. and Kanazawa, A. 1997. Effect of arachidonic acid on pigmentation and fatty acid composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel). *Aquacult. Res.* 28: 279–289.
- Folch, J., Less, M., Stanley G. H. S., 1954. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry.* 226, 497–509.
- Fulco, A. J., Mead, J. F., 1960. *J. Biol. Chem.* 235, 3379-3384.
- Furuhashi, M., Hotamisligil, G.S., 2008. Fatty acid-binding proteins: Role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 7: 489-503.
- Gerrits, J. P. G., 1994. Composition, use and legislation of spent mushroom substrate in the Netherlands. *Compost. Sci. Util.* 2:24-30.
- Glaser, C., Heinrich J., Koletzko B., 2010. Role of FADS1 and FADS2 polymorphisms in polyunsaturated fatty acid metabolism. *Metabolism - Clinical and Experimental* 59: 993-999.

- Gökoğlu, M. ve Baran, İ., 1991. Yapay Yola Elde Edilen Levrek Yavrularında Pelet Yeme Geçene Kadar Ölüm Oranının Tesbiti. İ. Ü. Su Ürünleri Dergisi 5:1: 2, 85 – 98.
- Guderley, H., Lapointe, D., Bedard, M., Dutıl, J.D., 2003. Metabolic priorities during starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Godus morhua* L. Biochem. Physiol. 135A, 347-356.
- Gunasekera, R. M.; De Silva, S. S.; Ingram, B. A., 2001: Chemical changes in fed and starved larval trout cod, *Maccullochella macquarensis* during early development. Fish Physiol. Biochem. 25, 255–268.
- Gurr, M., I. and James, A., T., 1975. Lipid Biochemistry-An Introduction 2nd editions. Chapman and Hall, London, UK. 244.
- Gurr, M. I., Harwood, J. L. and Frayn, K. N., 2002. Lipid Biochemistry. 5th ed., Blackwell Science, USA.
- Gregersen, S., Jeppesen, P. B.; Holst, J. J. and Hermansen, K., 2004. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism*, 53, 73-76.
- Halver, J.E., 1989. Fish Nutrition, Influence of varying Academic Press, San Diego. C.A.
- Halver, J., and Hardy, W.R., 2002. Fish Nutrition. Academic Press., Elsevier Science, Third Edition, 417-423, USA.
- Hayward, R.S., Noltie, D.B., Wang, N., 1997. Use of compensatory growth to double hybrid sunfish growth rates. Trans. Am. Fish Soc. 126: 316–322.
- Hazel, J.R., 1984. Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 246, 460–470.
- He, A., Yang, J., Tang, S., Wang, C., 2013. Cloning and molecular characterization of complement component 1 inhibitor (C1INH) and complement component 8β (C8β) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish and Shellfish Immunology 35: 1055–1058.
- Hendersorn, J., Tocherd., R., 1987. The lipid composition and hiochemistry offreshwater fish. Prog. Lipid Res. 26, 281-347.
- Hervant, F., Meathieu, J., Durand, J., 2001. Behavioural, physiological and metabolic responses to long-term starvation and refeeding in a blind cave-dwelling (*Proteus 1519 anguinus*) and a surface-dwelling (*Euproctus asper*) salamander. J. Exp. Biol. 204: 69–281.
- Hihi, A.K., Michalik, L., Wahli, W., 2002. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. Cell. Mol. Life Sci. 59: 790–798.
- Hisaoka, K.K. and Battle H.I., 1958. The normal developmental stages of the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton- buchanan). Journal of Morphology, 102, 311-327.
- Hoşsu B., A.Y. Korkut., A. Fırat. 2003. Balık Besleme ve Yem Teknolojisi I. Balık Besleme Fizyolojisi ve Biyokimyası 3. Baskı, Ege Üni., Su Ürünleri Fak. Yay.
- Hung, S. S. O., Liu, W., Li, H. B.; Storebakken, T.; Cui, Y. B., 1997.Effect of starvation on some morphological and biochemical parameters in white sturgeon, (*Acipenser transmontanus*). Aquaculture 151: 357–363.
- Inestrosa, N.C., Bronfman, M., Leighton, F., 1979. Detection of peroxisomal fatty acylcoenzyme A oxidase activity. The Biochemical Journal 182: 779–788.
- Ishizaki, Y., Masuda, R., Uematsu, K., Shimizu, K., Arimoto, M. and Takeuchi, T. 2001. The effect of docosahexaenoic acid on schooling behaviour and brain development in larval yellowtail. J. Fish Biol. 58: 1691–1703.

- Jeziarska, B., Hazel, J. R., Gerking, S. D., 2006. Lipid Mobilization During Starvation in The Rainbow Trout, *Salmo gairdneri* Richardson, with Attention to Fatty Acids. *Journal of Fish Biology* 21: 681-692.
- Jobling, M. and Johansen, S.J.S. 1999. The lipostat, hyperphagia and catch-up growth. *Aquaculture Research* 30: 473-478.
- Kaestner, K.H., Ntambi, J.M., Kelly T.J. Jr., Lane, M.D., 1989. A second differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J Biol Chem* 264(25):14755-14761.
- Kanazawa A., S. Teshima and S. Tokiwa, 1979a. Biosynthesis of fatty acids from palmitic acid in the prawn, *Penaeus japonicus*. *Mem. of the Fac. of Fish. Kagoshima Univ.*, 28 : 17-20.
- Keskin, H., 1981. *Besin Kimyası, İst. Ün. Yayınlan Cilt 1*, 163-164s.
- Kim, M.K., Lovell, R.T., 1995. Effect of restricted feeding regimes on compensatory weight gain and body tissue changes in channel catfish *Ictalurus punctatus* in ponds. *Aquaculture* 135: 285–293.
- Kimmel, C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B. and Schilling T.F., 1995. Stages of embryonic- development of the zebrafish. *Developmental Dynamycs*, 203, 253-310.
- Koven, W. M., Kissil, G.W., Tandler, A., 1989 Lipid and n-3 Requirement of *Sparus aurata* Larvae During Starvation and Feeding. *Aquaculture Research* 79: 185-191.
- Kristoffersson, R., Broberg, S., 1971. Effect of temperature acclimation on some blood constituents of the pike (*Esox lucius* L.) *Annales Zoologici Fennici* Vol. 8, No. 4, pp. 427-433.
- Larsson, A., Lewander, K., 1973. Metabolic effects of starvation, *Anguilla-anguilla* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, 44, 367-374.
- Leonard, A.E., Pereira S.L., Sprecher H. and Huang Y.S., 2004. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 43:36-54.
- Lele, Z. and Krone P.H., 1996. The zebrafish as a model system in developmental toxicological and transgenic research. *Biotechnology Advances*, 14, 57-72.
- Ling, S., Kuah, M.K., Muhammad, T.S.T., Kolkovski, S., Shu-Chien, S.A.C., 2006. Effect of dietary HUFA on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs in female swordtail *Xiphophorus helleri*. *Aquaculture*, 261, 204–214.
- Liu, R.Z., Denovan-Wright, E.M., Wright. J.M., 2003. Structure, linkage mapping and expression of the heart-type fatty acid-binding protein gene (*fabp3*) from zebrafish (*Danio rerio*). *Eur. J. Biochem.*, 270: 3223–323.
- Liu, R. Z., Denovan-Wright, E. M., Degrave, A., Thisse, C., Thisse, B., Wright, J. M., 2004. Differential Expression of Duplicated Genes for Brain-Type Fatty Acid-Binding Proteins (*fabp7a* and *fabp7b*) During Early Development of The CNS in Zebra fish (*Danio rerio*). *Gene Expression Patterns* 4 : 379–387.
- Los, D.A. and Murata, N., 1998. Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1394: 3-5.
- Love, R. M., Black, D., 1990. Dynamics of stored energy in the North sea cod, *Gadus morhua*, and cultured rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comparative Physiological Zoology* 63 :630–638.

- Luo, B. Z., Tan, X. Y, Wang, V. M., Fan Q.-X., 2009. Effects of long-term starvation on body weight and body composition of juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*, with special emphasis on amino acid and fatty acid changes. *J. Appl. Ichthyol.* 25: 184–189.
- McCue, M. 2010. Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A.*
- Machado, C. R., Garófalo, M. A. R., Roselino, J. E. S., Kettelhut, I. C., Migliorini, R. H., 1988. Effect of fasting on glucose turnover in a carnivorous fish (*Hoplias sp.*). *American Journal of Physiology* 256: R612–R615.
- Metcalf, L.D. and Schmitz, A.A., 1961. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 33, 363-364.
- Mills, D., 1986. Akvaryum Bakımı. Çevirenler Eshar Kütevin, Ziya Kütevin, 1994, İnkılap Kitapevi, İstanbul , 975-10-0641-4.
- Mohamed, E., H., A., Al-Sabahi, G., N., 2011. Fatty acids content and profile of common commercial Nile fishes in Sudan. *International Journal of Fisheries and Aquaculture* Vol. 3 (6): 99-104.
- Mommsen, T. P., French, C. J. & Hochachka, P. W., 1980. Sites and patterns of protein and amino acid utilisation during the spawning migration of salmon. *Canadian Journal of Zoology* 58, 1785–1799.
- Moon, Y.-A., Horton, J.D., 2003. Identification of two mammalian reductases involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade. *Journal of Biological Chemistry* 278, 7335–7343.
- Moon Y.A., Hammer R.E. and Horton J.D. 2009. Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice. *J. Lipid Res.* 50:412-423.
- Moon, T.W., 1983. Metabolic reserves and enzyme activities with food deprivation in immature American eels, *Anguilla rostrata* (LeSuer). *Can. J. Zool.* 61: 802–811.
- Morais, S., Knoll-Gellida, A., Andre, M., Barthe, C., Babin, P.J., 2007. Conserved expression of alternative splicing variants of peroxisomal acyl-CoA oxidase 1 in vertebrates and developmental and nutritional regulation in fish. *Physiological Genomics* 28: 239–252.
- Mourente, G., Tocher, D.R., Díaz-Salvago, E., Grau, A. and Pastor, E. 1999. Study of the n-3 highly unsaturated fatty acids requirement and antioxidant status of *Dentex dentex* at *Artemia* feeding stage. *Aquaculture* 179: 291-307.
- Mourente, G., Dick, J.R., Bell, J.G., Tocher, D.R. 2005. Effect of partial substitution of dietary fish oil by vegetable oils on desaturation and β -oxidation of [1-¹⁴C] 20:5n-3 (EPA) in hepatocytes and enterocytes of European sea bass (*Dicentrarchus L.*). *Aquaculture* 248: 173–186.
- Muratah, H., Higashit, T., 1980. Selective utilization of fatty acid as energy source in carp. *Bull. Jap. Soc. Sei. Fish.* 46, 1333-1338.
- Mustafa, T., Srivastava, K.C., 1989. Prostaglandins (eicosanoids) and their role in ectothermic organisms. *Adv. Comp. Em. Physiol.* 5, 157-207.
- Nakamura, M.T., Nara, T.Y., 2004. Structure, function, and dietary regulation of delta-6, delta-5, and delta-9 desaturases. *Annual Review of Nutrition* 24: 345–376.
- Navarro, I., Gutiérrez, J., 1995. Fasting and Starvation. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. New York: Elsevier 4: 393–433.

- Ntambi, J.M., 1999. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J. Lipid Res.* 40: 1546-1558.
- Okumuş, I., 2000. Kültür balıklarında kalite ve doğal balık kültür balığı tartışması. Fishery and Fish Product Symposium Erzurum, Turkey.
- Öçal, N.N., 2013. Farklı sıcaklıklarda kısa süreli açlık ve geri beslemenin avrupa deniz levreği (*dicentrarchus labrax*) lipid metabolizması üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi., Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Parmar, M. B., Venkatachalam, A.B., Wright, J.M., 2012. Comparative genomics and evolutionary diversification of the duplicated *fabp6a* and *fabp6b* genes in medaka and three-spined stickleback. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D* 311–321.
- Parmar, M.B., Wright, J.M., 2013. Comparative evolutionary genomics of medaka and three-spined stickleback *fabp2a* and *fabp2b* genes with *fabp2* of zebrafish. *Genome* 56: 27–37.
- Paton, C. M., Ntambi, J. M., 2009. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 297, E28–E37.
- Pawar, A., and D. B. Jump, 2003. Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in rat primary hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 278:35931–35939.
- Price, Pamela T., Nelson, Carolanne M., Clarke Steven, D., 2000. Omega-3 polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Current Opinion in Lipidology* 11: 3-7.
- 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 sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*), *Aquaculture*, 263: 211-219.
- Rasoarahona, J. R. E., Bartnathan, G., Bianchini, J. P., Gaydou, E. M., 2005. Influence of season on the lipid content and fatty acid profiles of tree tilapia species (*Oreochromis niloticus*, *O. Macrochi* and *Tilapia rendolli*) from Madagascar. *Science Direct Food Chemistry* 91, 683-694.
- Regost, C.; Arzel, J.; Cardinal, M.; Laroche, M.; Kaushik, S. J., 2001. Fat deposition and flesh quality in seawater reared triploid Brown trout (*Salmo trutta*) as affected by dietary fat levels and starvation. *Aquaculture* 193: 325–345.
- Reim, G., 2003. *The role of pou2/spiel-ohne-grenzen (spg) in brain and endoderm development of the zebrafish, Danio rerio*, Thesis (PhD), der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden, Germany.
- Reinitz, G., 1983. Relative effect of age, diet, and feeding rate on the body composition of young rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 35, 19–27.
- Rio, M.D. , 2006. Cholesterol and fatty acids (FFA) in the blood of marine fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 57B., 191-196.
- Ringo, E., Andreassen T. U., Burkow J. K., 1990. Effects of starvation on the lipid composition in muscle tissue and liver of hatchery-reared arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L), from lake takvatn. *Fisk. Dir. Skr., 5er. Erncering*, Vol. 111, Ro 2, 13-20.
- Rıtar, A. J., Dunstan, G.A., Crear, B.J. and Brown, M.R., 2003. Biochemical composition during growth and starvation of early larval stages of cultured spiny

- lobster (*Jasus edwardsii*) phyllosoma. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 136: 353-370.
- Rønnestad, I.; Finn, R. N.; Lein, I.; Lie, O., 1995: Compartmental changes in the contents of total lipid, lipid classes and their associated fatty acid in developing yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquacult. Nutr.* 1, 88–97.
- Russell, N.R., Wootton, R.J., 1992. Appetite and growth compensation in the European minnow, *Phoxinus phoxinus* Cyprinidae. following short periods of food restriction. *Environ. Biol. Fishes* 34: 277–285.
- Salem, M., Silverstein, J., Rexroad, C., Yao, J., 2007. Effect of starvation on global gene expression and proteolysis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BMC Genomics* 8:328.
- Sanchez-Paz, A., García-Carreño, F.L., Muhlia-Almazan, A., PeregrinoUriarte, A.B., Hernandez-Lopez, J.Y., Yepiz-Plascencia, G., 2006. Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 241–249.
- Sargent, J. R.; McEvoy, L.; Estevez, A.; Bell, G.; Bell, M.; Hendersorn, J.; Tocher, D., 1999. Lipid nutrition of marine fish early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179: 217–229.
- Sargent, J.R., Bell, M.V., Hendersorn, R.J. and Tocher, D.R. 1995. Requirement criteria for essential fatty acids. *J. Appl. Ichthyol.* 11: 183–198.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G. 2002. *The lipids*. In: Halver JE, Hardy RW (eds) *Fish nutrition*, 3rd edn. Academic, San Diego, USA, 181–257.
- Satoh, S., Takeuchi, T., Watanabe, T., 1984. Studies on nutritive-value of dietary lipid in fish. Effects of starvation and environmental-temperature on proximate and fatty-acids compositions of *Tilapia nilotica*. *Bulletin of the of the Japanese Society of Scientific Fisheries Research*, 50, 79-84.
- Silva, S.S.D., Gunasekera, R. M., Austin, C. M., 1997. Changes in The Fatty Acid Profiles of Hybrid Red Tilapia, *Oreochromis mossambicus* * *O. niloticus*, Subjected to Short-Term Starvation, and Comparison With Changes in Seawater Raised Fish. *Aquaculture* 153 : 273-290.
- Sirkecioğlu, A., Bayır, A., Haliloğlu, H., Bayır, M., Aras, M. 2010 "Bazı Bitkisel Yağların Yağ Asidi Kompozisyonu ve Balık Yemlerinde Kullanılabilirlikleri ". 2. Ulusal Alabalık Sempozyumu 6-8 Temmuz.
- Skorski, Z., 1990. Sea food resources nutritional composition and preservation. *Crc. Press. Inc. Boca Rota Florida*, 41-44.
- Sprecher, H., 2000. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1486: 219-231.
- Sprecher, H., Luthria, L.D., Mohamme D.S. and Baykousheva S.P. 1995. Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *Journal of Lipid Research* 36:2471-2477.
- Spector, P., E., 1999. *Journal of Organizational Behavior* . Vol 17 Issue 6 :607.
- 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.
- Stern, H.M., Zon, L.I., 2003. Cancer genetic and drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Cancer* 3:533–539

- Stoffel W., Holz B., Jenke B., Binczek E., Gunter R.H., Kiss C., Karakesisoglou I., Thevis M., Weber A.A., Arnhold S. and Addicks K. 2008. Delta6-desaturase (FADS2) deficiency unveils the role of omega3- and omega6-polyunsaturated fatty acids. *EMBO J.* 27:2281-2292.
- Storch, J CB., 2008. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu Rev Nutr* 28: 73-95.
- Stroud C.K., Nara T.Y., Roqueta-Rivera M., Radlowski E.C., Lawrence P., Zhang Y., Cho B.H., Segre M., Hess R.A., Brenna J.T., Haschek W.M. and Nakamura M.T. 2009. Disruption of FADS2 gene in mice impairs male reproduction and causes dermal and intestinal ulceration. *J. Lipid Res.*
- Stryer, L., 1995. *Biochemistry*. 4th ed., WH Freeman: San Francisco, CA, p. 1017.
- Tang, R., Dodd, A., Lai, D., McNabb, WC., Love, DR., 2007. Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochim Biophys Sin* 39, 384–390.
- Takeuchi, T. T., Watanabe, T., 1982. The Effects of Starvation and Environmental Temperature on Proximate and Fatty Acid Compositions of Carp and Rainbow. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 48(9), 1307-1316.
- Tidwell, J.H., Webster, C., Clark, J., 1992. Effects of Feeding, Starvation and Refeeding on The Fatty Acid Composition of Channel Catfish, *Ictalurus punctatus* Tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology* 103: 365-368.
- Timur, M., 2006. Balık Fizyolojisi, Nobel Yayın Dağıtım No:957.
- Tripathi, G., Verma, P., 2003. Starvation-Induced Impairment of Metabolism in a Freshwater Catfish. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* 58c, 446-451.
- Turchini, G.M., Francis, D.S. and De Silva, S.S. 2006. Fatty acid metabolism in the freshwater fish Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) deduced by the wholebody fatty acid balance method. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 144, 110–118.
- Tocher, D.R., Agaba, M., Hastings, N., Bell, J.G., Dick, J.R., Teale, A.J., 2002. Nutritional regulation of hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition in zebrafish (*Danio rerio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiol. Biochem.* 24, 309–320.
- Tugwood, J.D., Issemann, I., Anderson, R.G., Bundell, K.R., McPhee, W., Green, S., 1992. The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *The EMBO Journal* 11:433–439.
- Tuğlu, B. Ve Uysal, S., 2011. Yağ Asidi Bağlayıcı Proteinler. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 9(1): 31-38.
- Uysal, K., Aksoylar, M.Y., 2003. Sudak *Sander lucioperca* (L., 1758) Balıklarının kas ve karaciğer total lipid ve total yağ asidi içeriğinin mevsimsel değişimi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enst. Dergisi, 7- 3, 25- 29.
- Vance, D. E., and Vance, J. E., 2002 *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th edn. Elsevier, Amsterdam.
- Wang Y., Torres-Gonzalez M., Tripathy S., Botolin D., Christian B. and Jump D.B. 2008. Elevated hepatic fatty acid elongase-5 activity affects multiple pathways controlling hepatic lipid and carbohydrate composition. *J. Lipid Res.* 49:1538-1552.

- Wallis, J. G., Watts, J. L. and Browse, J., 2002. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends Biochem. Sci.* 27, 467- 473.
- Wakil, S.J., 1989. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry* 28:4523–4530.
- Warude, D., Joshi, K., and Harsulkar, A. 2006. Polyunsaturated Fatty Acids: Biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, 26: 83–93.
- Weatherley, A. H., Gill H. S., 1989. *The biology of fish growth*. Academic Press. London, 442p-134.
- Webster, C.D., Goodgame-ttu, L.S., Tidwell, J. H., ve Reed, E.B., 1994. Effect of dietary protein level on growth and body composition of channel catfish reared in cages. *Journal of Applied Aquaculture*, 42,73-86.
- Westerfield, M. (1995) *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. pp. 1.1–1.27. University of Oregon Press, Eugene.
- Wixon, J., 2000. Featured organism: *Danio rerio*, the zebrafish. *Yeast* 17, 3: 225-231.
- Wilson, P.N. and Osbourn, D.F., 1960. Compensatory growth after undernutrition in mammals and birds. *Biological Review* 35:324-363.
- Wolfrum, C., Spener, F., 2000. Fatty acids as regulators in lipid metabolism. *Eur J Lip Sci Technol*, 102 : 746–762.
- Yilmaz, O., 1995. Elazığ Hazar gölünde yaşayan *Capoeta capoeta umbla* (Heckel, 1843)'nin total yağ asidi miktarı ve yağ asitleri cinslerinin mevsimlere göre değişimi. Doktora Tezi Fırat Üniversitesi, Elazığ.
- Zar, J.H., 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall Inc., NJ, 685 pp.
- Zamal, H., ve Ollevier, F., 1995. Effect of feeding and lack of food on the growth, gross biochemical and fatty acid composition of juvenile cat fish. *Journal of Fish Biology.*, 46, 404-414.
- Zhang, X., Seiliez, I., Hastings, N., Tocher, D.R., Panserat, S., Dickson, C.A., Bergot, P., Teale, A.J., 2004. Characterisation and comparison of fatty acyl $\Delta 6$ desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology* 139B: 269–279.
- Zhang, X., Ding, Z., Xu, Y., Monroig, O., Morais, S., Douglas R., 2009. Tocher Physiological roles of fatty acyl desaturases and elongases in marine fish: Characterisation of cDNAs of fatty acyl $\Delta 6$ desaturase and *elovl5* elongase of cobia (*Rachycentron canadum*). *Science direct Aquaculture Volume 290, Issues 1–2: 122–131*.
- Zhang, Z., Hu, J., 2007. Development and validation of endogenous reference genes for expression profiling of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to endocrine disrupting chemicals by quantitative real-time RT-PCR. *Toxicol Sci* 95, 356–368.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Sivas’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Sivas’da tamamladı. 2003 yılında girdiği Karadeniz Teknik Üniversitesi Giresun Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü 2007 yılında mezun oldu. 2007–2010 yılları arasında, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. 2010 yılından beri Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Anabilim Dalı’nda Doktora öğrenimine devam etmektedir. Gaziosmanpaşa Üniversitesinde 2010 yılından beri Öğretim Görevlisi olarak görev yapmaktadır.