



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

**BİYOAKTİF MADDELERLE İN OVO STİMULASYONDAN SONRA TAVUK
KARACİĞERİNDE *KLHL6* ve *SYK* GENLERİNİN METİLASYON PROFİLİNİN
BELİRLENMESİ**

Hazırlayan

Sena Türkan

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Doç. Dr. Nevin Karakuş

TOKAT – 2019

BİYOAKTİF MADDELERLE İN OVO STİMULASYONDAN SONRA TAVUK
KARACİĞERİNDE *KLHL6* ve *SYK* GENLERİNİN METİLASYON PROFİLİNİN
BELİRLENMESİ

Tezin Kabul Ediliş Tarihi: / /

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Başkan :

.....

Üye :

.....

Üye :

.....

Üye :

.....

Üye :

.....

Bu tez, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Yönetim Kurulunun
...../...../..... tarih ve sayılı oturumunda belirlenen jüri tarafından kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü:

Mühür

İmza

T.C.

GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu belge ile, bu tezdeki bütün bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak toplanıp sunulduğunu, bu kural ve ilkelerin gereği olarak, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yaptığımı ve kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

(.../.../200...)

Tezi Hazırlayan Öğrencinin

Sena Türkan

.....

İmzası

.....

Teşekkür

Yüksek lisans eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen, beni her koşulda destekleyen, değerli zamanımı cömertçe kullanan, bilgi ve deneyimi ile yol gösteren, sevgi ve hoşgörüsü ile daima yanımda olan değerli hocam, sayın Doç. Dr. Nevin Karakuş'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bilimsel düşünce anlayışımı genişleten, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD'nda birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Prof. Dr. Hacı Ömer Ateş, Doç. Dr. Serbülent Yiğit ve Doç.Dr. Aydın Rüstemoğlu'na yardımları için çok teşekkür ederim.

Bilgi ve deneyimlerini bana özveri ve iyi niyetleri ile aktaran, hayat enerjileri ile örnek olan, bilimsel düşünce anlayışımı genişleten, maddi ve manevi desteğini hiç eksik etmeyen sayın Prof. Maria Siwek'e teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca bilgi ve deneyimleriyle beni kendilerine hayran bırakan sayın Dr. Aleksandra Dunislawsk'aya yardımları için çok teşekkür ederim.

Hayatımın her evresinde varlığıyla her zaman yanımda hissettiren, sevgi ve özverileriyle bugünlere gelmemi sağlayan canım anneme sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Genel olarak, biyoaktif bileşiklerin çoğu, belirgin bir antioksidan kapasiteye sahiptir. Prebiyotikler gıdalardaki bakteri ve mantarlar gibi faydalı mikroorganizmaların büyümesini veya aktivitesini indükleyen bileşiklerdir. Probiyotikler, kalın bağırsağı kolonize etmeyi amaçlayan canlı bakterilerdir. Sinbiyotik terimi, prebiyotiklerin ve probiyotiklerin sinerjik kombinasyonlarını tanımlamak için kullanılır. DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmaların, gen ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir. Bazı aday genlerin DNA metilasyonu dokularda ölçüldüğü zaman, biyoaktif maddelerin epigenetik etkisi hakkında bilgi verici olabilir. Biyoaktif bileşiklerin karaciğerdeki DNA metilasyon seviyeleri üzerindeki rolü günümüzde bilinmemektedir. Bu çalışmada, biyoaktif maddelerin in ovo stimülasyondan sonra önemli bir metabolik organ olan karaciğerde yol açtığı epigenetik değişiklikleri (*KLHL6* ve *SYK* genlerinin metilasyonu üzerine) incelemeyi amaçladık.

Bu çalışmada, 20 Ross ve 20 Green-legged Partridgelike cinsi tavuğun karaciğer örneklerinden olmak üzere toplamda 40 numune kullanıldı. Fenol / kloroform yöntemi kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. Prebiyotik (galaktooligosakarit), probiyotik (*Lactococcus lactis subsp. cremoris*), sinbiyotiklerin (probiyotik ve prebiyotik kombinasyonu) *SYK* ve *KLHL6* genlerinin metilasyon seviyeleri üzerinde etkisi incelendi. Metilasyon profilleri Metilasyon spesifik kantitatif PCR yöntemi kullanılarak analiz edildi. Prebiyotik, probiyotik ve sinbiyotiklerin embriyonik gelişimin 12. gününde in ovo uygulamasıyla enjekte edilmesinin, Ross ve Greenlegged-Partridgelike cinsi tavukların karaciğerlerinde immün ile ilişkili genlerin (*KLHL6* ve *SYK* genleri) metilasyon seviyelerinde artışa neden olduğu tespit edildi. Biyoaktif maddelerin etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmanın anlaşılması, antibiyotiklere karşı doğal alternatifler bulmak için yararlı bir yaklaşım olabilir.

Anahtar Kelimeler: Biyoaktif maddeler, Epigenetik karakter, In ovo teknolojisi, *KLHL6*, *SYK*

ABSTRACT

In general, most of the bioactive compounds have a marked antioxidant capacity. Prebiotics are compounds in food that induce the growth or activity of beneficial microorganisms such as bacteria and fungi. Probiotics are live bacteria which are intended to colonize the large intestine. The term synbiotic is used to describe synergistic combinations of prebiotics and probiotics. Epigenetic mechanisms such as DNA methylation have been shown to regulate gene expression. When DNA methylation of some candidate genes is measured in tissues, it can be informative about the epigenetic effect of bioactive substances. The role of bioactive compounds on DNA methylation levels in the liver is currently unknown. In this study, we aimed to investigate the epigenetic changes caused by bioactive substances in the liver which is an important metabolic organ after ovo stimulation (on methylation of *KLHL6* and *SYK* genes).

In this study, a total of 40 specimens, liver samples of 20 Ross and 20 Green-legged Partridgelike chickens, were used. DNA was isolated using phenol / chloroform method. The effects of prebiotic (galactooligosaccharide), probiotic (*Lactococcus lactis subsp. cremoris*), synbiotics (probiotic and prebiotic combination) on the methylation levels of *SYK* and *KLHL6* genes were examined. DNA methylation ratios determined by Methylation Specific Quantitative PCR. Increased levels of methylation of immune-related genes in the liver of Ross and Greenlegged-Partridgelike chickens were observed after in ovo injection of prebiotics, probiotics and synbiotics on the 12th day of embryonic development.

Understanding the molecular mechanism underlying the effects of bioactive substances may be a useful approach for finding natural alternatives to antibiotics.

Keywords: Bioactive compounds, Epigenetic character, In ovo technology, *KLHL6*, *SYK*

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ETİK SÖZLEŞME.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Mikrobiyota.....	3
2.1.1 Bağırsak Mikrobiyota Gelişimi.....	4
2.1.2 Mikrobiyota ve İmmun Sistem.....	5
2.1.3 Bağırsak Sağlığı ve Beslenmede Gastrointestinal Mikrobiyomun Önemi.....	6
2.2. Biyoaktif bileşikler.....	7
2.2.1. Probiyotikler.....	8
2.2.2. Prebiyotikler.....	10
2.2.3. Sinbiyotikler.....	11
2.3. Biyoaktif Maddelerin Uygulanması.....	12
2.4. İn Ovo Stimulasyon.....	13
2.5. İn Ovo stimülasyonun etkileri.....	15
2.6. Biyoaktif maddelerin gen ekspresyonu üzerindeki etkisi.....	15
2.7. Epigenetik.....	17
2.8. DNA Metilasyonu.....	18
2.9. <i>Gallus gallus</i> KLHL6 Geni.....	21
2.10. <i>Gallus gallus</i> SYK Geni.....	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1. Çalışmada Kullanılan Araç ve Gereçler.....	25
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	25
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	26
3.1.3. Kullanılan Kitler.....	26

3.1.4. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Malzemeler.....	26
3.1.5. Metilasyon Spesifik Kantitatif PCR İçin Kullanılan Malzemeler.....	26
3.1.6. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	27
3.2. Biyoaktif Maddelerin İn ovo Enjeksiyonu.....	28
3.3. DNA İzolasyonu.....	29
3.4. DNA Miktar ve Saflık Tayini.....	29
3.5. Primer Seçimi.....	29
3.6. Bisüfit Modifikasyon Protokolü.....	30
3.7. Metilasyon Spesifik Kantitatif PCR.....	32
3.8. Metilasyon Spesifik Kantitatif PCR Data Analizi	33
3.9. İstatistiksel Analiz.....	34
4. BULGULAR	35
4.1. DNA İzolasyonu.....	35
4.2. CpG Bölgelerinin Tespiti.....	38
4.3. Metilasyon Spesifik Kantitatif PCR Analizleri.....	39
5. TARTIŞMA.....	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	58

TABLULAR LİSTESİ

- Tablo 1. Çalışılan genlerin metilasyon spesifik kantitatif PCR için tasarlanan primer dizileri
- Tablo 2. Bisülfıt muamelesi sonucunda oluşan deaminasyon tepkimesi
- Tablo 3. Bisülfat dönüşüm protokolü
- Tablo 4. SYBR Green I Master Karışımı
- Tablo 5. Metilasyon seviyesi için hesaplanan formül
- Tablo 6. 20 adet Green-legged Partrıdgelike cinsi tavuk karaciğerinden izole edilen DNA'ların spektrofotometrik olarak miktar tayini
- Tablo 7. 20 adet ROSS cinsi tavuk karaciğerinden izole edilen DNA'ların spektrofotometrik olarak miktar tayini
- Tablo 8. DNA metilasyon oranları

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Yaygın olarak bulunan biyoaktif bileşikler

Şekil 2. In ovo tekniğinin uygulanması

Şekil 3. Sitozinin DNMT ile 5-metilsitozine dönüştürülmesi

Şekil 4. Aktif ve inaktif promotorların kromatin yapısı

Şekil 5. *Gallus gallus* KLHL6 protein domainleri

Şekil 6. Metilasyon spesifik kantitatif PCR prensibi

Şekil 7. Green-legged Partridgelike cinsi tavukların karaciğerinden izole edilen DNA'ların %2'lik agaroz jeldeki görüntüleri

Şekil 8. ROSS cinsi tavukların karaciğerinden izole edilen DNA'ların %2'lik agaroz jeldeki görüntüleri

Şekil 9. SYK geninin CpG adası tahmininin sonucu

Şekil 10. KLHL6 geninin CpG adası tahmininin sonucu

Şekil 11. ROSS / Green-legged Partridgelike cinsi tavukların karaciğer dokularında KLHL6 geni için metilasyon spesifik kantitatif PCR ile belirlenen metilasyon oranları

Şekil 12. ROSS / Green-legged Partridgelike cinsi tavukların karaciğer dokularında SYK geni için metilasyon spesifik kantitatif PCR ile belirlenen metilasyon oranları

KISALTMA VE SEMBOLLER

°C	Santigrat derece
5-mC	5-metilsitozine
CO₂	Karbon dioksit
DNA	Deoksribo Nükleik Asit
DNMT	DNA Metiltransferaz
FOS	Frukto-Oligosakaritler
G	Gram
g/L	Litrede Gram Oluşturan Birim
GALT	Bağırsakla ilişkili lenfoid doku
GIT	Gastrointestinal Sistem
GOS	Galaktooligosakaritler
H₂O₂	Hidrojen peroksit
IgA	İmmünglobulin A
KLHL6	Kelch benzeri protein 6
L	Litre
LAB	Laktik asit bakterileri
LCT	Uzun zincirli trigliseritlere (LCT)
MCT	Orta zincirli trigliseritlerin (MCT)
Mg	Miligram
MOS	Mannan-oligosakaritleri
O₂	Oksijen
PAMP	Patojene bağlı moleküler paternler
pH	Hidrojen gücü
PRR	Örüntü tanıma reseptörleri
q-PCR	Kantitatif PCR
RFO	Rafinoz ailesi oligosakkaritleri
SAM	S-adenosilmetiyonin
SCFA	Kısa zincirli yağ asitleri
SYK	Dalak tirozin kinaz
TCR	T hücresi ön reseptörü
TLR	Toll benzeri reseptör
µl	Mikrolitre

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Biyoaktif bileşikler, doğada ortaya çıkan, esansiyel ve esansiyel olmayan bileşiklerdir (örneğin vitaminler veya polifenoller), besin zincirinin bir parçasıdır ve insan sağlığı üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir (Biesalski ve ark.,2009). Gıdalarda doğal bileşenler olarak bulunan biyoaktif maddeler, ürünün temel besin değerini oluşturur ve sağlık açısından da faydalıdır (Biesalski ve ark.,2009). Genel olarak, biyoaktif bileşiklerin çoğu, oksijen radikallerini, azot radikallerini ve organik radikalleri yakalama yetenekleriyle ortaya çıkan belirgin bir antioksidan kapasiteye sahiptir (Barba ve ark.,2013; Wootton-Beard ve ark.,2011). Biyoaktif bileşik örnekleri arasında likopen, resveratrol, lignan, tanen ve indoller bulunur.

Prebiyotikler ve probiyotikler, tek başlarına veya birlikte (sinbiyotikler), bağırsak mikrobiyotasını etkileyebilen ve immün tepkisini modüle edebilen biyoaktif bileşiklerdir. Biyoaktif maddelerin in ovo enjeksiyonu ile mikrobiyotanın modifikasyon ve modülasyonu sağlanabilir. Yumurtaya kuluçkanın 12. gününde in ovo enjeksiyon ile sinbiyotiklerin verilmesi, tavuk konağının gelecekteki sağlığına fayda sağlayan ve fizyolojik işlevlerini geliştiren yararlı bir mikrobiyota oluşumunu teşvik eder. Probiyotik olarak sınıflandırılan en büyük mikroorganizma grubu laktik asit bakterileridir (LAB). Patojenlerin bağırsak mukozasına bağlanmasını ve çoğalmasını önler. LAB ayrıca, enzimleri bağırsak lümenine salgılar. Probiyotikler olarak kullanılmak için bu bakterilerin bağırsakta hayatta kalabilmesi ve zararlı bakterilere karşı antagonistik özellikleri gösterebilmesi gerekir. Bu nedenle, probiyotik suşlarının en önemli özelliği, bağırsak epitel hücrelerine yapışma yetenekleridir. Hem prebiyotikler hem de sinbiyotikler, bağırsakla ilişkili lenfoid doku (GALT) üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir. Sinbiyotikler, GALT'ın T ve B hücreleri tarafından kolonileşmesi üzerinde güçlü bir uyarıcı etki gösterir. Sinbiyotiklerin in ovo yöntemiyle embriyoya

uygulanması, konakçı canlının büyüme hızını, yem alımı ve besinlerin sindirilebilirliği gibi özelliklerini geliştirdiği tespit edilmiştir (Bednarczyk ve ark., 2011). İn ovo yöntemiyle embriyoya uygulanan sinbiyotikler, et kalitesini arttırdığı (Maiorano ve ark., 2012), bağışıklık gelişimi (Slawinska ve ark., 2014) sağladığı ve sekal tonsil ve dalakta immün ile ilgili genlerin ekspresyonunu değiştirdiği tespit edilmiştir (Dunislawska ve ark., 2017). Bu gen modifikasyonlarının bazılarında DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmalar aracılık edebilir. Metilasyon DNA sekansını değiştirmeden bir DNA segmentinin aktivitesini değiştirebilir. DNA metilasyonu, DNA'ya bir metil grubunun eklenmesidir; örneğin sitozindeki pirimidin halkasının 5 numaralı karbonuna eklenmesi durumunda gen ifadesi azalır.

Biyoaktif bileşiklerin karaciğerdeki DNA metilasyon seviyeleri üzerindeki rolü günümüzde bilinmemektedir. Bu nedenle, önemli bir metabolik organ olarak karaciğeri araştırmayı seçtik. Karaciğer, besinlerin metabolizmasında, glukoz ve lipidlerin sentezinde, doğal bağışıklık ve detoksifikasyonda merkezi bir rol oynamaktadır. Bu çalışma kapsamında, biyoaktif maddelerin, in ovo stimülasyondan sonra karaciğerde yol açtığı epigenetik değişikliklerin incelenmesi ve *KLHL6* ve *SYK* genlerinin metilasyon profilinde bir parametre olarak kullanıp kullanılmayacağını araştırılması amaçlandı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Mikrobiyota

Bağırsak, simbiyozda konakçı ile yaşayan trilyonlarca komensal bakteriden oluşan karmaşık bir mikrobiyal ekosistemi temsil eder. Bu sinbiyotiklerin kollektif genomu, mikrobiyom olarak bilinir. Konakçı ile tavukların mikrobiyomları arasındaki etkileşimler, konakçının fizyolojik gelişiminde, beslenmesinde, sağlığında ve gıda güvenliğinde önemli bir rol oynar (Sommer ve Backhed, 2013). Kuş embriyoları, yumurta olan kapalı ve esasen steril bir ortamda gelişir. Bu nedenle, kuş bağırsağında kolonileşen ilk dış bakteri, yuvalanma ortamından ve daha sonra ebeveyn beslenmesinden kaynaklanır, ancak yumurta dönemi sırasında bakteri düşey yayılma olasılığı göz ardı edilemez (Ding ve ark., 2017; Grond ve ark., 2017). Kuşların bağırsak mikrobiyotasının, civcivlerin çevresel faktörlerden özellikle yetiştirildiği ortamdan büyük ölçüde etkilendiği düşünülmektedir (Hird ve ark., 2014). Yumurtadan çıktıktan sonraki ilk günde, sindirim sistemi kuşlarda en yoğun gelişen organdır. Yeni yumurtadan çıkmış civcivin mikrobiyomları yumurtadan çıktıktan 1 ila 3 gün sonra hızla gelişir (Ballou ve ark., 2016). Bu hızlı gelişme, bakteriler dahil, bağırsak içeriğinin hızlı hareketi ile kolaylaştırılır. Bu nedenle, tavuk mikrobiyomunun hızlı gelişimi, bağırsak bakterilerinin hızlı çoğalması ve mukozaya yapışma yetenekleriyle karakterize edilir. Kör bağırsakta, mikroorganizmaların gelişimini ve uygun bağırsak mikrobiyomunun oluşumunu teşvik eden bağırsak içeriği yavaşlar (Cisek ve ark., 2014). İn Ovo stimülasyon, perinatal dönemde komensal mikroflorası ile etkili embriyonik mikrobiyom kolonizasyonu sağlar. Dikkatlice seçilmiş bir biyoaktif formülasyon (prebiyotikler, probiyotikler veya sinbiyotikler), yumurta kuluçka gününün 12. gününde yumurtanın hava hücrelerine iletilir. Prebiyotik dış ve iç yumurta zarlarına nüfuz eder ve embriyonik bağırsaklardaki doğal mikrofloranın gelişimini uyarır. Probiyotikler, kabuk zarlarının civcivin gagaları tarafından mekanik olarak

kırılmasından sonra mevcuttur (19. Gün). İn Ovo stimülasyonundan sonra bağırsak mikroflorası rekabet dışı bırakma ve yaşam süresini programlamak için yeterince güçlüdür (Siwek ve ark., 2018).

2.1.1 Bağırsak Mikrobiyota Gelişimi

Tavuk gastrointestinal sistemi (GIT) çeşitli mikroorganizmalar tarafından kolonize edilir. Besinlerin bileşimi, pH ve oksijen içeriği gibi yerel GIT koşulları, her bir mikrobiyal grubun sayısını etkiler. Tavuk bağırsak mikrobiyotası, bakterilerin baskın olduğu, *archaea* ve mantarlar dahil olmak üzere mikrobiyal topluluklarla doludur. Spesifik bir bakteri türü kümesi, gastrointestinal sistemin belirli bir bölümünde bulunur. *Lactobacilli*, *streptokoklar* ve *enterobakteriler* ince bağırsakta kolonize olurken, kör bağırsak anaeroblar ve sadece birkaç fakültatif anaeroblar tarafından kolonize edilir (Lu ve ark. 2003).

Tavuk bağırsağı mikrobiyotasının bileşimi hayvanın yaşına, özellikle yaşamın erken dönemlerinde (embriyolardan başlayarak), genotip, tarım koşullarına / çevreye ve en önemlisi diyet ve yem katkı maddelerine bağlıdır (Binek ve ark. 2000, Hume ve ark. 2003, Lu ve ark. 2003, Kizerwetter-Świda ve Binek 2008, Zulkifli ve ark. 2009, Danzeisen ve ark., 2011). İn Ovo teknoloji, perinatal dönem olan kuşun gelişimindeki en kritik zamana odaklanır. Perinatal dönem, yumurtanın kuluçkalanmasının son günlerinden çıkımdan sonraki ilk günlere kadar sürer. Bu süre zarfında, embriyo, diyetteki (yağ bakımından ve karbonhidrat açısından zengin) değişime ve çevresel mikroplara uyum sağlamak zorundadır. İn ovo uygulaması, kuluçka döneminden önce tavuk embriyosunun manipülasyonunu kolaylaştırmak için geliştirilmiştir. Prensip, maddelerin doğrudan inkübasyon ile yumurtalara mekanik olarak enjekte edilmesine dayanır. Bu teknoloji temel olarak, Marek hastalıkları virüsü ve bulaşıcı hastalıklar dahil olmak üzere birçok bulaşıcı maddeye karşı 18 günlük embriyoların aşılması için kurulmuştur (Ricks ve ark., 1999). Aşılama dışında, prebiyotiklerin,

probiyotiklerin, sinbiyotiklerin, vitaminlerin, hormonların, karbonhidratların ve peptidlerin verilmesinde in ovo teknolojisi uygulanmıştır (Kadam ve ark., 2013, Roto ve ark., 2016). Embriyonun bu şekilde hassas olarak manipüle edilmesi, kuluçkalık civcivlerin sağlıklarını ve esnekliklerini artırır, bu da yumurtadan çıkma sonrası gelişimlerine katkıda bulunur.

2.1.2. Mikrobiyota ve İmmun Sistem

Konakçı mukozal bağışıklık sisteminin temel bir organı olarak, bağırsak görünüşte iki görevi yerine getirir: besin emilimi ve patojen savunması. Bağırsak bağışıklık sistemi, sağlam bir mukozal katman, sıkıca birbirine bağlanmış bağırsak epitel hücreleri, salgılanan ve çözünen immünoglobulin A (IgA) ve antimikrobiyal peptitler içerir. Faydalı bir mikrobiyota, konakçı bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde, fizyolojik homeostazı sağlamada ve organ gelişimi ve konakçı metabolizmasını etkilemede kilit bir role sahiptir (Sommer ve Backhed, 2013).

Bağırsak mikroorganizmalarının gastrointestinal sistemin fizyolojisi üzerinde önemli bir etkisi olduğuna ve karaciğer, böbrek, beyin, kardiyovasküler sistem ve / veya kemik sistemi dahil olmak üzere ekstra bağırsak organlarının işlevini etkileyebileceğine dair güçlü kanıtlar vardır. Gastrointestinal sistemin dışındaki organlarla iletişim (“ekstra barsak fonksiyonları”) doğrudan Toll benzeri reseptörler (TLR) aracılığıyla ve dolaylı olarak farklı bakteri metabolitleri ve sinyal molekülleri aracılığıyla gerçekleşir. TLR’ler, mikroplar tarafından ifade edilen yapısal motifleri tanıyarak patojenlere karşı doğal immün yanıtı başlatan, yüksek oranda korunmuş moleküllerden oluşan bir gruptur. Patojene bağlı moleküler paternler (PAMP’ler) olarak adlandırılan mikrobiyal enfeksiyöz antijenleri tanırlar. TLR’ler, makrofajlar, monositler, dendritik hücreler, B ve T hücreleri, mast hücreleri, NTK, nötrofiller, eozinofiller, fibroblastlar, bağırsak epitelleri, damarların endotelleri, düz kas hücreleri, vb.

gibi çok çeşitli dokularda ve hücre tiplerinde eksprese edilir. (Yılmaz ve ark., 2005; Iqbal ark., 2005; Becker ve O'Neill 2007; Kannaki ve ark., 2010). Özellikle TLR'ler, immün tepkilere katılan organlarda ve cilt, solunum yolu, bağırsak ve genitoüriner yollar, mesane, böbrek ve dalak dahil patojenlere maruz kalan dokularda bulunur (Becker ve O'Neill, 2007). Tavuklarda TLR'lerin ifadesi, organizmaların fizyolojik durumlarından güçlü bir şekilde etkilenir (Abasht ve ark. 2009; Rodríguez-Lecompte ve ark. 2012, St. Paul ve ark. 2013). Ayrıca, genetik olarak uzak tavuk hatlarının (broiler, tabaka, yerli Hint tavuğu), TLR genlerinin ekspresyonunda farklı desenler gösterdiği tespit edilmiştir (Abasht ve ark. 2009; Ramasamy ve ark. 2010).

Kanatlılarda, bağırsakta mikrobiyota ve immün yanıt arasındaki etkileşimler diğer araştırmalarla bildirilmiştir. Forder ve ark. (2007), broiler cinsi civcivlerin, konvansiyonel olarak yetiştirilmiş broiler civcivlere göre bağırsaklarında daha fazla sayıda goblet hücresi tanımlamış ve farklı müsin (mukus'un yapısında yer alan, şeker ve proteinkarışımı yapışkan bileşik) profili tespit edilmiştir ve bu farklılıklar iki grubun mikrobiyomlarındaki farklılıklardan kaynaklanmıştır. Benzer şekilde, intestinal lenfosit hücre sayıları ve lenfoid hücresel alt gruplarında, geleneksel tavuklara kıyasla germ free (mikropsuz) tavuklarda farklılıklar bildirilmiştir (Honjo ve ark., 1993). Ayrıca, kuş bağırsağı mikrobiyotasının çeşitliliğinin hem bağırsaktaki hem de dalaktaki T hücresi reseptör repertuarının karmaşıklığını etkilediği gösterilmiştir (Mwangi ve ark. 2010).

2.1.3 Bağırsak Sağlığı ve Beslenmede Gastrointestinal Mikrobiyomun Önemi

Gastrointestinal mikroorganizmalar, bağışıklık sisteminin aşırı uyarılması, intestinal mukusun enzimatik sindirimi, safranın parçalanması veya zararlı amino asit katabolitlerinin üretilmesi gibi konakçı üzerinde olumsuz etkilere neden olabilir (Gaskins ve ark., 2002), ancak 'sağlıklı' bir mikrobiyotanın, tavuğa net bir fayda sağladığı kabul edilir. Örneğin,

gastrointestinal mikrobiyal organizmaların, patojenik taksonları dışladığı (Nurmi ve ark., 1992), bağırsak mukus tabakasının gelişimini sağladığı (McCracken ve Gaskins, 1999; Shakouri ve ark., 2009), polisakaritleri parçaladığı (Beckmann ve ark., 2006; Qu ve ark., 2008), amino asit ve SCFA olarak enerji sağladığı gösterilmiştir (van der Wielen ve ark., 2000; Dunkley ve ark., 2007). SCFA, konakçı için önemli besinlerdir ve emici yüzey alanındaki artışları teşvik ettiği bilinmektedir (Dibner ve Richard, 2005). SCFA ayrıca safra katabolizmasını ve daha sonra ikincil safra asitlerine dönüşümünü inhibe edebilen kolonik pH'yı azaltır (Christl ve ark. 1997).

Bağırsak mikrobiyota üyeleri, K vitaminin yanı sıra, biotin, kobalamin, folatlar, nikotik asit, pantotenik asit, piridoksin, riboflavin ve tiamin gibi suda çözünür B vitaminlerinin çoğunu sentezleyebilirler (Ichihashi ve ark., 1992).

2.2. Biyoaktif bileşikler

Biyoaktif bileşikler, doğada ortaya çıkan, esansiyel ve esansiyel olmayan bileşiklerdir (örneğin vitaminler veya polifenoller), besin zincirinin bir parçasıdır ve insan sağlığı üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir. Biyoaktif bileşikler ayrıca insan diyetindeki varlığını ve biyolojik aktivitelerini belirleyen bir terim olan nutraceuticals (1979'da Stephan DeFelice tarafından yazılan) olarak da adlandırılır. Gıdalarda doğal bileşenler olarak bulunan biyoaktif maddeler, ürünün temel besin değerinin yanı sıra sağlık için de faydalıdır. Genel olarak, biyoaktif bileşiklerin çoğu, oksijen radikallerini, azot radikallerini ve organik radikalleri yakalama yetenekleriyle ortaya çıkan belirgin bir antioksidan kapasiteye sahiptirler. Biyoaktif bileşik örnekleri arasında likopen, resvera trol, lignan, tanen ve indoller vardır. Bu gruplar Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Yaygın olarak bulunan biyoaktif bileşikler (Barba ve ark.,2014).

2.2.1. Probiyotikler

Probiyotikler, bağırsak mikrobiyotasının doğal dengesini geliştirerek konak üzerinde olumlu bir etkisi olduğu bilinen canlı, patojenik olmayan mikroorganizmalardır. Yunanca’da “yaşam için” anlamına gelen probiyotik “bağırsak dengesini geliştirerek konakçı hayvanı olumlu yönde etkileyen canlı bir mikrobiyal yem takviyesi” olarak tanımlanmıştır (Fuller, 1989). Probiyotikler bağışıklık sistemini düzenler ve kanatlılarda enterik enfeksiyonların oranını ve şiddetini azaltır (Pan ve Yu, 2014; Getachew, 2016).

Bir mikroorganizma probiyotik olarak kabul edilirse, bir dizi gereksinimi yerine getirmelidir, yani: patojenik değildir; epitel hücrelerine yapışma yeteneği vardır; kendisini konakta kolonileştirme ve çoğaltma yeteneği vardır; gastrointestinal sistemden geçişte hayatta kalabilir; mide asiditesine ve safra içeriğine dayanıklıdır; patojenik bakterileri inhibe eden veya öldüren metabolitler üretir; in vitro olarak karakterize edilmiştir ve faydalarını ortaya

koyan in vitro ve in vivo deneylere tabi tutulmuştur. Son olarak, bir probiyotik, proses, üretim ve depolama koşulları altında canlı kalmalıdır (Kabir, 2009).

Probiyotiklerin uygulanmasından belli faydalar beklenmektedir (Syngai ve ark., 2016): yararlı mikrobiyota gelişiminin uyarılması; enterik patojenlerle kolonizasyonun azaltılması ve önlenmesi; immünolojik aktivitenin modülasyonu; epitel sağlığının uyarılması; sindirim kapasitesinin artması; ve bağırsak dokusunun olgunlaşmasına yardımcı olur.

Probiyotikler, mikrobiyotanın ilk gelişiminde veya herhangi bir diyet değişikliği veya stres sonrasında ve antibiyotik tedavisini takiben etkili olmaktadır. Bazı çalışmalar, *Lactobacillus* kültürlerini içeren probiyotiklerle beslemenin, vücut ağırlığı kazancını ve yem verimliliğini artırabildiğini ve piliçlerde ölüm oranını azaltabildiğini göstermiştir (Zulkifli ve ark, 2000; Kalavathy ve ark, 2003; Timmerman ve ark, 2006). Örneğin, 12 *Lactobacillus* suşunun bir karışımı, abdominal yağ birikmesini, serum toplam kolesterolünü, düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterolünü ve piliçlerde trigliseritleri azaltmıştır (Jin ve ark., 1998). Probiyotikler bağışıklık sistemini hem doğrudan hem de dolaylı olarak etkileyebilir. Doğrudan etki sitokin ve antikor seviyelerini artıran farklı *Lactobacillus* türleri tarafından uygulanır (Haghighi ve ark. 2006; Brisbin ve ark. 2011). Benzer şekilde, çeşitli çalışmalar probiyotiklerle tedavi edilen tavukların verilen bir antijene yanıt olarak daha fazla sayıda antikor ürettiğini göstermiştir (Brisbin ve ark. 2010). Probiyotiklerin, diğer bakterilerin büyümesini teşvik eden dolaylı etkileri de olabilir. Örneğin, *Lactobacillus agilis* ve *Lactobacillus salivarius*, bütirat üreten mikrobiyotayı uyarma ve mikrobiyota dengesini yeniden kurma yeteneğine sahiptir (Meimandipour ve ark., 2009).

Probiyotikler, bakteriyostatik ve bakterisidal maddelerin üretimini kullanarak enterik patojenlerin kolonileşmesini azaltır ve önler (Wei ve ark, 2013; Pan ve Yu, 2014). Kanatlı hayvan zincirinde probiyotik kullanımının 1973'ten bu yana uygulandığı bildirilmiştir; Nurmi ve Rantala, broiler tavuklarında *Salmonella*'nın kontrolü için kullanılmalarına öncülük

etmişlerdir (Nurmi ve Rantala, 1973) ve bu kültürlerin istihdamının azalmaya yol açtığı bildirilmiştir. Bu patojen ile kolonizasyon, kilo artışı ve yemin vücut kütlelerine daha iyi dönüşümü ile de ilişkili olan bir etkidir.

Probiyotikler, hidrojen peroksit (H_2O_2), diasetil, bakteriyosinler ve organik asitler gibi farklı metabolitlerin üretilmesini sağlayarak istenmeyen mikroorganizmaların inhibisyonunu sağlarlar. Stern ve ark. (2006), *L. Salivarius* tarafından üretilen bir bakteriyosini saflaştırmış ve bu bakteriyle inkübe edilen tavukların bağırsaklarında *C. jejuni* miktarında belirgin bir azalma olduğu tespit etmiştir (Stern ve ark. 2006). İnsan patojenik mikroorganizmalarının dışlanmasına yardımcı olan diğer bileşikler, bağırsakta pH seviyelerini azaltan ve patojen çoğalmasının hızını azaltan laktik, asetik veya propiyonik asit gibi organik asitlerdir (Blajman ve ark., 2015).

2.2.2. Prebiyotikler

Prebiyotikler, konakçı üzerinde yararlı etkileri olan, bağırsak mikrobiyotası üyelerinin büyüme ve aktivitesinin seçici olarak uyarılmasını sağlayan sindirilmeyen gıda bileşenleridir. Konakçı hayvanların mikroflorası üzerinde doğrudan etki yoluyla tavuk performansını geliştirmek ve bu yolla zararlı maddelere karşı bağırsak mukozal bariyerinin güçlendirilmesini sağlamak için prebiyotikler kullanılmıştır (Fioramonti ve ark., 2003). Prebiyotikler (çoğunlukla fruktanlar, örneğin, inulin ve fruktooligosakaritler, fakat aynı zamanda raffinöz familyası oligosakaritler ve galaktooligosakaritler de) seçici bağırsak mikrobiyotasının, özellikle bifidobakterilerin ve laktobakterilerin büyümesini seçici olarak uyarırlar (Roberfroid, 2001; Villaluenga ve ark.). Prebiyotikler, konağın sağlığını geliştirmek için sindirim sisteminde artan faydalı mikrobiyal aktiviteyi uyaran içerik maddeleri olarak tanımlanmaktadır. Prebiyotikler için tarif edilen fonksiyonlar, patojenlere bağlanmalarını, fermantasyon için substrat olarak işlev görmelerini, bağırsak lümenindeki osmozu

arttırmalarını ve ayrıca makrofajların tepkisini ve SCFA'ların üretimini dolaylı olarak uyarabilmeleri ve bağışıklık sistemini modüle edebilmeleridir (Patel ve Goyal, 2012).

Kuş besleme için iki çeşit prebiyotik tanımlanmıştır. Halihazırda kullanılanların çoğu, bir veya daha fazla şeker molekülü içeren sindirilmeyen sentetik oligosakaritler veya glukoz, ksiloz, galaktoz ve mannoz gibi basit şekerlerin bir kombinasyonudur. Mayaların hücre duvarlarında bulunan mannoz oligosakaritler, içerdikleri protein ve glukan bileşiklerinden dolayı içlerinden en önemlisi olduğu kanıtlanmıştır (Rehman ve ark., 2009). Literatürde tarif edilen diğer tür prebiyotikler, laktuloz ve laktosükroz gibi laktoz ve laktoz türevlerine karşılık gelir (van Immerseel ve ark., 2002). Önceki çalışmalarda, mannoz veya fruktoz oligosakarit ilaveli yemlerle beslenmiş tavuklarda *Salmonella* ve *E. Coli* gibi patojenik mikroorganizmaların kolonizasyonunun azaldığı gösterilmiştir (Chambers ve Gong, 2011; Stanley ve ark, 2014).

Çeşitli çalışmalar, piliç tavuklarında büyüme performansı, yem verimliliği ve bağırsak sağlığının, yararlı bakterilerin büyümesini seçici olarak uyaran diyet prebiyotikleri, sindirilmeyen karbonhidratlar ile geliştirilebileceğini göstermiştir (Xu ve ark., 2003; Yusrizal ve Chen, 2003; Yang ve ark., 2008). Örneğin, broiler tavuklarında % 0.4 frukto-oligosakaritlerle (FOS) yem takviyesi, vücut ağırlığını, yem verimliliğini, proteaz ve amilaz aktivitesini ve *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus*'un büyümesini arttırdığı gözlemlenmiştir (Xu et al., 2003). Benzer şekilde, broiler diyetlerinde mannan-oligosakaritlerin (MOS) takviyesinin enerji, protein, lif ve karbonhidrat sindirilebilirliği ve kullanımını önemli ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (Kumprecht ve Zobac, 1997; Samarasinghe ve ark., 2003; Yang ve ark., 2008).

2.2.3 Sinbiyotikler

Sinbiyotik terimi 1995'te Gibson ve Roberfroid tarafından "kolondaki bir veya sınırlı sayıdaki bakterinin aktivitesini ve/veya büyümesini uyararak konağı faydalı olarak etkileyen ve sonuç olarak konağın sağlığını geliştiren, prebiyotik ve probiyotik karışımı" olarak tanımlamışlardır (Gibson & Roberfroid 1995).

Sinbiyotikler, fermantasyon için bir substrat sağlayarak kuşların bağırsağındaki sağlığı teşvik eden organizmaların direncini ve stabilitesini geliştirmek için kullanılır. Dolayısıyla, sinbiyotikler, gastrointestinal kanallarının bakteri florasına etki ederek kuşların bağışıklık sistemini düzenleyen faktörlerdir. Elde edilen sonuçlara dayanarak, sinbiyotiklerin kullanılması, bir broiler tavuğunun bağırsak yapısını, bağırsak tarafından besin emiliminde ve iyileşmeye katkıda bulunacak şekilde önemli ölçüde etkiler.

Özetle, araştırmacılar, sinbiyotik ürünlerin, probiyotik ve prebiyotiklerin ayrı uygulanmasına kıyasla daha iyi bir etkinlik sağladığına katılmaktadır. Bu iki biyoaktif maddenin (prebiyotikler ve probiyotikler) tek bir üründe (sinbiyotik) bir araya getirilmesi, bağımsız olarak verilen prebiyotik ve probiyotiklere kıyasla sinerjistik etkilerin uygulanması yaygın bir uygulamadır (Yang ve ark., 2009).

2.3. Biyoaktif Maddelerin Uygulanması

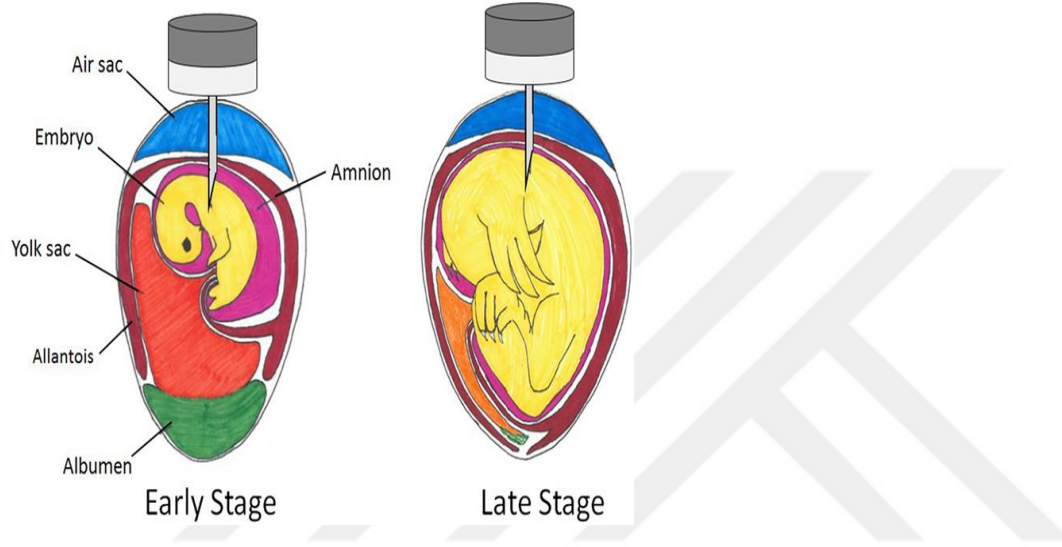
Hayvanlar ilk mikrobiyota aşılamaı anneden alır ve böylelikle mikrobiyom doğada başka bir kuşağı geçirilebilir. Yumurtadan çıkma ve doğrudan yumurtadan çıkma sırasında civcivler, yumurta kabuğunda bulunan annenin mikrobiyotasına maruz kalırlar ve bu da ilk mikrobiyal aşılama kaynağıdır (Pedroso ve ark., 2016). Mevcut ıslah ve üretim sistemleri, civcivler ve anneleri arasındaki teması ortadan kaldıran otomatik kuluçkahaneleri içermektedir (Van der Wielen ve ark. 2002). Kuluçkadan sonra, kuluçkahaneden çiftliğe

teslim edilen tavukların taşınması sırasında bakteri ile ilk aşılama elde edilir (Siwek ve diğ., 2018).

Gastrointestinal mikrobiyotasının etkin modülasyonu, biyoaktif bileşik dağıtımının yöntemine ve zamanlamasına bağlıdır. Rutin olarak, prebiyotikler, probiyotikler veya sinbiyotikler kuluçkadan hemen sonra yiyeceklerden veya sudan temin edilir. İnülin, galaktooligosakaritler (GOS), fruktooligosakaritler (FOS) ve rafinoz ailesi oligosakaritler (RFO) gibi prebiyotikler, yararlı mikrobiyotaların proliferasyonunu ve biyolojik çeşitliliğini artırarak ve optimal mikrobiyotanın proliferasyonunu artırarak, optimal bağırsak fonksiyonelliğini iyileştirmek ve korumak için kullanılır (Dunislawska ve ark, 2017). Örneğin, oligosakaritler (GOS dahil), bağırsak sisteminin alt kısmındaki pH değişikliğini tetikleyen laktik asit konsantrasyonlarını artırarak patojenik bağırsak bakterilerinin bazılarını doğrudan inhibe edebilir (Zhang ve ark., 2015). Broiler cinsi tavuk için diyetin fruktan takviyesi, vücutta yağ birikmesinde (Ammerman ve ark, 1989) ve serum kolesterol konsantrasyonunda bir düşüşe neden olur (Velasco ve ark., 2010). Diyetteki inülin takviyesi, trigliserit konsantrasyonlarını azaltarak kan serum lipidleri üzerinde faydalı bir etkiye sahiptir ve uzun zincirli trigliseritlere (LCT) kıyasla, orta zincirli trigliseritlerin (MCT) doyumluk üzerinde daha etkili olduğu gösterilmiştir. (Velasco ve ark., 2010). Yumurtadan erken çıkım sonrası biyoaktif bileşiklerle takviye desteği mikrobiyotanın etkinliğini yükseltir, çünkü bu gastrointestinal sistemin mikrobiyota tarafından ilk kez kolonileştirildiği dönemdir (kuluçkadan ikinci haftaya kadar). Alternatif olarak, prebiyotikler, probiyotikler veya sinbiyotikler, yumurta içinde tavuk embriyosuna verilebilir ve bu da etkili etkileme süresini kuluçka öncesi döneme kadar uzatır.

2.4. İn Ovo Stimülasyon

İn ovo Latince yumurta içinde anlamına gelir. Tıbbi kullanımda, insan kullanımına yönelik aşı gelişimi için tavuk yumurtası embriyolarında canlı virüs büyümesinin yanı sıra, çeşitli *Avian influenza* ve koronavirüslere karşı kümes hayvanlarının aşılanmasında etkili bir yöntemdir. İn ovo tekniğinin uygulanması Şekil 2’de gösterilmektedir.



Şekil 2. İn ovo tekniğinin uygulanması (Roto ve ark., 2016)

Son raporlar, erken yaşam mikrobiyal uyarımının, bağışıklık sisteminin olgunlaşmasını ve oral tolerans gelişimini teşvik ederek bağırsak gelişimi ve sağlığı üzerinde uzun vadeli etkileri olduğunu vurgulamaktadır. Ayrıca, mikrofloranın yaşamın erken dönemlerinde antimikrobiyaller tarafından bozulduğu, hayvan üzerinde uzun süre kalıcı olumsuz etkileri olduğu gösterilmiştir (Martin ve ark. 2010). Bu nedenle, in ovo teknolojisinde embriyonik gelişim sırasında prebiyotik, probiyotik veya sinbiyotik gibi biyoaktif bir bileşik uygulanacak şekilde adapte edilmiştir. İn ovo teknolojilerinde, bu yöntemler Roto ve ark., tarafından in ovo stimülasyonda (erken aşama embriyolar) veya in ovo beslemede (geç aşama embriyolar) belirtilir (Roto ve ark., 2016). İn ovo stimülasyonunun tavuk mikroflorasına etkileri

bildirilmiştir. Bu yöntem, yumurtanın 12. gününde, yumurtaların prebiyotik veya sinbiyotikler tarafından inkübasyonuna dayanır. Bu zaman noktasında, korioallantoik membran yüksek derecede vaskülarizedir, bu da küçük ağırlıktaki oligosakkaritlerin hava hücresinden embriyoyu çevreleyen kan damarlarına pasif bir şekilde transfer edilmesini sağlar. Prebiyotiklerin erken verilmesinin amacı, yumurtada bulunan yerli mikrofloranın büyümesini artırmaktır, böylece mikrobiyom embriyo ile birlikte gelişebilir.

Diyete prebiyotik dahil edilmesiyle, in ovo enjeksiyon, yumurtadan çıkma gününde faydalı mikroflora popülasyonunu artırır ve broiler tavuklarının yetiştirme döneminde yüksek ve stabil bir *Bifidobacteria* seviyesine yol açar (Villaluenga ve ark., 2004). Ayrıca, prebiyotiklerin erken uygulanması, diyetdeki antibiyotiklerin uygulanmasına kıyasla, yumurtadan çıktıktan sonra antibiyotik takviyesinin ortadan kaldırılmasına izin vermektedir (Bednarczyk ve ark., 2011).

2.5. İn Ovo stimülasyonun etkileri

Prebiyotiklerin tek bir in ovo enjeksiyonu veya belirli olarak seçilmiş ve karakterize edilen probiyotik bakterilerle kombinasyon halinde yapılan in ovo enjeksiyonunun (Bardowski ve Kozak, 1981; Boguslawska ve ark., 2009), büyüme özelliklerine (Bednarczyk ve ark., 2011), et kalitesine (Bednarczyk ve ark., 2011) ve broiler tavuklarının pektoral kasındaki histopatolojik değişikliklere (Bogucka ve ark., 2016; Sobolewska ve ark., 2017), sekal tonsillerde ve dalakta moleküler değişikliklere sebebiyet verdiği tespit edilmiştir (Dunislawska ve ark., 2017; Płowiec ve ark., 2015; Slawinska ve ark., 2016, 2014).

2.6. Biyoaktif maddelerin gen ekspresyonu üzerindeki etkisi

İn ovo sinbiyotiklerin uyarılması, konakçı mikrobiyomunu etkiler ve broiler tavuklarında gen ekspresyonundaki değişiklikleri dolaylı olarak etkiler. Biyoaktif bileşiklerin

tek bir ovo enjeksiyonu, konakçı mikrobiyomun doğrudan uyarılması yoluyla bakterilerle erken bağırsak temasına ve konakçı transkriptomunun modülasyonu üzerinde dolaylı bir etkiye izin verir. Örneğin, *Lactococcus lactis* probiyotik bakterilerin, RFO (Rafinoz ailesi oligosakkaritleri) prebiyotikleri ile birlikte uygulanması, Greenlegged Partridgelike cinsi tavuklarının sekal tonsillerinde ve dalağında yer alan sitokinlerin ve kemokinlerin gen ekspresyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Dalakta yer alan kemokin ve sitokin genlerin yukarı-regülasyonunu sağlarken, sekal tonsillerde yer alan kemokin ve sitokin genlerin aşağı-regülasyonuna sebep olduğu analiz edilmiştir (Sławinska ve ark., 2014).

Sławinska ve ark., GOS prebiyotikli tavuk embriyolarının in ovo stimülasyonunun, gastrointestinal sistem boyunca mikrobiyal popülasyonların gelişimine ve mukozal gen ekspresyonunda modülatör rolüne etkisi olduğunu göstermiştir. GOS'un gen ekspresyonu üzerindeki belirgin etkileri kör barsakda ortaya çıkmıştır. GOS ile tedavi edilen grubun çekumunda, sitokin genleri (IL-1, IL-10 ve IL-12p40), konak savunma peptidleri (AvBD1 ve CATHL2) ekspresyonu artmıştır. Serbest yağ asidi reseptörlerinin (FFAR2 ve FFAR4), bağırsağın her üç bölümünde (duodenum hariç) artış gösterdiği tespit edilmiştir. Glikoz taşıyıcılarının (GLUT2 ve GLUT5) oniki parmak bağırsağında ekspresyonun azaldığı, ancak arkagutta (GLUT1 ve GLUT2) arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, yumurtalıkta verilen GOS erişkin tavuklarda bifidojenik etkiye sahiptir. Ayrıca bağırsak immün yanıtları, bağırsak bariyer fonksiyonu ve besin emilimi ile ilgili gen ekspresyonunu da modüle ettiği gözlenmiştir (Sławinska ve ark. 2019).

Dunislawska ve ark., iki yeni *Lactobacillus* sinbiyotiklerini (S1 ve S2) in vitro olarak tasarlamış ve in vivo olarak test etmiştir. Sinbiyotik 1 (S1), GOS ve *Lactobacillus salivarius* ve Sinbiyotik 2 (S2), RFO ve *Lactobacillus plantarum* içerir. Sinbiyotiklerin sekal tonsillerde, dalakta immün ile ilişkili gen ekspresyonu üzerinde farklı bir etkisi olduğu gösterilmiştir (Dunislawska ve ark., 2017). Dahası, Dunislawska ve ark. tarafından elde edilen önceki

sonuçlar, in ovo tekniğiyle *Lactobacillus* sinbiyotiklerin uygulandığı tavukların dokularının transkriptomik profilini önemli ölçüde değiştirdiğini göstermiştir. Elde edilen sonuçlara dayanarak tavuklarda iki ilginç moleküler etki vardır: gen ekspresyonunun sekal tonsillerde S1 ile modülasyonu (farklı şekilde eksprese edilmiş 160 gen), karaciğerde S2 ile metabolik yollarda yer alan genlerin yukarı regüle edilmiş ekspresyonu (farklı olarak ifade edilen 159 gen).

Elde edilen sonuçlara dayanarak, in ovoda verilen sinbiyotiklerin tavuk transkriptomu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu ve etkilerinin biyoaktif bileşiğin bileşimine bağlı olduğu sonucuna varılabilir.

2.7. Epigenetik

Epigenetik, bazı genlerin ekspresyonunu açar ve bazılarını kapatır ve yaşamın çeşitli aşamalarında genotipler ile evre arasındaki mekanizmaları ve bağlantıları açıklar (Barros ve ark., 2009). Gen aktivitesinin epigenetik modülasyonu, genetik olmayan faktörlere cevap olarak oluşur, vücut ağırlığı durumu, fiziksel aktivite, diyet faktörleri ve çevresel toksinler gibi. Ek olarak, bu faktörlerin her birinin bağırsak mikrobiyomunu etkilediği düşünülmektedir. Genel ekspresyon kontrolüne aracılık etmede bu çeşitli faktörleri birbirine bağlayan birincil mekanizma kritik kofaktörler ve epigenetik işlemlerin allosterik düzenleyicileri olarak görev yapan metabolitlerin üretimidir (Paul ve ark., 2015). DNA metilasyonu, gen ekspresyonunu düzenleyen, hastalık direnci, süt üretimi gibi hayvancılık fenotipleri ile sonuçlanan önemli bir epigenetik modifikasyondur.

Vhmiko ve arkadaşları (2018), hamilelik sırasında probiyotik takviyesinin, annelerde ve çocuklarında obezite ile ilişkili genlerin DNA metilasyonu üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Probiyotik takviyenin, 37 gen promotöründe DNA metilasyon seviyelerini önemli ölçüde azalttığını ve kadınlarda bir gen promotöründe DNA metilasyon seviyelerini

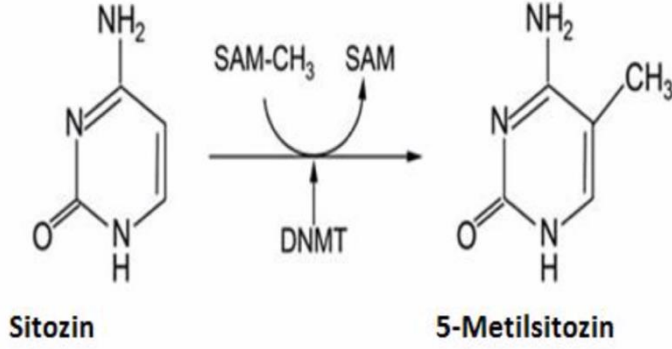
arttırdığını göstermiştir. Çocuklarında, 68 gen promotörü, probiyotik grubunda daha düşük seviyedeki DNA metilasyonu ile etkilendiği tespit edilmiştir.

Hariri ve ark. (2015), tip 2 diyabet hastalarında *L. Plantarum A7* içeren probiyotik soya sütü veya tek başına soya sütü tüketmenin etkisini araştırmıştır. Her gün deneklere normal diyetlerini tamamlamak için probiyotik soya sütü veya normal soya sütü verilmiştir. Probiyotik soya sütünün, proksimal ve distal MLH1 promotör bölgesindeki promoter metilasyon seviyelerini bazal değerlere kıyasla önemli ölçüde azalttığı, 8-hidroksi-20-deoksiguanozinin plazma konsantrasyonunun soya sütü alanlara göre anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir.

2.8 DNA Metilasyonu

Prensip olarak epigenetik modifikasyon, moleküler seviyedeki epigenetik işaretlerin doğrudan değişiklik ve modifikasyonlarından kaynaklanabilir; örneğin, en sık baskılanmış gen regülasyonu üzerinde ciddi etkileri olan DNA metilasyon modellerinde değişiklikler veya epigenetik içindeki genetik mutasyonlar gibi dolaylı mekanizmalar yoluyla düzenlenirler (Brookes ve Shi, 2014). Genetik mutasyonlar sıklıkla işlevsiz proteinlere veya tam işlev kaybına neden olurken, epigenetik modifikasyonlar gen ekspresyonunda düzenlemelere neden olur, her iki fenomen de sonuçta benzer fenotiplere yol açmaktadır. Kalıtsal veya de novo, genetik, epigenetik veya çevresel olsun, fenotip üzerinde etkisi olan her faktör hücreye mekanik bir bakış açısı sağlayabilir.

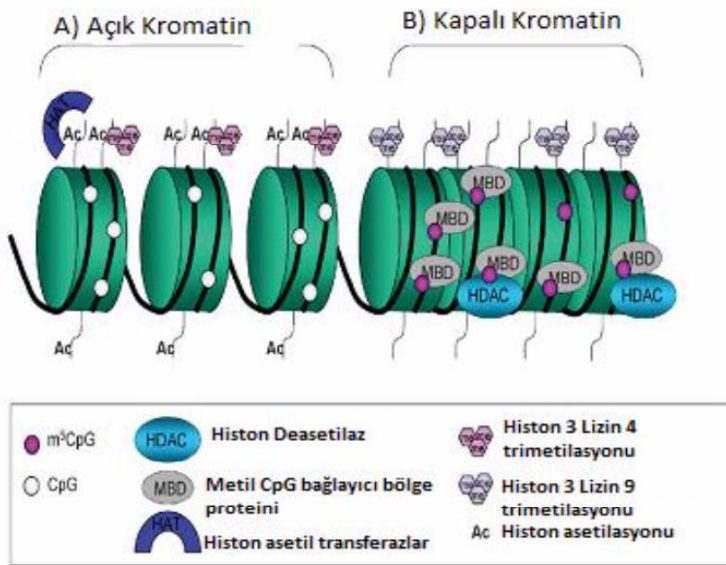
DNA metilasyonu, bugüne kadarki en iyi çalışılmış ve iyi karakterize edilmiş epigenetik modifikasyondur ve DNA metiltransferazlar (DNMT) tarafından gerçekleştirilir ve sürdürülür (Uysal ve ark., 2015). Sitozinin DNMT ile 5-metilsitozine dönüştürülmesi **Şekil 3**'te gösterilmiştir.



Şekil 3. Sitozinin DNMT ile 5-metilsitozine dönüştürülmesi (Gibney ve Nolan,2010). Burada metil vericisi olarak yine S-Adenozil Metiyonin (SAM) görev yapar.

Bilinen tüm DNA metiltransferazlar, bir metil donör olarak S-adenosilmetiyonin (SAM) kullanır. DNMT ailesinin beş üyesi vardır ve şimdiye kadar memelilerde üç aktif DNMT tanımlanmıştır; DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b. DNA metilasyonu, her bir hücre bölünmesinde, DNMT1'in, yan hücrelerin hemi-metillenmiş DNA'sı üzerindeki aktivitesi ile korunur (Landgraf ve arkadaşları, 2016). Metile edilmemiş ve metile edilmiş promotörler transkripsiyon üzerinde etkilidir. Metillenmiş promotör genellikle gen susturma işlemine yol açar. Bu gen düzenleyici mekanizma, metil gruplarını sitozin grubunun 5. karbonuna aktararak, onları 5-metilsitozine (5-mC) dönüştüren DNMT'lere dayanır. Metil grupları, hidrojen bağı oluşumuna olanak verir ve DNA'nın büyük oluğuna yerleşerek DNA'nın biyofiziksel özelliğini değiştirir. Dört nükleotidin (A, T, G, C) DNA'da 16 farklı dinükleotit çifti oluşturma ihtimali vardır. CpG çiftleri tüm genomda beklenenden daha az sıklıkla meydana gelmesine rağmen genomda yoğun olarak buldukları bölgelerde CpG adaları olarak isimlendirilir. CpG adaları ortalama 200 baz çiftinden oluşmaktadır ve CpG adaları genlerin yaklaşık %50'sinin promotör bölgelerinde bulunmaktadır. CpG adalarının evrimsel olarak korunduğu ve evrim boyunca metile sitozinlerin birçok deaminasyon olayı

nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Sitozinin deaminasyonu, okuma mekanizmalarıyla tersine çevrilebilen urasil üretirken; 5-mC'nin deaminasyonu timin oluşumuna yol açar. Dolayısıyla, sitozinin metilasyonu, CG metilasyon bölgelerinin çoğu C'den T'ye ve G'den A'ya geçiş mutasyonları için sıcak noktalar olduğu için kendiliğinden mutasyonlara neden olabilir. Bu fenomen, bazı promotörler gibi önemli düzenleyici bölgelerde genom boyunca CpG adalarının oluşumuna yol açmıştır. DNA metilasyonu, endojen retroviral genlerin ve diğer zararlı DNA uzantılarının baskılanması için özellikle önemlidir. Ayrıca, DNA metilasyonu, transkripsiyonel baskıya neden olmak için histon deasetilasyonu yoluyla kromatin modifikasyonları ile sinerjistik olarak etki edebilir. Metil-CpG bağlanma domain protein ailesi, metillenmiş CpG'lere yeniden bağlanabilir ve histon modifikasyonları ve nükleozom yeniden şekillenmesi yoluyla transkripsiyonel baskıya neden olabilir. Aktif ve inaktif promotörlerin Kromatin Yapısı Şekil 4'te gösterilmektedir. (Nan ve arkadaşları, 1998; H. H. Ng ve arkadaşları, 1999; Wade ve arkadaşları, 1999).



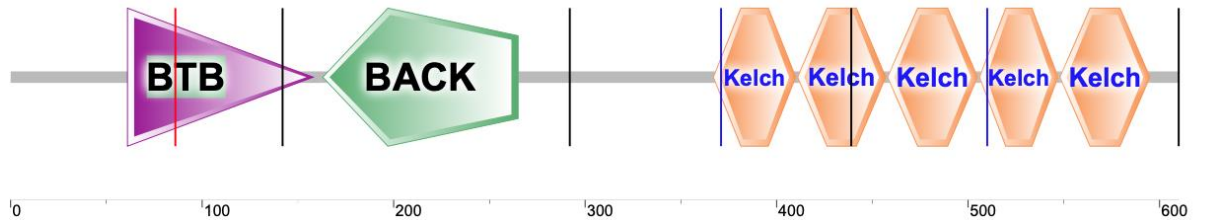
Şekil 4. Aktif ve inaktif promotörlerin kromatin yapısı. A) Transkripsiyonel olarak aktif kromatin, metillenmemiş sitozinler ve asetillenmiş histon kuyrukları ile karakterize edilir. B)

Transkripsiyonel olarak inaktif kromatin, metillenmiş sitozinler ve deasetillenmiş histon kuyrukları ile karakterize edilir (Gronbaek ve ark.,2007).

2.9. *Gallus gallus* KLHL6 Geni (Gene ID: 424762)

Kelch benzeri protein 6 (KLHL6), B lenfosit antijen reseptörü sinyalleşmesinde ve germinal-merkez B-hücresi olgunlaşmasında rol oynar (Kroll ve ark., 2005).

KLHL proteinleri genellikle bir BTB / POZ domaini, bir BACK domaini ve beş ila altı Kelch motifine sahiptir. BTB / POZ domani ile Kelch domaini süper grupları arasındaki kesişme noktasında bir alt grup oluştururlar. BTB / POZ domaini, protein bağlanmasını kolaylaştırır (Dhanao ve ark., 2013), Kelch alanı (tekrarlar) beta-pervaneleri oluşturur. Proteinlerin Kelch üst ailesi, beş gruba ayrılabilir: (1) N-pervane, C-dimer proteinleri, (2) N-pervane proteinleri, (3) pervane proteinleri, (4) N-dimer, C-pervane proteinleri, ve (5) C-pervane proteinleri. KLHL ailesi üyeleri, Kelch tekrar proteinlerinin N-dimer, C-pervane alt sınıfına aittir (Adams ve ark., 2000). BTB / POZ ve Kelch domainlerine ek olarak, KLHL ailesi üyeleri, önce BTB-Kelch proteinleri arasında gözlenen 130-kalıntı koruma alanı olarak tanımlanan bir BACK domain içerir (Stogios, 2004). Kelch benzeri proteinlerin çoğu, substratların Cul3 bazlı E3 ubiquitin ligazlarına alımı için adaptörler olarak tanımlanmıştır (Oberg ve ark., 2012). Şekil 5'te *Gallus gallus* KLHL6 protein domainleri sırasıyla BTB, BACK ve Kelch domainleri gösterilmektedir.



Şekil 5. *Gallus gallus* KLHL6 protein domainleri

https://smart.embl.de/smart/show_motifs.pl?GENOMIC=1&DO_PFAM=DO_PFAM&INCL UDE_SIGNALP=INCLUDE_SIGNALP&ID=9031.ENSGALP00000003540

Tavuk (*Gallus gallus*) KLHL6 geni 9. kromozom üzerinde yerleşiktir. 2 transkripte (splays varyant) sahiptir. İlk transkript KLHL6-202 (Transkript ID:ENSGALT00000003546.6), 6 ekzon bölgesi içermekte olup bunlardan 4 ü protein kodlamaktadır. Transkriptin uzunluğu (mRNA) 4,014 bp, translasyon (protein) uzunluğu 316 amino asittir. İkinci transkript KLHL6-201 (Transkript ID: ENSGALT00000003547.5), 7 ekzon bölgesine sahiptir ve hepsi protein kodlamaktadır. Transkriptin uzunluğu (mRNA) 2,593 bp, translasyon (protein) uzunluğu 610 amino asittir (https://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Transcript/Summary)

İnsan KLHL6 geni kromozom 3q27.1'de yerleşiktir. KLHL6 protein domainleri Şekil 5'te gösterilmektedir. İnsanda KLHL6 geni 7 ekzon bölgesi içermekte olup, 6816 kb uzunluktadır. KLHL6 geni, 4 transkripte (splays varyant) sahiptir. Bunlardan biri (TranskriptID: ENST00000341319.8) protein kodlamaktadır. Transkriptin uzunluğu (mRNA) 6,295 bps, translasyon (protein) uzunluğu 621 amino asittir (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000172578;r=3:183487551-183555706;t=ENST00000341319)

İnsan KLHL6 geni, şempanze, Rhesus maymunu, köpek, inek, fare, sıçan, zebra balığı ve kurbağada korunmuştur. *Gallus gallus* KLHL6 (610 aa) ve *Homo sapiens* KLHL6 (621 aa) arasında yapılan dizileme sonucu benzerlik 1097.4 bit bulunmuştur (https://string-db.org/cgi/protein_homology.pl?protein=3986459&taskId=L1VPiQk1Gp2M)

2.10. *Gallus gallus* SYK Geni (Gene ID: 427272)

SYK (dalak tirozin kinaz) proteininin, hücresel yapışma, doğuştan immün tanıma, trombosit aktivasyonu ve vasküler gelişme de dahil olmak üzere diğer çeşitli biyolojik

fonksiyonlara aracılık ettiğini belirten son raporlarla uyarlamalı immün reseptör sinyalleşmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Mócsai, 2010).

Tavuk (*Gallus gallus*) SYK geni kromozom Z: 44, ,075,509-44,125,480 üzerinde yerleşiktir ve 69,97 kb uzunluğundadır. 2 transkripte (splays varyant) sahiptir. İlk transkript SYK-201 (TranskriptID:ENSGALT00000032807.5), 13 ekzon bölgesi içermekte olup bunlardan 12'si protein kodlamaktadır. Transkriptin uzunluğu (mRNA) 2,459 bps, translasyon (protein) uzunluğu 613 amino asittir. İkinci transkript SYK-202 (ENSGALT00000024555.5), 7 ekzon bölgesine sahiptir ve hepsi protein kodlamaktadır. Transkriptin uzunluğu (mRNA) 1,951 bps, translasyon (protein) uzunluğu 636 amino asittir.

İnsan SYK geni kromozom 9q22.2'de yerleşiktir ve 116,76 kb uzunluğundadır. İnsanda SYK geni 14 ekzon bölgesi içermekte olup, 4990 bp uzunluktadır. SYK geni, 5 transkripte (splays varyant) sahiptir. Bunlardan dördü protein kodlamaktadır. SYK-201(ENST00000375746.1) transkriptin uzunluğu (mRNA) 4,990 bps, translasyon (protein) uzunluğu 635 amino asittir. SYK geni insan, şempanze, Rhesus maymunu, köpek, inek, fare, sıçan, zebra balığı ve kurbağada korunmuştur. *Gallus gallus* SYK (636 aa) ve *Homo sapiens* SYK (635 aa) arasında yapılan dizileme sonucu benzerlik 1063.5 bit bulunmuştur.

SYK, pro-B hücrelerinin B-öncesi hücrelere geçişinde kritik bir rol oynar (Turner 1995). SYK, BCR'ler, Fc reseptörleri ve aktifleştirici doğal öldürücü reseptörleri içeren klasik immünoresseptörler tarafından başlatılan sinyal iletimi ile büyük ölçüde ilgilidir (Tohyama 2009; Berton 2005; Crowley 1997). SYK, temel olarak ITAM'a bağlı yollarla ilişkilidir ve B hücreleri, mast hücre degranülasyonu, nötrofil ve makrofaj fagositoz ve ayrıca trombosit aktivasyonunu içeren çeşitli hücrelerin erken gelişimini ve aktivasyonunu etkiler (Zhou 2006; Tohyama 2009; Mócsai 2010). SYK'nin, yüksek afiniteli IgE reseptörü (FCER1A) toplanmasından (Wong 2004; Matsubara 2006), mast hücre aktivasyonundan, degranülasyondan ve sitokin üretiminden sonra başlatılan sinyal iletimi olaylarının

gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Matsubara 2006; Masuda 2008). SYK'nın, T hücresi ön reseptörü (TCR) sinyallemesinde önemli bir rolü olduğu bulunmuştur. Bunun, çift negatif 3'ten (DN3) erken timosit gelişiminin DN4 aşamasına geçmesi sırasında meydana geldiği bilinmektedir (Palacios 2007). Doğal bağışıklık sistemi, PAMP'leri saptamak ve bağışıklık tepkilerini aktive etmek için örüntü tanıma reseptörleri (PRR'ler) kullanır. SYK, bu yolların kilit bir bileşeni olarak bulunmuştur ve artan kanıtlar, hepsi de mikobakteriyel PAMP'lerin algılanmasında CLEC7A, CLEC6A ve CLEC4E ile birlikte, SYK-bağlı PRR'lerin bakterilerin doğal olarak tanınmasına dahil edildiğine işaret etmektedir (Geijtenbeek 2009). SYK, muhtemelen bazı virüslerin PRR aracılı tanımlanmasının sinyalleşmesinde de rol oynar.

KLHL6 ve SYK genleri immün ile ilişkili genlerdir. Bu iki gen, Dunislawska ve ark. tarafından gerçekleştirilen önceki çalışmanın mikroarray verilerine dayanarak ve biyoinformatik araçlar (Geneontology, KEGG, NCBI) kullanılarak seçildi (Dunislawska ve ark, 2019). Önceki yapılan araştırmadaki mikroarray verilerine göre, in ovo situmulasyon ile uygulanan biyoaktif maddelerin tavuk karaciğer dokusunda KLHL6 ve SYK genlerinin aşağı regülasyonuna sebep olduğu tespit edildi. KLHL6 ve SYK genleri, bu genlerin regülasyonunun epigenetik karakterini ortaya çıkarmak amacıyla seçildiler.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma, Polonya'da bulunan UTP (University of Science and Technology)'de Hayvan Biyoteknolojisi ve Genetiği Bölümü laboratuvarında gerçekleştirildi. 20 Green legged Partridgelike ve 20 ROSS cinsi tavuk karaciğer örneklerinden fenol / kloroform yöntemi kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA'lardan SYK ve KLHL6 genlerinin metilasyon seviyeleri incelendi. Metilasyon profilleri metilasyon spesifik kantitatif PCR yöntemi kullanılarak analiz edildi.

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

1. PCR Cihazı (Eppendorf) (Mastercycler Pro S)
2. Q-PCR Cihazı (Roche) (LightCycler® 480 Instrument II)
2. Elektroforez Tankı (ENDURO™ 7.7 Horizontal Gel Box)
3. Elektroforez Güç Kaynağı (ENDURO™ 250V power supply)
4. Jel Görüntüleme Sistemi (SYNGENE, G:BOX F3)
5. Bilgisayar (Monitor AOC i2369Vm, Take Me ARAMAR (TAKOBU42540))
7. Mikrodalga Fırın (PANASONIC, NN-E20JWMEPG)
8. Hassas Terazî (RADWAG AS, 220.R2)
9. Mikrosantrifüj (Mikro120, Hettich Zentrifugen D- 78 532n)
10. Vorteks (VELP Scientifica , CLASSIC Vortex Mixer)
11. Mikropipet Seti (Eppendorf (Research® plus), Axygen)
14. Buzdolabı (Mastercook LCE-818NFXW Fridge-Freezer)
15. 96-kuyucuklu PCR plaka (Axygen PCR Microplate, PCR-96-LP-FLT-C)
16. Spektrofotometre (Thermo Scientific, NanoDrop 2000)
17. Santrifüj Cihazı (Eppendorf, Centrifuge 5430 R)

18. Homojenleştirici alet (Qiagen, TissueRuptor)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Primerler (Sigma-Aldrich)
2. Agaroz (Biomax)
3. SYBR™ Green PCR Master Mix (ThermoFisher)
4. Loading dye (sigma aldrich)
5. Ethidium Bromide (Sigma aldrich)
6. EDTA (Appllichem A2937)
7. NaOH (Sigma-Aldrich 06203)

3.1.3. Kullanılan Kitler

1. EpiJET Bisulfite Conversion Kit (Thermo Scientific)

3.1.4. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Malzemeler

1. Lizis solüsyonu (1M Tris-HCl,0.5M EDTA)
2. SDS (Amresco, ABD)
3. Proteinaz K (Sigma-Aldrich)
4. Fenol kloroform izoamil alkol (Bioshop,Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol: 25:24:1)
5. 70% Etanol (Poch 396420113)

3.1.5. Metilasyon Spesifik Kantitatif PCR İçin Kullanılan Malzemeler

1. Modifikasyon reaktifleri (SolüsyonI ve SolüsyonII) (Thermo Scientific)
2. Bağlanma Tamponu (Thermo Scientific)
3. Yıkama Tamponu (Thermo Scientific)

4. Desülfantasyon Tamponu (Thermo Scientific)
5. Elüsyon tamponu (Thermo Scientific)
6. Primerler (Thermo Scientific)
7. SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Scientific)
8. Distile su (Thermo Scientific)

3.1.6. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Lizis Solüsyonu

1. Tris-HCl 1M pH8 (NaOH solüsyonu ile hazırlandı) (Gibco, ABD)
2. EDTA 0.5M pH8 (NaOH solüsyonu ile hazırlandı) (Sigma, ABD)

1.1 gr Tris ve 3.5 gr EDTA distile su ile 1 lt'ye tamamlandı. 100 µl 10M NaOH kullanılarak pH'ı 7.4' e getirildi.

Modifikasyon reaktifleri

Her bir modifikasyon reaktif tüpü 0.9 ml distile su, 200 µl Solüsyon I ve 60 µl Solüsyon II eklenerek hazırlandı. Modifikasyon reaktif tüpleri, Solüsyon I ve Solüsyon II tüpleri kitte hazır olarak bulunmaktadır.

Yıkama Tamponu

Kitte hazır olarak gelen 9 ml yıkama tamponu tüpüne 25 ml 96% etanol eklenerek hazırlandı.

Desülfantasyon Tamponu

Kitte hazır olarak gelen 9 ml yıkama tamponu tüpüne 10 ml 96% etanol eklenerek hazırlandı.

10x TBE Tamponu (1 litre)

1. Tris (54,0 g)
2. Borik Asit (27,5 g)
3. Na₂EDTA(7,44 g)

Tartılan kimyasallar distile suda çözüldü, pH 8,3'e ayarlandı ve 1 litreye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Elektroforez Yürütme Tamponu (1xTBE)

10XTBE tamponundan distile su ile seyreltilerek 1XTBE hazırlandı.

%2'lük Agaroz Jel (100ml)

2 g agaroz, 100 ml 1XTBE erlenmayer içerisine eklendi ve mikrodalga fırında 3 dakika homojen olana kadar ısıtıldı. Sıcaklığın düşmesi beklenildikten sonra 2 µl etidyum bromid (10mg/ml) eklenip hızlı bir şekilde iyice karıştırıldı ve yükleme yapılacak tarakları hazırlanmış olan kasete döküldü.

3.2. Biyoaktif Maddelerin İn ovo Enjeksiyonu

Ticari bir kuluçkahanedeki 43 haftalık Green-legged Partridgelike ve ROSS sürüsünden temin edilen döllü yumurtalar kuluçkaya yerleştirildi. Ağırlıkları yaklaşık 65 gram olan 40 adet döllü yumurta, 37.8°C'de % 61 ila % 63 bağıl nemde otomatik bir kuluçka makinesinde inkübe edildi. Döllü yumurtalar kuluçkaya yerleştirilmeden önce her biri 20 yumurtadan oluşan 4 gruba ayrıldı. Negatif kontrol (NK) grubuna herhangi bir enjeksiyon yapılmazken, pozitif kontrol (PK) grubuna % 0.9 NaCl, prebiyotik grubuna 2 mg⁻¹ oranında galaktooligosakkarit ve probiyotik grubuna 10⁵ cfu⁻¹ oranında *Lactococcus lactis subsp. cremoris* ve sinbiyotik grubuna 2 mg⁻¹ galaktooligosakkarit ve 10⁵ cfu⁻¹ oranında *Lactococcus lactis subsp. cremoris* birlikte enjekte edildi. İnkubasyon periyodununun 12.

gününde döllu yumurtalarda embriyonun ve amniyonun yeri belirlendikten sonra hazırlanan solüsyonların enjeksiyonu için hava kesesinin bulunduğu taraf %75'lik etanol yardımı ile dezenfekte edildi. Taze olarak hazırlanan solüsyonlar yumurta içi besleme prosedürüne uygun olarak steril otomatik enjektör yardımı ile yumurtanın hava kesesi boşluğu tarafından amniyon sıvısına enjekte edildi. Hava kesesi tarafında kabukta açılan delik kapatıldıktan sonra, yumurtalar kuluçka makinelerine olduğu gibi gruplandırılarak yerleştirildi.

3.3. DNA İzolasyonu

20 Ross ve 20 Green-legged Partridge cinsi tavukların karaciğer örneklerinden olmak üzere toplamda 40 numune kullanıldı. Fenol / kloroform yöntemi kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. Toplam DNA izolasyonundan önce, dokular lizis tamponu ve proteinaz K içinde TissueRuptor homojenleştirici alet ile homojenleştirildi. Lizis tamamlandıktan sonra dokular santrifüjlendi (12'000xg, 10 dakika) ve süpernatant lizis olmamış doku fragmanlarından ayrılması için yeni bir tüpe aktarıldı. Daha sonra, bir emülsiyon elde etmek için fenol-kloroform-izoamil ilave edildi ve karıştırıldı ve santrifüjlendi (13.000 x 10, 10 dakika). Ve son izolasyon basamağında DNA peleti elde edildi. DNA stokları -20 ° C'de saklandı.

3.4. DNA Miktar ve Saflık Tayini

DNA miktar ve saflık tayini için gerekli ölçümler UTP (University of Science and Technology)'de Hayvan Biyoteknolojisi ve Genetiği Bölümünde yapıldı. Ölçümler için numunelerin A230, A260 ve A280 dalga boylarında NanoDrop 2000'de absorbans ölçümleri yapıldı, A260/A280 oranı hesaplanarak DNA'nın saflığı belirlendi. DNA konsantrasyonunun hesaplanması için ölçüm sonucu elde edilen (seyreltme katsayısı) ile çarpıldı. Ekstre edilen DNA'lar %2'lik agaroz jelde görüntülendi.

3.5. Primer Seçimi

Çalışmada kullanılan primerler optimizasyonu yapılarak literatürde benzer amaçlarla kullanılan primerlerden seçildi ve gerektiğinde modifikasyonu yapıldı. Bu araştırmada çalışılması planlanan SYK ve KLHL6 genlerinin metilasyon spesifik qPCR analizi için primer dizaynları MethPrimer 2.0 primer dizileme programı ile gerçekleştirildi. Çalışılan genlerin metilasyon spesifik kantitatif PCR için tasarlanan primer dizileri Tablo 1’de gösterilmektedir.

Tablo 1. Çalışılan genlerin metilasyon spesifik kantitatif PCR için tasarlanan primer dizileri

Primer	Başlangıç	Büyükük	Tm	%GC	‘C’	Sekans
SYK	210	20	59.08	70.00	5	Sol M: TATTAGGCGTTTTTCGGGAAC
	324	24	59.52	54.17	5	Sağ M: AAATTAATACATTTACTCGCCGCT
	207	25	59.59	68.00	6	Sol U: GTTTATTAGGTGTTTTTGGGAATGA
	326	26	56.98	57.69	5	Sağ U: CCAAATTAATACATTTACTCACCCT
KLHL6	138	25	58.65	52.00	6	Sol M: TCGAGGTATTAATAGAATGAGACGG
	237	22	59.64	63.64	7	Sağ M: AAACACCAAAAAAAAAATCCCGTA
	139	25	57.00	48.00	5	Sol U: TTGAGGTATTAATAGAATGAGATGG
	240	25	59.60	64.00	8	Sağ U: CTAAAACACCAAAAAAAAAATCCCAT

Tm: Erime Sıcaklığı, GC%:Yüzdelik GC oranı, C: Sitozinler

3.6. Bisülfite Modifikasyon Protokolü

İzole edilen DNA’ların modifikasyonu Thermo Scientific EpiJET Bisülfite Modifikasyon Kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği yöntemle modifiye edilerek gerçekleştirildi. Bisülfite reaksiyonunda, metillenmiş sitozinler değişmeden kalırken, metillenmemiş sitozinler demaninasyon sonucu urasile dönüştü ve PCR sonucunda urasiller

timin olarak replike oldu (Herman ve ark.,1996; Momparler ve Bovenzi,2000). Bisülfıt muamelesi sonucunda oluşan deaminasyon tepkimesi Tablo 2’de gösterilmektedir.

Tablo 2. Bisülfıt muamelesi sonucunda oluşan deaminasyon tepkimesi

DNA dizisi	N-MC-G-N-C-G-N
Bisülfıt Muamelesi Sonrası	N-MC-G-N-U-G-N
PCR Sonrası	N- C-G-N-T-G-N

Termal DNA denatürasyonunu ve bislfıt dönüşüm reaksiyonları bir aşamada birleştirildi. Bu aşama uzun protokolü takiben gerçekleştirildi, 25 ng / μ l saflaştırılmış genomik 20 μ L DNA rneği bir PCR tüpüne eklendi. 120 μ L hazırlanmış modifikasyon reaktif zeltisi 20 μ L DNA rneği bulunan PCR tüpüne eklendi. Örnekler pipetaj yöntemi ile karıştırıldı, PCR tüpleri bir termal dngleyiciye yerleştirildi ve DNA’nın denatürasyonunu ve bisülfat dönüşümünü gerçekleştirmek için uygulanan protokol Tablo 3’de gösterilmektedir.

Tablo 3. Bisülfat dönüşüm protokolü

Protokol:
1) 98 ° C / 10 dak.
2) 60 ° C / 150 dk

Dönüştürülen DNA, ardından DNA saflaştırma aşamaları için bir mikro kolon membranına bağlandı: toplama tüpüne yerleştirilen DNA saflaştırma mikro kolonuna 400 μ L bağlama tamponu ilave edildi. Dönüştürülen DNA rneği kolondaki bağlama tamponuna yüklendi ve pipetleme yöntemi ile tamamen karıştırıldı. Toplama tüpüne yerleştirilen mikro kolon 12.000 rpm’de 30 saniye santrifüjlendi. Mikro sütün aynı toplama tüpüne yerleştirildi.

200 µL etanol ile hazırlanmış yıkama tamponu, mikro sütuna eklendi ve 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüjlendi. Mikro sütuna 200 µL desülfonasyon tampon eklendi ve bu kolon 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Toplama tüpüne yerleştirilen mikro sütun 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüjlendi. Mikro sütuna 200 µL yıkama tamponu eklendi ve 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüjlendi. Mikro kolon aynı toplama tüpüne yerleştirilirdi. Dönüştürülen DNA, 20 ul elüsyon tamponu kullanılarak elde edildi ve Metilasyon Spesifik Kantitatif PCR için kullanıldı.

3.7. Metilasyon Spesifik Kantitatif PCR

Metilasyon Spesifik Kantitatif PCR, DNA metilasyonunun gen / sekansa spesifik tespiti için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Bu tahlil, DNA'nın sodyum bisülfid tarafından başlangıçta modifiye edilmesini gerektirir, metillenmemiş sitozinleri urasil'e dönüştürür ve ardından metillenmiş diziler, metilasyon için spesifik primerlerle seçici bir şekilde çoğaltılır.

Gen ekspresyon analizleri için, SYBR Green I master mix ile LightCycler 480 programı kullanıldı ve Roche LightCycler 480 Instrument cihazında qPCR yapıldı. Kısaca, 96 kuyucuklu bir plaka içerisinde qPCR reaksiyonu için kullanılan SYBR Green I master karışımı Tablo 4'de gösterilmektedir.

Tablo 4. SYBR Green I Master Karışımı

1 µl primer
1 µl sterilize edilmiş su
2 µl DNA
5 ul SYBR® Green I

Çoğaltılmış PCR ürününün özgüllüğü, bir erime eğrisi analizi yapılarak değerlendirildi. Elde edilen erime eğrileri, primer dimerler ve spesifik ürün arasında ayırım yapılmasına izin verir. CpG adalarının DNA metilasyon durumunun profili, genlerin epigenetik düzenini anlamak için çok önemlidir. Metillenmiş sitozinler sitozin olarak kalırken, metillenmemiş sitozinler bisülfid işlemi ile timine dönüştürüldü. Sitozin ve timin sayısı bir pozisyonda sayıldı ve metilasyon seviyesi için hesaplanan formül Tablo 5’de gösterilmektedir.

Tablo 5. Metilasyon seviyesi için hesaplanan formül

$\% \text{ Metilasyon} = 100 (M / M + U)$
M = metillenmiş U = metillenmemiş

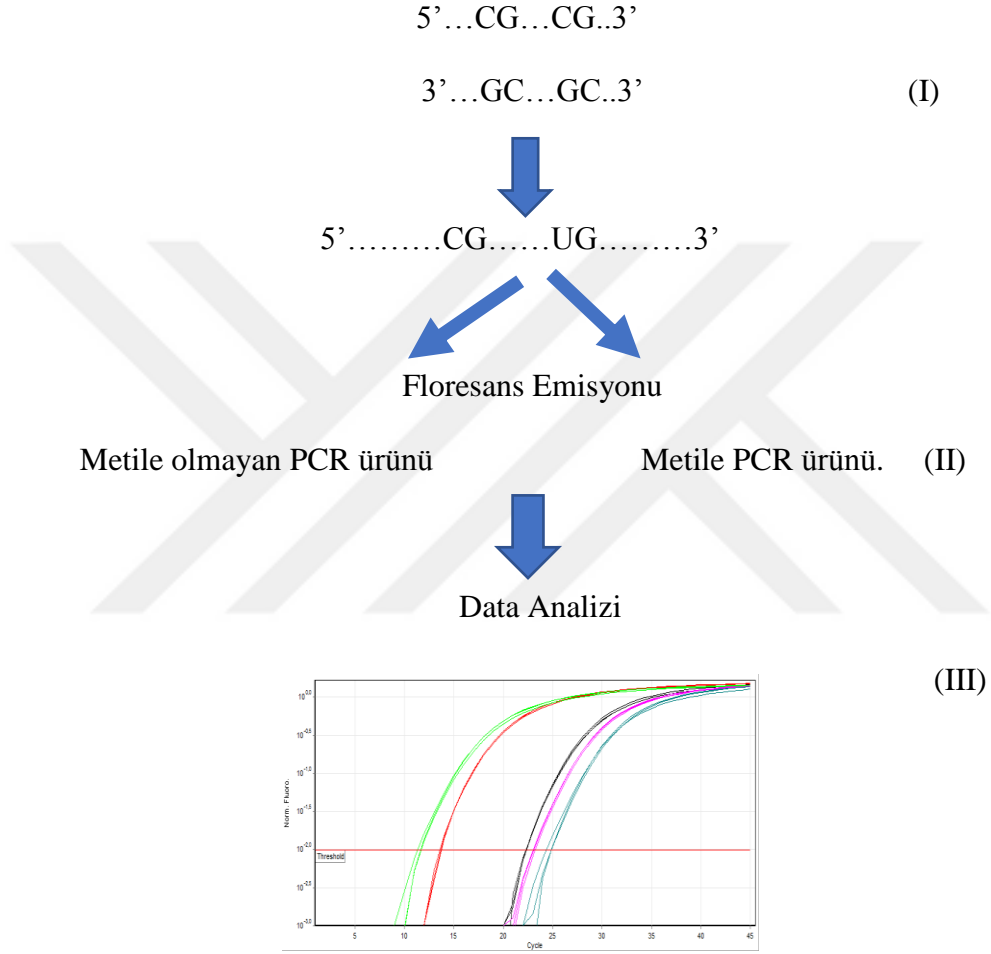
3.8. Metilasyon Spesifik Kantitatif PCR Data Analizi

Dönüşüm için, genomik DNA, metillenmiş sitozinler değişmeden kalırken, metillenmemiş sitozinleri urasile dönüştüren bisülfid ile muamele edildi. Metillenmiş spesifik (M) primerleri, sadece metillenmiş diziyi çoğaltabilir. Metile edilmemiş spesifik (U) primerleri, yalnızca metillenmemiş diziyi çoğaltabilir. M primer, metillenmemiş diziyi eklenirse, dizi farklılığından dolayı amplifikasyon gözlenmez ve bunun tersi de geçerlidir. Metilasyon spesifik kantitatif PCR prensibi Şekil 6’da gösterilmektedir.

3.9. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın sonuçları istatistiksel yöntemlerle değerlendirilerek hipoteze uygunluk bakımından test edildi. İstatistiksel analizler için, Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, Version 20.0) kullanıldı. Parametreler arasındaki ilişki Fisher’s exact ve t-testleriyle değerlendirildi. P değeri 0.05 den küçük olan değerler anlamlı kabul edildi. MSP’nin

sensitivitesi ve spesifisitesi sırasıyla pozitif testlerin toplam katılımcı sayısına bölünmesi ve negative testlerin toplam katılımcı sayısına bölünmesiyle elde edildi.

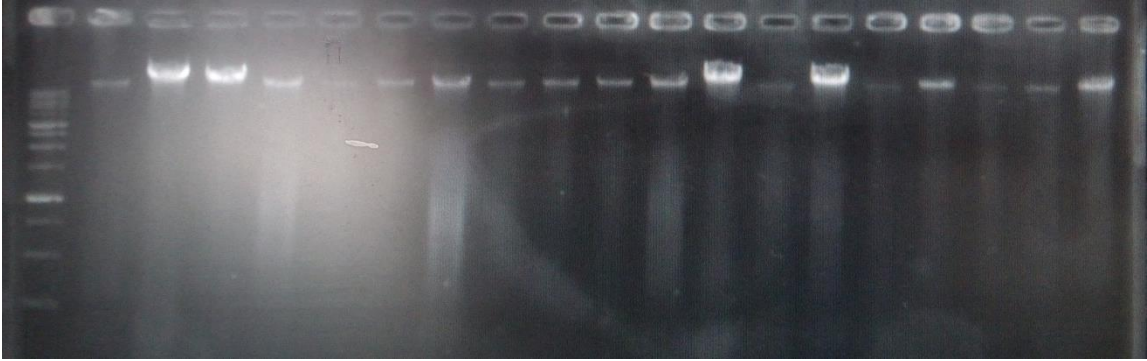


Şekil 6. Metilasyon spesifik kantitatif PCR prensibi. (I) Bisülfite dönüşümü: sitozin deamine olurken, metillenmiş sitosinler etkilenmez. (II) Normalizasyon domaini içeren ters primerlerle PCR yapılır. (III) Veri analiz edilir.

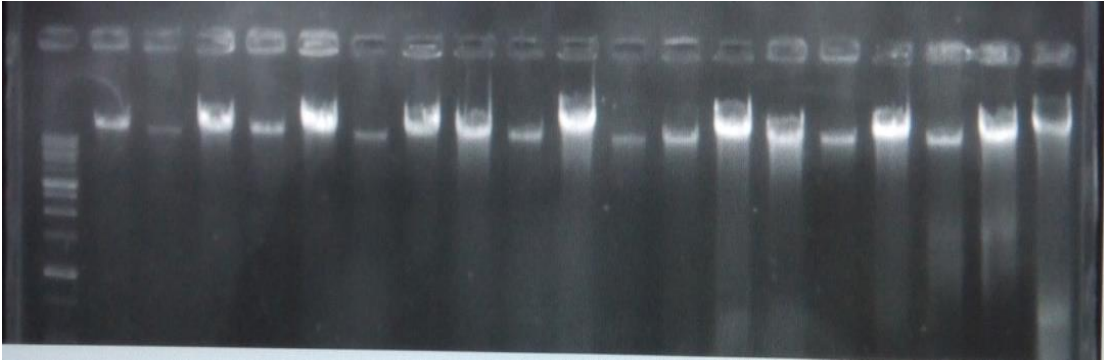
4. BULGULAR

4.1. DNA İzolasyonu

20 tane Green-legged Partridgelike ve 20 tane ROSS cinsi tavuk karaciğeri örneklerinden fenol / kloroform yöntemi kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA'lar %2'lik agaroz jelde 100 voltta 45 dakika yürütülerek görüntülendi ve spektrofotometrik olarak miktar tayini yapıldı. Green-legged Partridgelike ve ROSS tavuk karaciğeri örneklerinden ekstrakte edilen DNA'ların %2'lik agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 7 ve Şekil 8 de gösterilmektedir. Her numunenin DNA konsantrasyonu, bir NanoDrop 2000 spektrofotometresi kullanılarak 260 nm'de UV absorpsiyonu ölçüldü. DNA konsantrasyonu sonuçları Tablo 3 ve Tablo 4 de gösterilmiştir.



Şekil 7. Green-legged Partridgelike cinsi tavukların karaciğerinden izole edilen DNA'ların %2'lik agaroz jeldeki görüntüleri.



Şekil 8. ROSS tavuk cinsi tavukların karaciğerinden izole edilen DNA'ların %2'lik agaroz jeldeki görüntüleri.

Tablo 6. 20 adet Green-legged Partridgelike cinsi tavuk karaciğerinden izole edilen

DNA'ların spektrofotometrik olarak miktar tayini

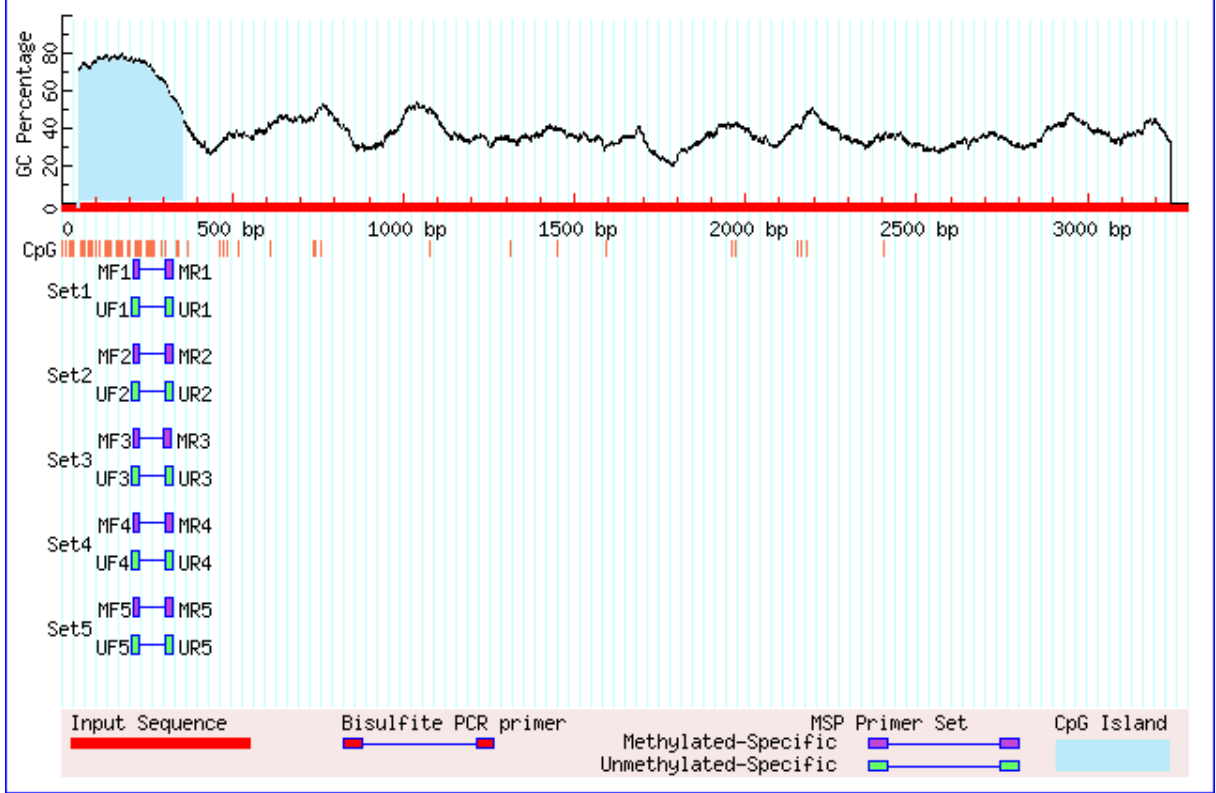
Örnek (DNA)	Miktar (ng/µl)	260/280	260/230
1-10W	388,1	1,8	1,87
1-14W	484	1,9	1,99
1-22W	577,7	1,93	1,91
1-28W	620,2	1,91	1,9
1-64W	254,1	1,7	1,87
2-60W	159,5	1,72	1,93
2-38W	335,5	1,76	1,85
2-49W	612,7	1,91	1,82
2-34W	639,8	1,88	1,71
2-42W	1011,9	1,74	1,64
3-05W	226,2	1,7	1,87
3-11W	296,6	1,71	1,86
3-28W	292,2	1,7	1,89
3-02W	665,7	1,72	1,22
3-29W	633,6	1,78	1,35
4-05W	289,6	1,69	1,51
4-22W	333,4	1,7	1,75
4-41W	127	1,58	1,85
4-51W	486,2	1,84	1,81
4-53W	302,9	1,69	1,77

Tablo 7. 20 adet ROSS cinsi tavuk karaciğerinden izole edilen DNA'ların spektrofotometrik olarak miktar tayini

Örnek (DNA)	Miktar (ng/μl)	260/280	260/230
1-60W	356,9	1,74	1,73
1-31W	298,8	1,7	1,76
1-12W	256,5	1,67	1,76
1-62W	453,1	1,83	1,81
1-51W	379	1,8	1,79
2-37W	1159,6	1,84	1,78
2-57W	1978,2	1,85	1,77
2-55W	222,1	1,58	1,74
2-19W	430,8	1,79	1,68
2-35W	972,3	1,64	1,84
3-32W	353,1	1,73	1,69
3-36W	386,8	1,77	1,66
3-42W	392,4	1,76	1,7
3-47W	539,7	1,9	1,84
3-53W	311,5	1,65	1,65
4-02W	343,5	1,72	1,75
4-20W	480,5	1,8	1,64
4-32W	137	1,53	1,64
4-43W	790,5	1,83	1,62
4-55W	378,6	1,73	1,75

4.2. CpG Bölgelerinin Tespiti

MSP qPCR için CpG adaları bölgeleri MethPrimer 2.0 programı ile tespit edildi. SYK ve KLHL6 genlerinin CpG adası tahmininin sonucu Şekil 9 ve 10'da gösterilmektedir.



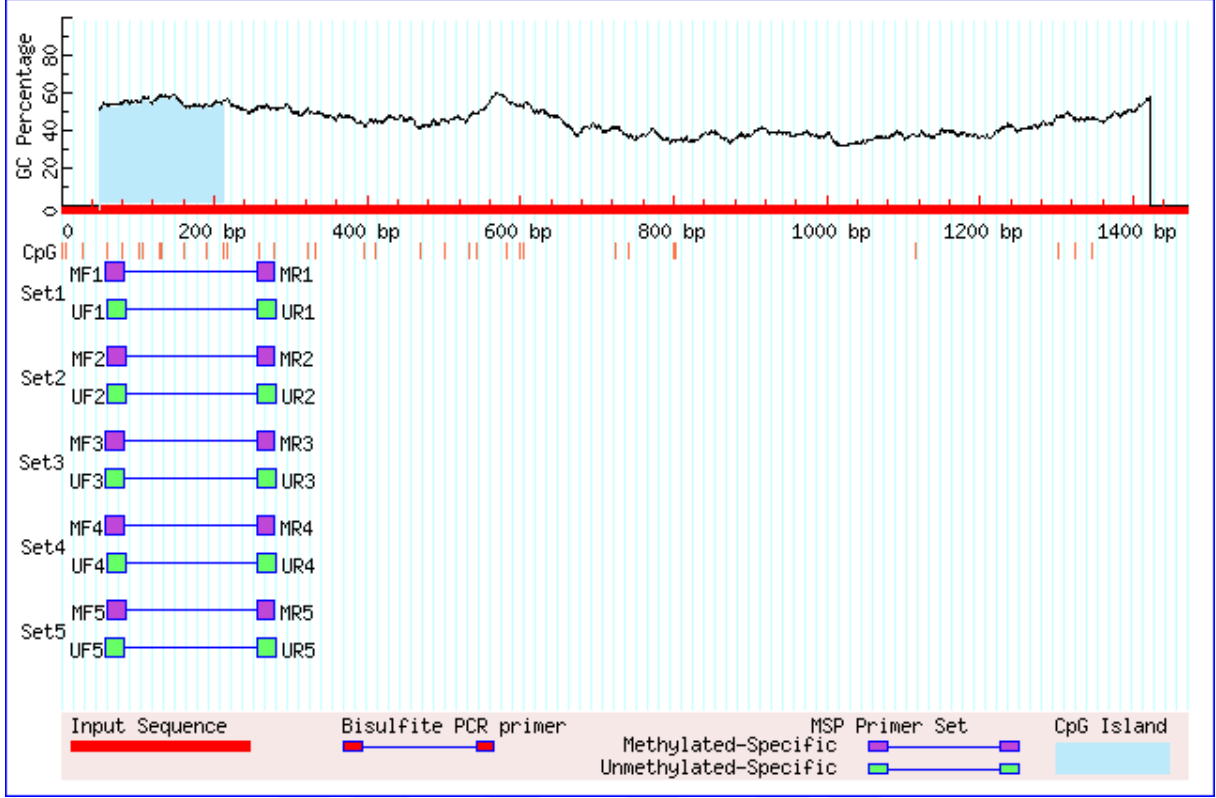
Şekil 9. SYK geninin CpG adası tahmininin sonucu. Sekans adı: NC_006127.5:44075480-44127404 Gallus gallus breed Red Jungle Fowl isolate RJF #256 chromosome Z, GRCg6a. Sekans uzunluğu 3290.

CpG ada bölgeleri:

1 tane CpG ada bölgesi tespit edildi.

Büyüklüğü (Başlangıç-Bitiş)

Ada 1 305 bp (47 – 351)



Şekil 10. KLHL6 geninin CpG adası tahmininin sonucu. Sekansın adı: NC_006096.5:c2746826-2728412 Gallus gallus breed Red Jungle Fowl isolate RJF #256 chromosome 9, GRCg6a. Sekansın uzunluğu: 1470.

CpG ada bölgeleri:

1 tane CpG ada bölgesi tespit edildi.

Büyüklüğü _____ (Başlangıç-Bitiş)

Ada 1 162 bp (50 – 211)

4.4. Metilasyon Spesifik Kantitatif PCR Analizleri

20 ROSS karaciğer örneğinden ve 20 Green-legged Partridgelike örneğinden izole edilen DNA'lar, KLHL6 ve SYK genlerin metilasyon durumunu belirlemek için Metilasyon Spesifik Q-PCR ile analiz edildi. Her numune için analiz 96 kuyucuklu plakalarda yapıldı ve

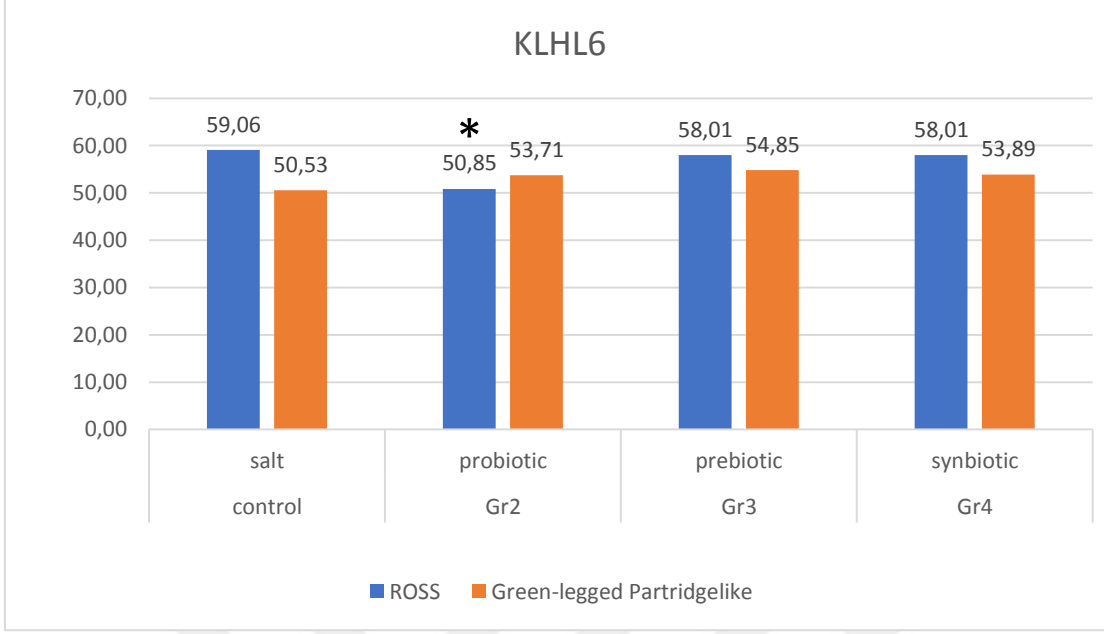
istatistiki analizlerde plakaların ROSS / Green-legged Partridgelike oranının medyan değeri kullanıldı. İstatistik analizleri **Tablo 5**'te gösterilmektedir.

Tablo 8. DNA metilasyon oranları. Prebiyotik (galaktooligosakarit), probiyotik (*Lactococcus lactis subsp. Cremoris*), sinbiyotiklerin (probiyotik ve prebiyotik kombinasyonu) SYK ve KLHL6 genlerinin metilasyon seviyeleri üzerinde etkisi

Cins	Grup	Biyoaktif Madde	KLHL6	t-test	SYK	t-test
ROSS	kontrol	NaCl	59,06		1,06	
	Grup 2	probiyotik	50,85	0,022	3,67	0,096
	Grup 3	prebiyotik	58,01	0,381	14,11	0,013
	Grup 4	sinbiyotik	63,36	0,322	0,79	0,200
Green-legged Partridgelike	kontrol	NaCl	50,53		9,32	
	Grup 2	probiyotik	53,71	0,110	2,02	0,033
	Grup 3	prebiyotik	54,85	0,092	15,72	0,117
	Grup 4	sinbiyotik	53,89	0,157	3,71	0,092

KLHL6 Geninin Metilasyon Spesifik Kantitatif PCR Sonuçları

Prebiyotik (galaktooligosakarit), probiyotik (*Lactococcus lactis subsp. cremoris*), sinbiyotiklerin (probiyotik ve prebiyotik kombinasyonu) KLHL6'nın metilasyon seviyeleri üzerine etkisi incelendi. ROSS cinsi tavuk karaciğer örneklerinden, 2. Grup *Lactococcus lactis subsp. cremoris* (probiyotik) ile muamele edilen karaciğer numunelerinden oluşmaktadır ve bu grupta KLHL6 metilasyonu anlamlı şekilde artmıştır. KLHL6 geninin ekspresyon profili, Şekil 11'de sunulmaktadır.

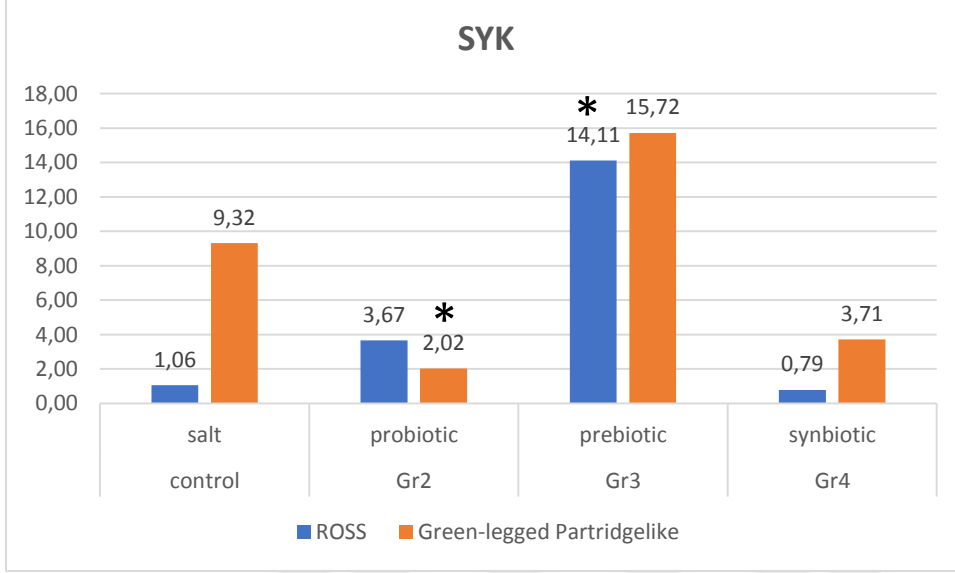


Şekil 11. ROSS / Green-legged Partridge cinsi tavukların karaciğer dokularında KLHL6 geni için metilasyon spesifik kantitatif PCR ile belirlenen metilasyon oranları. Grup2, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* (probiyotik) ile muamele edilen karaciğer numuneleri; Grup3, galaktooligosakarit (prebiyotik) ile muamele edilen karaciğer numuneleri; Grup 4, sinbiyotik (probiyotik ve prebiyotik kombinasyonu) ile muamele edilen karaciğer numuneleri. (* P değeri 0,05'den küçüktür, istatistiksel olarak anlamlıdır)

SYK Geninin Metilasyon Spesifik Kantitatif PCR Sonuçları

Prebiyotik (galaktooligosakarit), probiyotik (*Lactococcus lactis subsp. cremoris*), sinbiyotiklerin (probiyotik ve prebiyotik kombinasyonu) SYK'nın metilasyon seviyeleri üzerine etkisi tespit edildi. Green-legged Partridge cinsi tavuk karaciğer örneklerinden, 2. Grup *Lactococcus lactis subsp. cremoris* (probiyotik) ile muamele edilen karaciğer numunelerinden oluşmaktadır ve bu grupta SYK metilasyonu anlamlı şekilde artmıştır. Bununla birlikte, SYK metilasyonu galaktooligosakarit (prebiyotik) ile muamele edilen ROSS

cinsi tavuk karaciğer numularından oluşan 3. Grubunda arttığı analiz edildi. SYK geninin ekspresyon profili, Şekil 12’de sunulmaktadır.



Şekil 12. ROSS / Green-legged Partridge cinsi tavukların karaciğer dokularında SYK geni için metilasyon spesifik kantitatif PCR ile belirlenen metilasyon oranları. Grup2, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* (probiyotik) ile muamele edilen karaciğer numunelerinden; Grup3, galaktooligosakarit (probiyotik) ile muamele edilen karaciğer numunelerinden; Grup 4, sinbiyotik (probiyotik ve prebiyotik kombinasyonu) ile muamele edilen karaciğer numuneleri. (* P değeri 0,05’den küçüktür, istatistiksel olarak anlamlıdır)

5.TARTIŞMA

Bu çalışmada, Ross ve Green-legged Partridgelike cinsi tavuklarından toplanan karaciğer dokularında seçilmiş iki genin yumurta inkübasyonunun 12. gününde enjekte edilen prebiyotiklerin, probiyotiklerin ve sinbiyotiklerin, DNA metilasyon profili üzerinde moleküler etkisinin sonuçları sunulmuştur.

Bu araştırmada, transkriptom modülasyonunun moleküler analizi karaciğer dokularında gerçekleştirilmiştir. Metabolik doku, Ross ve Green-legged Partridgelike tavuklarında, prebiyotiklerin, probiyotiklerin ve sinbiyotiklerin in ovoda fenotipik etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmaları anlamak için seçildi. Karaciğer, doğuştan gelen bağışıklık, enerji metabolizması ve detoksifikasyon da dahil olmak üzere birçok fizyolojik proseste yer alan önemli bir metabolik organdır. Sevane ve ark. (2014) kanatlı beslenmesinde prebiyotik uygulamasının lipidlerin hepatik metabolizmasını etkileyebileceğini belirtmiştir.

Prebiyotik / probiyotik / sinbiyotiklerin tavuk mikrobiyotası üzerindeki epigenetik etkisi

Epigenom ve mikrobiyom, çevreye adapte olup diyet gibi faktörlerle değişmektedir. Her ikisi de gen ifadesini de değiştirebilir (Majnik ve Lane, 2015).

Mikrobiyomu değiştirmenin bir yolu diyet ve probiyotik kullanımıdır. Probiyotikler, tüketilen ve sağlık yararı sağladığına inanılan bakterilerdir. Probiyotiklerin etkilerini ve epigenomu nasıl değiştirdiklerini araştıran araştırmalar devam etmektedir. Ghadimi ve ark., probiyotiklerin iki ortak bileşeni olan *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus*'un iltihaplanma ve epigenetik üzerindeki etkilerini araştırmıştır (Ghadimi et al., 2012). Bu bakterilerin uygulanması ile, enflamatuvar barsak hastalığının patogenezinde rol alan LPS kaynaklı proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu azalmıştır. Önemli olarak, DNA metilasyonu artmış ve sitokin genlerinde histon asetilasyonu azalmıştır (Ghadimi et al., 2012). Bu veriler, bazı

bakterilerin sağlık etkilerinin, epigenetikteki değişiklikler ve ardından gen ekspresyonu yoluyla başlatılabileceğini göstermektedir (Majnik ve Lane, 2015).

Bu çalışmanın sonuçları, galakto-oligosakaritin (bir prebiyotik), *Lactococcus lactis subsp. cremoris* (probiyotik) veya *L. Lactis subsp. Cremoris* ile desteklenmiş galakto-oligosakarit (sinbiyotik) embriyonik gelişimin 12. gününde in ovo uygulamasıyla enjekte edilmesinin, Ross ve Greenlegged-Partridgelike cinsi tavukların karaciğerlerinde immün ile ilişkili genlerin metilasyon seviyelerinde artışa neden olduğu tespit edildi.

Gruplar arasında metilasyon paterninde farklılıklar: prebiyotik / probiyotik veya sinbiyotik

nceki deneylerden elde edilen sonuçlara dayanarak, in ovo metoduyla yapılan sinbiyotik enjeksiyonun, çoğunlukla bağışıklık sistemi ile bağlantılı genlerle ilgili gen ekspresyonunun aşağı regülasyonuna neden olduğu anlaşılmıştır (Dunislawska ve ark. 2017; Płowiec ve ark. 2015). Bu çalışmada, prebiyotiklerin, probiyotiklerin ve sinbiyotiklerin in ovoya verilmesinin, farklı grupların karaciğerinde KLHL6 ve SYK gen ekspresyonunun güçlü bir negatif modülasyonuna neden olduğu analiz edildi. Ross karaciğer örneklerinde, KLHL6 gen metilasyonu, probiyotik grubunda anlamlı olarak artarken, SYK, prebiyotikte anlamlı şekilde artmış olduğu analiz edildi. Green legged Partridgelike cinsi tavuk karaciğer numunelerinde, probiyotik grubunda SYK gen metilasyonunun anlamlı olarak artmış olduğu tespit edildi.

İki genotip arasındaki metilasyon paternindeki farklılıklar: Ross ve Green legged-Partridge Like

Organizmanın bakteri verilmesine verdiği yanıtın özgüllüğü, hücre duvarlarının yapısından da etkilenebilir. İnce, kolay sindirilebilir bir hücre duvarı ile karakterize edilen

Lactobacillus bakterileri organizmanın anti-enflamatuar bir tepkisini indüklerken, kalın ve sindirilmesi zor bir duvarı olan bakteriler bir proinflamatuar tepkimeyi aktive eder (Shida vd. 2009). Önceki çalışmaların sonuçlarında, *Lactobacillus* synbiotics'in bağışıklık ile ilgili genlerin gen ekspresyon düzeyi ile ölçülen tavuklarda farklı immünomodülatör etkiler gösterdiğini doğrulanmıştır (Dunislawska ve ark. 2017). Bu çalışmada Ross karaciğer örneklerinde, KLHL6 gen metilasyonu, probiyotik grubunda anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir. Aşağı regülasyondaki bu açık desen, Green legged Partridgelike cinsi tavuk karaciğer numunelerinde gözlenmemiştir.

Bu etkiler, organizma üzerinde tek başlarına birlikte alındıklarında tek başına verildiklerinde farklı etkiler gösteren prebiyotik ve probiyotik içeren sinbiyotikler için daha karmaşıktır.

Karaciğerdeki belirli genlerin metilasyonu -gen fonksiyonu ile ilişkisi

KLHL6 ve SYK, immün ile ilişkili genlerdir. SYK, B hücresi reseptörü (BCR) gibi klasik immünoreseptörleri içeren çeşitli transmembran reseptörlerinin akış aşağısında sinyal iletimine aracılık eder. Doğal ve adaptif bağışıklık, hücre adezyonu, osteoklast olgunlaşması, trombosit aktivasyonu ve damar gelişimi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçleri düzenler. KLHL6, B lenfosit antijen reseptörü sinyalleme ve germinal merkez B-hücresi olgunlaşmasında rol alan KLHL protein ailesinin bir üyesini kodlar. DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmaların, gen ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir. Bazı aday genlerin DNA metilasyonu, dokularda ölçüldüğü zaman biyoaktif maddelerin epigenetik etkisi hakkında bilgi verici olabilir ve biomarker olarak kullanılabilir. KLHL6 ve SYK genleri, birçok farklı hücre tipinin proliferasyonunun, hayatta kalmasının ve farklılaşmasının düzenlenmesinde ve ayrıca doğal ve adaptif bağışıklık, hücre adezyonu ve B-hücresi olgunlaşmasında rol oynar. SYK ve KLHL6, bağışıklık ile ilişkili genler, önceki deneydeki

(Dunislawska 2019) mikroarray verilerine dayanarak, biyoinformatik araçlar (Geneontology, KEGG, NCBI) kullanılarak seçilmiştir. Karaciğerdeki KLHL6 ve SYK ekspresyonu ve fonksiyonu, KLHL6 ve SYK geninin metilasyon profilinden etkilenmektedir. Eğer karaciğerdeki KLHL6 ve SYK genlerin metilasyon profili biomarker olarak değerlendirilirse, immun ile ilgili yollara etkisi konusunda bilgi verebileceği kanaatindeyiz.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, UTP Üniversitesi Fen Fakültesi biyoloji laboratuvarında, Green legged Partridgelike ve ROSS cinsi tavuk karaciğerinden alınan numuler kullanılarak gerçekleştirildi. Toplamda 20 adet Green legged Partridgelike ve 20 adet ROSS cinsi tavuk karaciğerinden DNA izolasyonu yapıldı ve Prebiyotik (galaktooligosakarit), probiyotik (*Lactococcus lactis subsp. cremoris*), sinbiyotiklerin (probiyotik ve prebiyotik kombinasyonu) SYK ve KLHL6 genlerinin metilasyon seviyeleri üzerinde etkisi incelendi. SYK ve KLHL6 genlerinin metilasyonu istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Bu çalışmada biyoaktif maddelerin KLHL6 ve SYK genlerin metilasyon profilinde bir parametre olarak kullanıp kullanılamayacağını araştırılması amaçlandı. Karaciğerdeki KLHL6 ve SYK ekspresyonu ve fonksiyonu, KLHL6 ve SYK geninin metilasyon profilinden etkilenmektedir. Eğer karaciğerdeki KLHL6 ve SYK genlerin metilasyon profili biomarker olarak değerlendirilirse, immünle ilgili yollara etkisi konusunda bilgi verebileceği kanaatindeyiz. Sinbiyotiklerin in ovo yöntemi ile uygulanması, GALT ile faydalı bakteriler arasında erken teması sağlar ve tolerans mekanizmalarının geliştirilmesini destekler. Bu fenomen, bu çalışmada belirlenen, karaciğerde immün ile ilişkili genlerin metilasyon seviyelerindeki artışı açıklar.

Bu çalışmada, galaktooligosakaritlerin, *Lactococcus lactis subsp. cremoris* ve sinbiyotiklerin (prebiyotik ve probiyotik kombinasyonu) immün ile ilgili genler üzerindeki metilasyon paternlerin karakterizasyonu yapıldı. Ayrıca, galaktooligosakaritlerin etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmanın anlaşılması, antibiyotiklere aşırı bağımlılığa doğal alternatifler bulmak için yararlı bir yaklaşım olabilir.

KAYNAKLAR

- Abasht, B., Kaiser, M. G., van der Poel, J. & Lamont, S. J. Genetic lines differ in Toll-like receptor gene expression in spleens of chicks inoculated with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Poult. Sci.* **88**, 744–749 (2009).
- Abdulqader Abdulqader, A. F., Olgun, O. & Yıldız, A. Ö. In Ovo Besleme. *Hayvansal Üretim* (2017).
- Afrc, R. F. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* **66**, 365–378 (1989).
- Ballou, A. *et al.* Development of the Chick Microbiome: How Early Exposure Influences Future Microbial Diversity. *Frontiers in Veterinary Science* **3**, (2016).
- Barba, F. J., Esteve, M. J. & Frígola, A. Bioactive Components from Leaf Vegetable Products. in *Studies in Natural Products Chemistry* **41**, 321–346 (Elsevier, 2014).
- Barba, F. J., Esteve, M. J., Tedeschi, P., Brandolini, V. & Frígola, A. A Comparative Study of the Analysis of Antioxidant Activities of Liquid Foods Employing Spectrophotometric, Fluorometric, and Chemiluminescent Methods. *Food Anal. Methods* **6**, 317–327 (2013).
- Barko, P. C., McMichael, M. A., Swanson, K. S. & Williams, D. A. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **32**, 9–25 (2018).
- Barros, J. C., Calado, J. G., Basch, G. & Carvalho, M. J. Effect of different doses of post-emergence-applied iodosulfuron on weed control and grain yield of malt barley (*Hordeum distichum* L.), under Mediterranean conditions. *Journal of Plant Protection Research* **56**, 15–20 (2016).
- Becker, C. E. & O'Neill, L. A. J. Inflammasomes in inflammatory disorders: the role of TLRs and their interactions with NLRs. *Semin Immunopathol* **29**, 239–248 (2007).

- Beckmann, L., Simon, O. & Vahjen, W. Isolation and identification of mixed linked beta - glucan degrading bacteria in the intestine of broiler chickens and partial characterization of respective 1,3-1,4-beta -glucanase activities. *J. Basic Microbiol.* **46**, 175–185 (2006).
- Biagi, G. *et al.* Effect of feeding a selected combination of galacto-oligosaccharides and a strain of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* on the intestinal microbiota of cats. *American Journal of Veterinary Research* **74**, 90–95 (2013).
- Biesalski, H.-K. *et al.* Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition* **25**, 1202–1205 (2009).
- Binek, M. *et al.* Evaluation of the efficacy of feed providing on development of gastrointestinal microflora of newly hatched broiler chickens. *Archiv fur Geflugelkunde* **64**, 147–151 (2000).
- Bogucka, J. *et al.* Effects of Prebiotics and Synbiotics Delivered <I>In Ovo</I> on Broiler Small Intestine Histomorphology During the First Days After Hatching. *Folia Biologica* **64**, 131–143 (2016).
- Brisbin, J. T., Gong, J., Parvizi, P. & Sharif, S. Effects of lactobacilli on cytokine expression by chicken spleen and cecal tonsil cells. *Clin. Vaccine Immunol.* **17**, 1337–1343 (2010).
- Brookes, E. & Shi, Y. Diverse epigenetic mechanisms of human disease. *Annu. Rev. Genet.* **48**, 237–268 (2014).
- Christl, S. U., Katzenmaier, U., Hylla, S., Kasper, H. & Scheppach, W. In vitro fermentation of high-amylose cornstarch by a mixed population of colonic bacteria. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **21**, 290–295 (1997).
- Cisek, A. A. & Binek, M. Chicken intestinal microbiota function with a special emphasis on the role of probiotic bacteria. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **17**, 385–394 (2014).

- Cisek, A. A. & Binek, M. Chicken intestinal microbiota function with a special emphasis on the role of probiotic bacteria. *Polish Journal of Veterinary Sciences* **17**, 385–394 (2014).
- Clavijo, V. & Flórez, M. J. V. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. *Poultry Science* **97**, 1006–1021 (2018).
- Clavijo, V. & Flórez, M. J. V. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. *Poultry Science* **97**, 1006–1021 (2018).
- Dammann, R. *et al.* Impact of Natural Compounds on DNA Methylation Levels of the Tumor Suppressor Gene RASSF1A in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 2160 (2017).
- Dankowiakowska, A., Kozłowska, I. & Bednarczyk, M. PROBIOTICS, PREBIOTICS AND SYMBIOTICS IN POULTRY MODE OF ACTION, LIMITATION, AND ACHIEVEMENTS. *Journal of Central European Agriculture* **14**, 467–478 (2013).
- Danzeisen, J. L., Kim, H. B., Isaacson, R. E., Tu, Z. J. & Johnson, T. J. Modulations of the Chicken Cecal Microbiome and Metagenome in Response to Anticoccidial and Growth Promoter Treatment. *PLOS ONE* **6**, e27949 (2011).
- Dibner, J. J. & Richards, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult. Sci.* **84**, 634–643 (2005).
- Ding, J. *et al.* Inheritance and Establishment of Gut Microbiota in Chickens. *Front Microbiol* **8**, 1967 (2017).
- Dunislawska, A., Sławinska, A., Bednarczyk, M. & Siwek, M. Transcriptome modulation by in ovo delivered *Lactobacillus* synbiotics in a range of chicken tissues. *Gene* **698**, 27–33 (2019).

- Dunislawska, A. *et al.* Synbiotics for Broiler Chickens—In Vitro Design and Evaluation of the Influence on Host and Selected Microbiota Populations following In Ovo Delivery. *PLOS ONE* **12**, e0168587 (2017).
- Dunkley, K. D. *et al.* Comparison of in vitro fermentation and molecular microbial profiles of high-fiber feed substrates incubated with chicken cecal inocula. *Poult. Sci.* **86**, 801–810 (2007).
- Gaskins, H. R., Collier, C. T. & Anderson, D. B. Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Anim. Biotechnol.* **13**, 29–42 (2002).
- Getachew, T. A Review on Effects of Probiotic Supplementation in Poultry Performance and Cholesterol Levels of Egg and Meat. *6* (2016).
- Gibney, E. R. & Nolan, C. M. Epigenetics and gene expression. *Heredity (Edinb)* **105**, 4–13 (2010).
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. V., Rastall, R. A. & Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews* **17**, 259–275 (2004).
- Grønbaek, K., Hother, C. & Jones, P. A. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* **115**, 1039–1059 (2007).
- Grond, K., Lanctot, R. B., Jumpponen, A. & Sandercock, B. K. Recruitment and establishment of the gut microbiome in arctic shorebirds. *FEMS Microbiol. Ecol.* **93**, (2017).
- Haghighi, H. R. *et al.* Probiotics stimulate production of natural antibodies in chickens. *Clin. Vaccine Immunol.* **13**, 975–980 (2006).
- Hardy, H., Harris, J., Lyon, E., Beal, J. & Foey, A. Probiotics, Prebiotics and Immunomodulation of Gut Mucosal Defences: Homeostasis and Immunopathology. *Nutrients* **5**, 1869–1912 (2013).

- He, Y. *et al.* DNA Methylation and Regulatory Elements during Chicken Germline Stem Cell Differentiation. *Stem Cell Reports* **10**, 1793–1806 (2018).
- Hird, S. M., Carstens, B. C., Cardiff, S. W., Dittmann, D. L. & Brumfield, R. T. Sampling locality is more detectable than taxonomy or ecology in the gut microbiota of the brood-parasitic Brown-headed Cowbird (*Molothrus ater*). *PeerJ* **2**, e321 (2014).
- Hird, S. M., Sánchez, C., Carstens, B. C. & Brumfield, R. T. Comparative Gut Microbiota of 59 Neotropical Bird Species. *Front Microbiol* **6**, (2015).
- Honjo, K., Hagiwara, T., Itoh, K., Takahashi, E. & Hirota, Y. Immunohistochemical Analysis of Tissue Distribution of B and T Cells in Germfree and Conventional Chickens. *Journal of Veterinary Medical Science* **55**, 1031–1034 (1993).
- Hume, M. E. *et al.* Poultry digestive microflora biodiversity as indicated by denaturing gradient gel electrophoresis. *Poult. Sci.* **82**, 1100–1107 (2003).
- Ichihashi, T., Takagishi, Y., Uchida, K. & Yamada, H. Colonic absorption of menaquinone-4 and menaquinone-9 in rats. *J. Nutr.* **122**, 506–512 (1992).
- Iqbal, M., Philbin, V. J. & Smith, A. L. Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **104**, 117–127 (2005).
- Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., Ali, M. A. & Jalaludin, S. Effects of adherent *Lactobacillus* cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. *Animal Feed Science and Technology* **70**, 197–209 (1998).
- Kadam, M. M., Barekatin, M. R., Bhanja, S. K. & Iji, P. A. Prospects of in ovo feeding and nutrient supplementation for poultry: the science and commercial applications--a review. *J. Sci. Food Agric.* **93**, 3654–3661 (2013).

- Kalavathy, R., Abdullah, N., Jalaludin, S. & Ho, Y. W. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* **44**, 139–144 (2003).
- Kizerwetter-Świda, M. & Binek, M. Bacterial microflora of the chicken embryos and newly hatched chicken. *Journal of Animal and Feed Sciences* **17**, 224–232 (2008).
- Kumar, M. *et al.* Epigenetics, Probiotic Metabolites and Colon Cancer Prevention: An Overview of Progress, Opportunities and Challenges. *Medical Epigenetics* **1**, 60–69 (2013).
- Landgraf, K., Strobach, A., Kiess, W. & Körner, A. Loss of *mtch2* function impairs early development of liver, intestine and visceral adipocytes in zebrafish larvae. *FEBS Letters* **590**, 2852–2861 (2016).
- Lu, J. *et al.* Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6816–6824 (2003).
- Lutful Kabir, S. M. The Role of Probiotics in the Poultry Industry. *Int J Mol Sci* **10**, 3531–3546 (2009).
- Madej, J. P., Stefaniak, T. & Bednarczyk, M. Effect of *in ovo* -delivered prebiotics and synbiotics on lymphoid-organs' morphology in chickens. *Poultry Science* **94**, 1209–1219 (2015).
- Maiorano, G. *et al.* Influence of *in ovo* prebiotic and synbiotic administration on meat quality of broiler chickens. *Poultry Science* **91**, 2963–2969 (2012).
- Markowiak, P. & Ślizewska, K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens* **10**, (2018).
- Markowiak, P. *et al.* Probiotic microorganisms detoxify ochratoxin A in both a chicken liver cell line and chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **99**, 4309–4318 (2019).

- McCracken, B. A., Spurlock, M. E., Roos, M. A., Zuckermann, F. A. & Gaskins, H. R. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *J. Nutr.* **129**, 613–619 (1999).
- McKenney, K. & Alfonzo, J. From Prebiotics to Probiotics: The Evolution and Functions of tRNA Modifications. *Life* **6**, 13 (2016).
- Micciche, A. C., Foley, S. L., Pavlidis, H. O., McIntyre, D. R. & Ricke, S. C. A Review of Prebiotics Against Salmonella in Poultry: Current and Future Potential for Microbiome Research Applications. *Frontiers in Veterinary Science* **5**, (2018).
- Moore, L. D., Le, T. & Fan, G. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology* **38**, 23–38 (2013).
- Nan, X. *et al.* Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**, 386–389 (1998).
- Ng, H. H. *et al.* MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat. Genet.* **23**, 58–61 (1999).
- Nurmi, E., Nuotio, L. & Schneitz, C. The competitive exclusion concept: development and future. *International Journal of Food Microbiology* **15**, 237–240 (1992).
- Oakley, B. B. *et al.* The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiology Letters* **360**, 100–112 (2014).
- Pan, D. & Yu, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes* **5**, 108–119 (2014).
- Pandey, Kavita. R., Naik, Suresh. R. & Vakil, Babu. V. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology* **52**, 7577–7587 (2015).
- Paul, B. *et al.* Influences of diet and the gut microbiome on epigenetic modulation in cancer and other diseases. *Clinical Epigenetics* **7**, (2015).

- Paulina Markowiak & Katarzyna Śliżewska. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* **9**, 1021 (2017).
- Pedroso, A. A. & Lee, M. D. Chapter 2: The composition and role of the microbiota in chickens. in *Intestinal health* (ed. Niewold, T.) 21–50 (Wageningen Academic Publishers, 2015). doi:10.3920/978-90-8686-792-9_2
- Pender, C. M. *et al.* In ovo supplementation of probiotics and its effects on performance and immune-related gene expression in broiler chicks. *Poultry Science* pew381 (2016). doi:10.3382/ps/pew381
- Płowiec, A., Sławińska, A., Siwek, M. Z. & Bednarczyk, M. F. Effect of in ovo administration of inulin and *Lactococcus lactis* on immune-related gene expression in broiler chickens. *American Journal of Veterinary Research* **76**, 975–982 (2015).
- Pruszyńska-Oszmalek, E. *et al.* In ovo injection of prebiotics and synbiotics affects the digestive potency of the pancreas in growing chickens. *Poultry Science* **94**, 1909–1916 (2015).
- Qu, A. *et al.* Comparative metagenomics reveals host specific metavirulomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome. *PLoS ONE* **3**, e2945 (2008).
- Ramasamy, K., REDDY, M. R., Murugesan, S., VERMA, P. C. & SHARMA, R. P. Chicken toll-like receptors and their role in immunity. *World's Poultry Science Journal* **66**, 727–738 (2010).
- Ramasamy, K. T. *et al.* Differential expression of Toll-like receptor mRNA in White Leghorn and indigenous chicken of India. *Vet. Res. Commun.* **34**, 633–639 (2010).
- Ricks, C. A. *et al.* In ovo vaccination technology. *Adv Vet Med* **41**, 495–515 (1999).
- Rodríguez-Lecompte, J. C. *et al.* The effect of microbial-nutrient interaction on the immune system of young chicks after early probiotic and organic acid administration. *J. Anim. Sci.* **90**, 2246–2254 (2012).

- Roto, S., Kwon, Y. M. & Ricke, S. Applications of In Ovo Technique for the Optimal Development of the Gastrointestinal Tract and the Potential Influence on the Establishment of Its Microbiome in Poultry. *Frontiers in Veterinary Science* **3**, (2016).
- Sevane, N. *et al.* Dietary Inulin Supplementation Modifies Significantly the Liver Transcriptomic Profile of Broiler Chickens. *PLoS ONE* **9**, e98942 (2014).
- Shakouri, M. D., Iji, P. A., Mikkelsen, L. L. & Cowieson, A. J. Intestinal function and gut microflora of broiler chickens as influenced by cereal grains and microbial enzyme supplementation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **93**, 647–658 (2009).
- Shang, Y., Kumar, S., Oakley, B. & Kim, W. K. Chicken Gut Microbiota: Importance and Detection Technology. *Frontiers in Veterinary Science* **5**, (2018).
- Siwek, M. *et al.* Prebiotics and synbiotics – in ovo delivery for improved lifespan condition in chicken. *BMC Veterinary Research* **14**, (2018).
- Sławińska, A., D'Andrea, M., Pilla, F., Bednarczyk, M. & Siwek, M. Expression profiles of Toll-like receptors 1, 2 and 5 in selected organs of commercial and indigenous chickens. *J Appl Genet* **54**, 489–492 (2013).
- Slawinska, A. *et al.* Modulation of microbial communities and mucosal gene expression in chicken intestines after galactooligosaccharides delivery In Ovo. *PLOS ONE* **14**, e0212318 (2019).
- Slawinska, A., Plowiec, A., Siwek, M., Jaroszewski, M. & Bednarczyk, M. Long-Term Transcriptomic Effects of Prebiotics and Synbiotics Delivered In Ovo in Broiler Chickens. *PLOS ONE* **11**, e0168899 (2016).
- Sobolewska, A. *et al.* The impact of synbiotic administration through in ovo technology on the microstructure of a broiler chicken small intestine tissue on the 1st and 42nd day of rearing. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **8**, (2017).

- Sommer, F. & Bäckhed, F. The gut microbiota — masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology* **11**, 227–238 (2013).
- St Paul, M., Brisbin, J. T., Abdul-Careem, M. F. & Sharif, S. Immunostimulatory properties of Toll-like receptor ligands in chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **152**, 191–199 (2013).
- Syngai, G. G. *et al.* Probiotics - the versatile functional food ingredients. *J Food Sci Technol* **53**, 921–933 (2016).
- Timmerman, H., Veldman, A., van den Elsen, E., M Rombouts, F. & Beynen, A. Mortality and Growth Performance of Broilers Given Drinking Water Supplemented with Chicken-Specific Probiotics. *Poultry science* **85**, 1383–8 (2006).
- Uysal, F., Akkoyunlu, G. & Ozturk, S. Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos. *Biochimie* **116**, 103–113 (2015).
- Van Der Wielen, P. W. *et al.* Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2536–2540 (2000).
- Velasco, S. *et al.* Effect of inulin supplementation and dietary fat source on performance, blood serum metabolites, liver lipids, abdominal fat deposition, and tissue fatty acid composition in broiler chickens. *Poultry Science* **89**, 1651–1662 (2010).
- Wade, P. A. *et al.* Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat. Genet.* **23**, 62–66 (1999).
- Wootton-Beard, P. C. *et al.* Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Res. Int.* **44**, 217–224 (2011).

- Wu, R., Jeffrey, M., Johnson-Henry, K., Green-Johnson, J. & Sherman, P. Impact of Prebiotics, Probiotics and Gut Derived Metabolites on Host Immunity. *LymphoSign Journal* (2016).
- Yeoman, C. J. *et al.* The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. *Animal Health Research Reviews* **13**, 89–99 (2012).
- Yilmaz, A., Shen, S., Adelson, D. L., Xavier, S. & Zhu, J. J. Identification and sequence analysis of chicken Toll-like receptors. *Immunogenetics* **56**, 743–753 (2005).
- Zulkifli, I., Rahayu, H. S. I., Alimon, A. R., Vidyadaran, M. K. & Babjee, S. A. Gut microflora and intestinal morphology of commercial broiler chickens and Red Jungle Fowl fed diets containing palm kernel meal. 7
- Zulkifli, I., Abdullah, N., Azrin, N. M. & Ho, Y. W. Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing *Lactobacillus* cultures and oxytetracycline under heat stress conditions. *Br. Poult. Sci.* **41**, 593–597 (2000).

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı: Sena TÜRKAN

Doğum Yeri: Konak/İzmir

Doğum Tarihi: 20.04.1994

Medeni Durum: Bekar

Yabancı Dil: İngilizce

E-Mail: senatrkn@hotmail.com

Eğitim Durumu:

Lise: 2009-2013 Maltepe Kadir Has Anadolu Lisesi

Lisans: 2013-2017 Gebze Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü