

**E VİTAMİNİN ZEBRA BALIĞI
(*Danio rerio*) DİYETLERİNDE ALFA
TOKOFEROL (α -TTP) TRANSFER
PROTEİNİ GEN EKSPRESYONLARI
ÜZERİNE OLAN ETKİSİ**

Elif BASTEM

**Yüksek Lisans Tezi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAS
2018**

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

E VİTAMİNİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) DİYETLERİNDE
ALFA TOKOFEROL (α -TTP) TRANSFER PROTEİNİ GEN
EKSPRESYONLARI ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

Elif BASTEM

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2018

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**E VİTAMİNİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) DİYETLERİNDE ALFA
TOKOFEROL (α -TTP) TRANSFER PROTEİNİ GEN EKSPRESYONLARI
ÜZERİNE OLAN ETKİSİ**

Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ danışmanlığında, Elif BASTEM tarafından hazırlanan bu çalışma 13/09/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı – Hayvansal Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ

İmza :

Üye : Prof. Dr. M. Sinan TAŞPINAR

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 20/09/2018 tarih ve 37/46 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

E VİTAMİNİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) DİYETLERİNDE ALFA TOKOFEROL (α -TTP) TRANSFER PROTEİNİ GEN EKSPRESYONLARI ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

Elif BASTEM

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

Danışman: Prof. Dr. Abdulkadir Çiltaş

Bu çalışmada farklı oranlarda (E1=125, E2=250, E3=500 ve E4=750 mg/kg), Zebra balığı (*Danio rerio*) diyetlerine eklenen, E vitaminin, alfa tokoferol Transfer Proteini (α -TTP) gen ekspresyon seviyelerine etkileri araştırılmıştır. Sekiz hafta süresince bu diyet ile beslenen balıklardan deneme sonunda kas ve karaciğer dokuları alınmıştır. Bu dokulardan α -TTP gen ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Hem kas hem de karaciğer dokusundan alınan örneklerde kontrol grubuyla kıyaslandığında E1 ve E2 gruplarında önemsiz, E3 ve E4 gruplarında ise istatistiki olarak önemli seviyede artış olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak, Zebra balıklarının diyetlerine artan oranda vitamin E ilavesinin α -TTP geninin ekspresyon seviyesini olumlu yönde etkilediği kanaatine varılmıştır.

2018, 54 sayfa

Anahtar Kelimeler: E vitamini, zebra balığı, α -TTP geni ekspresyonu

ABSTRACT

Master Thesis

E VITAMININ ZEBRA FISH (*Danio rerio*) ALPHA TOCOPHEROL (α -TTP) TRANSFER PROTEIN GENE EFFECTIVENESS ON EXPRESSIONS

ELİF BASTEM

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Abdulkadir Çiltaş

In this study, effects of vitamin E, added to Zebrafish (*Danio rerio*) diets in different levels (E1=125, E2=250, E3=500 ve E4=750 mg/kg), to alpha tocopherol Transfer Protein (α -TTP) gene expression levels were investigated. Muscle and liver tissues were taken from the fish fed with this diet for eight weeks at the end of the experiment. α -TTP gene expression levels were determined from these tissues. When compared with the control group in both muscular and liver tissues, it was found that there was no significant difference in E1 and E2 groups and statistically significant increase in E3 and E4 groups.

As a result, it has been concluded that the addition of vitamin E to the diet of zebrafish positively affects the expression level of the α -TTP gene.

2018, 54 pages

Keywords: Vitamin E, zebrafish, α -TTP gene expression

TEŞEKKÜR

Öncelikle güncel nitelik taşıyan bu çalışma konusunda değerli katkılarını esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Abdulkadir ÇİLTAŞ'a teşekkür ederim. Bu tez kapsamında verdikleri destekten dolayı değerli bölüm hocalarıma ayrıca teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında bana destek olan Sayın Dr. Osman Tolga ÖZEL'e motivasyon ve emeklerini hep üzerimde hissettiğim değerli dostlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Maddi manevi desteklerini benden esirgemeyen kıymetli aileme özellikle Bu süreçte benim asistanlığımı dahi yapan sevgili annem Serpil BASTEM'e gönülden teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Zebra Balığı (<i>Danio rerio</i>) Hakkında Genel Bilgiler	2
1.2. Vitamin E (α - tokoferol)'nin Genel Özellikleri.....	3
2. KAYNAK ÖZETLERİ	6
3. MATERYAL ve METOT	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. Araştırma yeri ve süresi.....	15
3.1.2. Balık materyali	15
3.1.3. Su materyali.....	15
3.1.4. Model organizma ünitesi	16
3.1.4.1. Sediment filtre	16
3.1.4.2. Karbon filtre	17
3.1.4.3. Granül aktif karbon filtre.....	17
3.1.4.4. Blok karbon filtre	17
3.1.4.5. Membran filtre.....	17
3.1.4.6. Dinlendirme tankları.....	17
3.1.4.7. Araştırma tankları.....	17
3.1.4.8. Isıtma-soğutma cihazı.....	18
3.1.4.9. Denge tankları	18
3.1.4.10. Pompalar.....	18
3.1.4.11. Oksijen sensörü	18
3.1.4.12. Akıllı sensörler (Smartoxy)	18
3.1.4.13. Ortam soğutma ünitesi	18

3.1.4.14. Torba Filtreler.....	19
3.1.4.15. UV reaktörü.....	19
3.1.4.16. Biyolojik filtre	19
3.1.4.17. Otomasyon panosu	19
3.1.4.18. Fotoperiyot düzeneği.....	19
3.1.5. Yem materyali	20
3.2. Metot	20
3.2.1. Aklimatizasyon, deneme dizaynı ve besleme çalışmaları	20
3.2.2. Balıklardan doku örneklerinin alınması	21
3.2.3. Total RNA izolasyonu.....	21
3.2.3.1. Robotta total RNA izolasyonu	21
3.2.4.2. Manuel total RNA izolasyonu	22
3.2.4.3. DEPC hazırlanışı	23
3.2.4.4. 20×MOPS solüsyonu.....	23
3.2.4.5. 1×MOPS solüsyonunun hazırlanışı;.....	23
3.2.4.6. RNA'nın kantitatif tayini.....	24
3.2.4.7. RNA'nın kalitatif tayini.....	24
3.2.4.8. RT-PCR ile cDNA sentezi	24
3.2.4.9. Genlere spesifik primer ve TaqMan prob dizaynı.....	25
3.2.4.10. Real time PCR uygulamaları	26
3.2.4.11. Gen ekspresyonu hesaplamaları	26
3.2.5. Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.....	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	29
4.1. RNA'nın Kalitatif ve Kantitatif tayini.....	29
4.2. Kas Dokularında α -TTP'nin mRNA Seviyesi.....	30
4.3. Karaciğer Dokularında α -TTP'nin mRNA Seviyesi	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
5. SONUÇ	34
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	41

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
♀	Erkek
♂	Dişi
A	Amper
A ₂₆₀	260 dalga boyu
A ₂₈₀	280 dalga boyu
bç	Baz Çifti
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
cm	Santimetre
ddH ₂ O	Deiyonize Distile Su
DEPC	Dietil Pirokarbonat
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
IU	Bir ünite
kg	Kilogram
lt	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MOPS	Morfolinpropansülfonik Asit
mRNA	Mesajcı / Haberci Ribonükleik Asit
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NO ₂	Azot dioksit

NO ₃	azot oksit
O ₂	Oksijen
PO ₄	Fosfat
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	1 Dakikadaki Rotor Devir Sayısı
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
RT-PCR	Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SO ₄	Sülfat
V	Volt
α-TTP	Alfa tokoferol transfer protein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Araştırmada kullanılan Zebra balığı	3
Şekil 1.2. Araştırmada yemlere ilave edilen vitamin E'nin kimyasal yapısı	4
Şekil 3.1. Araştırmada kullanılan model organizma ünitesi	16
Şekil 4.1. İzole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü	30
Şekil 4.2. Farklı oranlarda E vitamini içeren yemlerle beslenen zebra balığı (<i>Danio rerio</i>)'nın deneme sonunda kas dokusu α -TTP mRNA seviyesi	31
Şekil 4.3. Farklı oranlarda E vitamini içeren yemlerle beslenen zebra balığı (<i>Danio rerio</i>)'nın deneme sonunda karaciğer dokusu α -TTP mRNA seviyesi	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan suyun kimyasal ve fiziksel özellikler	15
Çizelge 3.2. Denemede kullanılan yem içeriği	20
Çizelge 3.3. Real time PCR karışımı	26
Çizelge 3.4. Zebra balığı'nda kullanılacak primer ve problara ait dizilim bilgileri, ürün uzunluğu ve genbank erişim numaraları	27
Çizelge 4.1. Total RNA konsantrasyonları (ng/μL) VE $_{260/280}$ (nm) oranları.....	29
Çizelge 4.2. Kas dokusundaki Gen ekspresyon oranları.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Çizelge 4.3. Karaciğer dokusundaki Gen ekspresyon oranları	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Çizelge 4.4. Kas ve karaciğer dokularında α -TTP ve β -aktin mRNA seviyesi değerleri.....	30

1. GİRİŞ

Moleküler genetik alanındaki gelişmeler doğrultusunda genlerin genom üzerindeki kompozisyonları ile ilgili artan bilgi birikimi ile nutrigenomik alanında yenilikler uygulamaya konulmuştur. Bunun ışığında beslenmenin gen ekspresyonunu değişime uğrattığı, metabolizmadaki değişimde etkili olduğunu anlaşılmıştır. “Nutrigenomik” terimi ilk kez Della Penna (1999) tarafından kullanılmış ve diyetlerin gen ekspresyonunu değiştirdikleri ve bu konuda önemli bir rol üstlendikleri belirtilmiştir. (Afman and Müller 2006).

Canlıların yaşamlarını sürdürebilmesi için en uygun çevre şartları sağlanmalı ve diyetleri dengeli olmalıdır. Karma yem fikrinin oluşması ile balık diyetlerindeki birçok aşilamaz görünen sorun çözülmeye başlanmıştır (Sarı ve Çakmak 1996). Yem rasyonları diyete tabi tutulacak balığın yaşama döngüsünde sürekli değişime uğrayan miktarlarda protein, karbonhidrat, yağ, vitaminler, mineraller, antioksidanlar ve çeşitli yem katkı maddelerinden oluşmaktadır (Kop ve Korkut 2002).

Ülkemizde son yıllarda yapılan çalışmalara bakıldığında balık yemlerine ikame olarak bazı kimyasal içeriklerin yerlerini bitki orjinli katkı elementlerine bırakmaya başladığı görülmektedir. Bu maddelerin en elzemlerinden biri, hem yemi koruma amacı güden hem de balığın immün sistemini destekleyip koruyan antioksidan bileşenlerdir (Aydın 2003; Benzie 2003; Moraes 2004).

Antioksidanlar, serbest radikallerin nötralize edilmesini sağlayarak organizmayı koruyan maddeler olarak keşfedilmişlerdir. (Ibrahim, 2000; Düzgüner, 2005; Gök ve diğ., 2006). Son yıllardaki nutrigenomik çalışmalar incelendiğinde diyetlere katılan antioksidanların organizmanın gelişiminde oldukça fazla parametre üzerinde olumlu etki gösterdiği görülmektedir. Ticari olarak üretilen ve doğal kaynaklardan elde edilen antioksidanların su ürünleri alanında önemli bir adım olduğu görülmektedir (Başer ve Hüsnü 2002; Aydilek ve Aksakal 2003).

Vitaminler, organizmaların fizyolojik ve metabolik işlevlerinin gerçekleşebilmesi için elzem olan, bazı organizmalarda ise vücut tarafından sentezlenemeyen ve dışarıdan alınması gereken biyo-katalizör maddelerdir (Gür, 1996; Köprücü ve Özdemir, 2002). Bazı vitaminlerin antioksidan özelliğinin olması bunları oldukça önemli kıldığını görmüşlerdir (Toker, 2004). Vitaminler, yağda eriyenler (A, D, E, K) ve suda eriyenler (B ve C grubu) olarak iki gruba ayrılmaktadır. A, E ve C vitamini antioksidan grubu vitaminlerdendirler. Özellikle E vitamini biyolojik sistemlerin en önemli serbest radikal gidericisi olduğu görülmüştür (Ersoy ve Bayşu 1996; Emate *et al.* 2000; Naziroğlu vd 2000; Kashif *et al.* 2003).

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

Zebra Balığı (*Danio rerio*) Hindistan orjinli bir tür olup Cyprinidae familyasının bir üyesidir ve tropikal bir türdür. Zebra balıkları karma akvaryum sistemlerine kolayca uyum sağlayabilmektedirler. Suyun sığ olduğu yerlerde çokça bulunurlar. Oksijenin fazla olduğu, sık bitki örtüsü barındıran alanlarda ve $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ civarındaki sularda yaşarlar. Zebra balıklarının dişilerini erkek bireylerden ayıran temel özelliklerin başında, göğüs yüzgeçlerinin dişilerde beyaz-mavi, erkeklerde ise sarımsı renkte olmasıdır. Ayrıca dişilerin karın bölgeleri daha bombeli, erkeklerin ki ise düzdür. (Langenau *et al.* 2003).

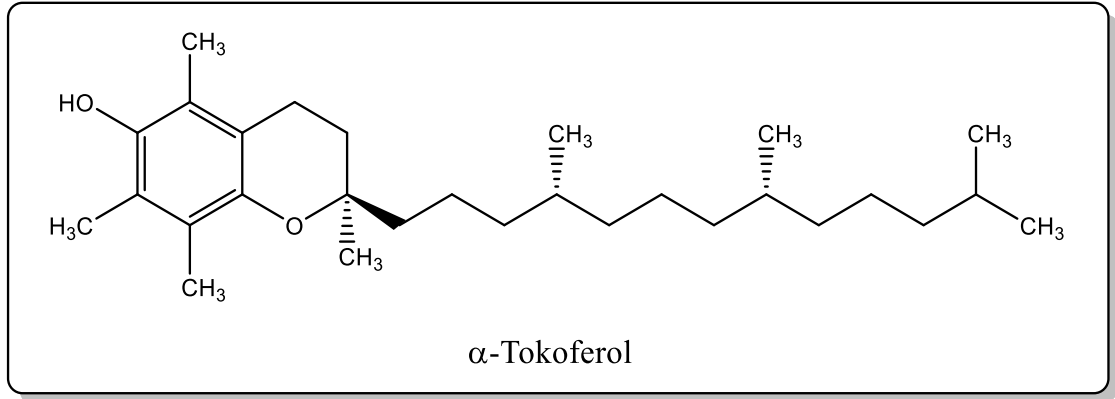
Zebra balığı omurgalılar için ideal bir model organizmadır. Bunun nedeni; embriyonik gelişimi kolay izlenebilir, literatür zenginliğine sahip bir organizma, insanlar ile genetik benzerliği %71, bakımı oldukça kolay, jenerasyon aralığı kısa, genetik yönlülüğü oldukça fazladır (Gerlai *et al.* 2000; Haffter 2003).



Şekil 1.1. Araştırmada kullanılan Zebra balığı (*Danio rerio*)

1.2. Vitamin E (α - tokoferol)'nin Genel Özellikleri

Vitamin E 1922 yılında ABD'nin Kaliforniya eyaletinde Katherine Scott BISHOP tarafından keşfedilmiştir. Yaklaşık 15 yıl sonra Evans ve ekibi tarafından buğday tohumunun yağından ekstrakte edilmiş, 1936 yılında tokoferol olarak litare edilmiştir (Karatepe 1997; Tekkeş 2006). Tokoferol Bitkisel kökenli olup doğal bir antioksidandır. Vitamin E'nin doğada dört formu olduğu bulunmuştur. Bunlar sırası ile alfa, beta, gama, tetra (α , β , γ , δ) tokoferolleridir. Antioksidan aktiviteyi en etkin taşıyan formu ise α -tokoferoldür (Naziroğlu ve Günay 1999; Huang and Huang 2004). En çok bitkilerin depo kısımları olan tohumlarında ve yeşil bölgelerinde lipid tabakada rastlanılmaktadır (Akkan, 1999). Bitki hücrelerinde sentezlendiklerinden hayvan hücrelerinde ve dolayısıyla dokularında diyetleri ile beraber aldıkları kadarı ile bulunur ve sonucunda bunu yansıttığı gözlemlenmiştir. Vitamin E'nin dört formu , ultraviyole ışınlarına maruz kaldığında bozulabilen açık sarı renkli, yapışkan formda, kokusuz yağlar olduğu tanımlanmıştır (Konyalıoğlu 2001; Yamamoto *et al.* 2001; Öz 2005).



Şekil 1.2. Araştırmada yemlere ilave edilen vitamin E'nin kimyasal yapısı

Tüm canlılarda indirgenme-yükseltgenme sistemi doğrultusunda vücutta etki mekanizmalarını gösterdiği belirlenmiştir (Shiau and Hsu 2002). Hücrenin çeperi ve enerji ihtiyacının sağlandığı organel olan mitokondride daha fazla bulunduğu keşfedilmiştir. İntraselüler ve interselüler lipidlerin peroksidazlarına etki ederek hücrenin yapısını korurlar ve anabolik-katabolik olayların sağlıklı bir şekilde devam etmesini sağladığı bulunmuştur (Gündüz vd 2002; Muğlalı vd 2002; Johansson 2003; Lukaski 2004).

Serbest radikal adı verilen oksidant birimleri inhibe eden tokoferollerin vücutta azalması sonucu bu molekül yapıları hücre birimlerine saldırarak proteinlerin, lipidlerin, karbonhidratların, nükleik asitlerin, DNA ve enzimlerin geri dönüşümü olmayan hasarlara sebep olduğu bulunmuştur (Catigmani and Bieri 1983; Bai and Gatlin 1992; Arslan vd 1997). Serbest radikal adı verilen moleküller diğer canlılarda olduğu gibi balıklarında hücre, doku ve organlarında hasarlara sebebiyet vermektedir. Dolayısıyla balık yetiştiriciliğinde bu durum ekonomik olarak da istenmemektedir (Zhang and Omley 2001a; Chang *et al.* 2004; Banudevi *et al.* 2006).

Tokoferollerin en önemli özelliklerinden birisi hücre zarını ve diyetlerle alınan besinleri doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna karşı korumak olduğu bilinmektedir (Akkan 1999; Harlıoğlu ve Köprücü 2000; Aksoy vd 2005; Trenzato *et al.* 2006).

Balıklarda E vitamini en çok karaciğer ve böbreklerde biriktiği gözlemlenmiştir. E vitaminin fazlası ise idrar yoluyla vücuttan dışarı atılmaktadır. Beslenme ile vücuda alınan E vitamininin %20-30 kadarı emildiği bulunmuştur. Organizma vitamin E'nin yaklaşık %1-5 kadarını metabolizmasında değerlendirebilmektedir (Emate *et al.* 2000; Kashif *et al.* 2003).

Vitamin E immun sistemin korunmasında, kanın pıhtılaşmasında, kırmızı kan hücrelerinde, deride, karaciğerde ve testislerde, oksidasyonu oldukça hassas organ ve dokuların hasarının engellenmesinde görev alan önemli önemli bir antioksidan olduğu bulunmuştur (Miller *et al.* 1988; Saccheck and Blumberg 2001; Şimşek ve Aksakal 2005). Bunun yanında oldukça hızlı bozulan A vitamininin biyolojik aktivitesinin muhafazasında da görev üstlenmektedir (Miller *et al.* 1988; Saccheck and Blumberg 2001; Lin and Shiau 2005; Chang *et al.* 2004).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

E vitamini, α - tokoferol, tokoferol ve tokotrienoller ailesi için kullanılan genel bir terimdir (Brigelius *et al.* 1999). Doğada bulunan sekiz maddenin E vitamini etkinliğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bunlar α -, β -, γ - ve δ -tokoferoller ve α -, β -, γ - ve δ tocotrienol olan alt formlarıdır. Alfa tokoferol transfer proteini (a-TTP) yaklaşık 32 kilo dalton ağırlığında sitozolik bir protein olup üremeyle yüksek ilişkili bir faktör olarak tanımlanmıştır (Zhang *et al.* 2014).

E vitamini üreme için gerekli bir besin elementi olarak bilinmesine rağmen, birçok fizyolojik fonksiyonunun da olduğu da keşfedilmiştir (Brigelius *et al.* 1999). Alfa tokoferol immün sistem üzerinde etkili ve üreme ile doğrudan ilişkili elzem bir antioksidandır. İnsan vücudunda α -tokoferollerin birçok etkisi vardır, fakat mekanizmaları ve sinyal yolları henüz tam olarak açıklanamamıştır. Alfa tokoferolün Bilinen en önemli özelliği antioksidan etkinliğine sahip olmalarıdır. E vitamini formları tüm canlılar için elzemdir. Son zamanlarda tokotrienollerin güçlü bir nöro-koruyucu, anti-kanser ve kolesterol düşürücü özelliğe sahip oldukları ve α - tokoferol, α -tocotrienol, γ -tokoferol, δ tocotrienol'ün birbirinden farklı biyolojik etkileri olduğu görülmüştür. Nanomolar konsantrasyonda, α -tokotrienol ve α -tokoferollerin nörodejenerasyonu önlediği tespit edilmiştir. Elde edilen yeni bulgular da E vitamini ailesinin fonksiyonel olarak benzersiz olduğunu destekler niteliktedir. (Chandan *et al.* 2006).

E Vitamini (α -tokoferol) insanlarda lipoproteinleri, çoklu doymamış yağ asitlerini (PUFA), hücresel ve hücre içi mebranları hasardan koruyan önemli bir lipofilik antioksidan olarak keşfedilmiştir. Bu makalenin amacı, vitamin E ihtiyacının diyetlerle alınan PUFA ile ilişkisi hakkında daha önce yayınlanmış olan verileri değerlendirmektir. İnsanlar ve hayvanlarla ilgili yapılan çalışmalar, diyetteki PUFA miktarının çok az olduğu durumlarda RRR- α -tokoferolün minimal bazal ihtiyacının günlük 4-5 mg olduğunu gösterilmiştir. E vitamini ihtiyacı, PUFA tüketimindeki artışa paralel olarak diyetteki PUFA'nın doymamışlığına göre arttığı gözlemlenmiştir. İnsanlarda diyetteki linoleik asit ile bağlantılı E vitamini gereksiniminin önemli olduğu ve bu miktarın 0,4-0,6 mg RRR-

α -tokoferol/g linoleik asit olarak hesaplandığı belirtilmiştir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, doymamışlık derecesi yüksek olan yağ asitleri için E vitamini gereksinimi, PUFA'nın doymamışlık derecesi ile monokarboksilik asidin 0, 3, 2, 3, 4, 5 ve 6 nispi oranlarında neredeyse doğrusal olarak arttığını gösterilmiştir. Normal bir diyet ile PUFA alımında, E vitamini ihtiyacının 12-20 mg/d RRR- α -tokoferol aralığında olduğu hesaplanmıştır. Çalışmalar sonucunda elde edilen veriler, sağlığa oldukça faydalı oldukları için çoklu doymamış yağ asitlerinin alımını arttırmayı önermektedir. Artan PUFA alımı ile uygun olması için yeterli bir vitamin E alımının da sağlanması gerektiği belirtilmiştir (Raederstorff *et al.* 2015).

Kalıtımsal E vitamini eksikliği (AVED) Friedreich ataksisine benzer bir ataksi ve periferik nöropatiye neden olduğu gözlemlenmiştir. AVED'in aTTP'nin bir fonksiyonu olan Vitamin E'nin karaciğer hücrelerine taşınmasında aksaklığa sebep olduğu düşünülmektedir. cDNA ve çeşitli genomik tüm insan aTTP genlerini kapsayan ve insan aTTP genlerinden oluşan beş exon ve dört intron arasındaki bağlantıları determine eden fajlar klonlanmıştır. AVED'li olan birbirinden bağımsız Kuzey Amerika ailelerinde Üç farklı mutasyon tespit edilmiştir. 485delT and 513insTT olan İki mutasyon çerçeve kaymasına ve prematüre stop kodonu ve aTTP'deki Histidine bulunan Arg192 substitisyonuna yol açan üçüncü bir 574G→A mutasyonuna sebep olduğu bulunmuştur. Bu bulgular AVED'in altında yatan genetik bozuklukları tanımladığı gözlemlenmiştir ve aTTP'nin AVED'deki rolünü teyit etmiştir (Hentati *et al.* 1996).

Diğer bir çalışmada ise iz miktarda E vitamini bulunduran diyetlerle beslenen çipura (*Sparus aurata*)'larda yumurta veriminin minimum seviyelere düştüğü gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra E vitamini, erkek balıklarda spermatogenez süresini ve spermelerin dışı yumurtalarını dölleme süresini etkilediği bildirmiştir E vitamini eksikliğinde bazı balıklarda yapılan histopatolojik değerlendirmeler sonucunda foliküler hücrelerde dejenerasyon, oositlerin parçalanması, vitellin kılıfın erimesi, ovaryumda renk hücrelerinin birikmesi, spermatozoaların bozulması, nekroz oluşumu, sperm hücrelerinde azalma ve hipertrofi, gözlemlendiğini belirtmiştir (Izquierdo *et al.* 2001).

Yapılan bir çalışmada sazanlar (*Aristichthys nobilis*) 120 gün süresince A, C ve E vitaminleri içeren diyetlerle beslenmiş ve A, C, E vitaminlerinin üreme üzerindeki etkilerini incelemiştir. Araştırmada, 1. grubun yemlerine A, C ve E vitaminleri ilave edilmiş, 2. Grubun diyetlerine sadece A ve E vitamini eklenmiş, 3. grupta sadece E vitamini, 4. grupta sadece A vitamini ve 5. grup ise herhangi bir vitamin ilavesi olmayan kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Tüm gruplardaki balıklar 20 ay boyunca beslenmişlerdir. Denemenin bitiminde, kontrol diyeti içeren ve vitaminlerin bulunduğu diyet grupları kıyaslandığında, A, C ve E vitamini içeren diyetlerle beslenen balıklarda yumurta verimliliğinin arttığı ve cinsi olgunluğa erişme süresinin 2-3 aya kadar indiği gözlemlenmiştir. Bununla beraber, kontrol içeren diyete göre istatistiksel olarak önemli bir oranda yumurta verimliliğinde artış olduğu ortaya konmuştur ($P<0.05$) (Santiago *et al.* 2000).

Bir başka çalışmada ise deltamethrine maruz kalan kedi balıklarında (*Clarias gariepinus*) oluşan stresin etkisini inhibe edebilmek için yemlere iz miktarda alfa tokoferol katılmıştır. On iki hafta boyunca bu yemlerle beslenen balıklarda stres genlerinin ifade edilmediği ve bunun yanında fazla miktarda alfa tokoferol ilave edilen yemlerin deltamethrin toksisitesini azalttığı görülmüştür (Datta *et al.* 2003).

Watanabe *et al.* (1977) yaptıkları bir çalışmada Sazan (*Cyprinus carpio*) diyetlerine kademeli olarak katılan E vitamininin ovaryum gelişmesine paralel olarak, üremede de olumlu etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır.

Koyunlarda yapılan bir çalışmada E vitamini eksikliğinin, erkekler bireylerde spermatogenezisi ve sperm hareketliliğini olumsuz etkilediği, dişi bireylerde ise, fetüste gelişim bozukluğuna sebebiyet vererek fetüs ölümlerine neden olduğu gözlemlenmiştir (Newsholme *et al.* 1989).

Lipit oksidasyonunun et ve et ürünlerinde bozulmalara sebebiyet veren önemli faktörlerden biri olduğu bilinmektedir. Et kalitesindeki bozulmalar damak tadı, doku ve besleyici öğelerin değişimleri şeklinde kendini gösterilirler. Rasyona katılan E

vitamininin et ve et ürünlerinde lipit peroksidasyonu seviyesini minimuma düşürdüğü gözlemlenmiştir. Bu çalışma, diyetlerine alfa tokoferol ilave edilmiş büyükbaş ve küçükbaş hayvanların et kalitesine ve immün sistem üzerindeki etkisine bakılmıştır. Ayrıca etin rengine, su içeriğine, lipit oksidasyonu seviyesine odaklanılmıştır. Bu çalışmaya ek olarak diyetlerine E vitamini ilave edilmiş hayvanlardan elde edilen et ürünlerinin işlenmesi, paketlenmesi ve depo koşulları içerisindeki interaksyonları araştırılmıştır. Diyetlerine E vitamini ilave edilmiş hayvanlardan elde edilen et ürünlerinde uzun süre et kalitesinin korunduğu, raf ömrünün daha uzun olduğu tesbit edilmiştir (Konyalıoğlu 2001).

Amlashi *et al.* (2012) yaptıkları çalışmada mersin balığının (*Huso huso*) alfa tokoferol ihtiyacı ve aynı zamanda bu vitaminin büyüme performansı üzerine etkisini araştırmak için 0, 25, 50, 100, 200, 400 mg/kg alfa tokoferol asetat içeren 6 farklı yem hazırlamışlardır. Bu çalışmanın sonucunda mersin balığında alfa tokoferol ihtiyacının 26,6-29,6 mg/kg düzeyler arasında olduğunu gözlemlemişlerdir. En iyi yem dönüşüm oranının, yem değerlendirme ve büyüme oranlarının da 26,6-29,6 mg/kg arasında olduğu tespit etmişlerdir.

Watanabe (1990) ise yaptığı çalışmada E vitamininin sazan'da (*Cyprinus carpio*) yumurtalarının olgunlaşmasında ve sazan yavrularının büyüme oranlarında önemli bir faktör olduğu belirtmiştir.

Bir başka çalışmada ise diyete ilave edilen farklı oranlardaki E vitamininin (0,10, 60, 150 mg/kg) Arjantin karideslerinin (*Pleoticus muelleri*) büyüme performansı ve üremesi üzerinde herhangi bir etki göstermediğini bildirilmiştir (Fenandez *et al.* 1998).

Hibrit levreklerin (*Morone chrysops female* × *M. saxatilis male*) vitamin ihtiyaçlarının araştırıldığı bir çalışmada başlangıçta canlı ağırlıkları ortalama 1,8±0,1 gr olan hibrit levrekler için 0, 10, 20, 40, 60, 80 mg/kg E vitamini içeren diyetler hazırlanmış ve balıklar bu yemlerle 12 hafta süresince beslenmişlerdir. Kontrol grubunda renk kararması meydana gelmiş ve ağırlık artışında bir azalma görülmüştür. Bunun yanında, 20, 40, 60, 80 mg/kg

E vitamini içeren diyetler ile beslenen balıkların ağırlıklarında kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiki olarak önemli derecede artış olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). Ayrıca, E vitamini katkılı yemlerle beslenen balıkların kan ve karaciğer dokularında E vitamini konsantrasyonunda artış belirlenmiştir (Kocabaş and III Gatlin 1999).

Gatta *et al.* (2000) yaptıkları bir çalışmada, diyetlere ilave edilen farklı seviyedeki alfa tokoferolün, levreklerin (*Dicentrarchus labrax*) et kalitesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Başlangıçtaki canlı ağırlıkları ortalama 208 gr olan levrekler, 4 ayrı dozda E vitamini (sırasıyla 139, 254, 493, 942 mg/kg) ilave edilmiş yemlerle 16 hafta boyunca beslenmişlerdir. 3., 6., 9. ve 12. günlerde her tanktan 21 adet balık örneği alınmış ve filetodaki E vitamini seviyeleri tespit edilmiştir. Sonuç olarak, rasyonlarda ki E vitamini içeriğindeki artış ile doğru orantılı olarak sırası ile 98,0, 150,7, 225,2 ve 302,0 µg/g-lipit olarak ölçülmüştür. Gruplardaki levreklerin spesifik büyüme oranları (SBO) karşılaştırıldığında, 0,63, 0,54, 0,57, 0,61 olduğu görülmüş ve yem değerlendirme oranları ise (YDO) sırası ile 1,28, 1,36, 1,35, 1,30 bulunmuştur.

Başka bir çalışmada ise iz seviyedeki E vitamini bulunduran diyetler ile 22 hafta boyunca beslenen çipuralarda (*Sparus aurata*) yumurtlama oranlarında önemli bir artış olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında, alfa tokoferolün dişi balıklarda yumurtlama süresini uzattığı ve yumurtaların döllenme miktarına önemli derecede katkı yaptığı rapor edilmiştir (Izquierdo *et al.* 2001).

Sealey ve III Gatlin'in (2002) yaptıkları bir çalışmada başlangıç canlı ağırlığı $9,21\pm 12,7$ g olan genç melez levrekler 0, 30 ve 300 mg E vitamini/kg yem oranlarına sahip diyetlerle 16 hafta süresince beslenmişlerdir. Levreklerin canlı ağırlık artışı (%) sırayla, 247, 231, 324 ve yem değerlendirme oranları ise (balık ağırlığı (kg) / sırasıyla, 0,37, 0,35, 0,47; (%), ve verilen yem miktarları ise (g) 84,2, 96,7, 100 olarak hesaplanmıştır. Bu diyetlerle beslenen levreklerde yem değerlendirme oranı ve canlı ağırlık artışı en fazla 300 mg E vitamini verilen diyetle olduğu bulunmuştur. Yaşama oranının ise E vitaminin seviyesinin artışı ile doğru orantılı olarak arttığı bulunmuştur. Bunun yanında, E vitamini ihtiva eden diyetlerle 16 hafta süresince beslenen balıkların, C vitamininin eksikliğinde görüldüğü

belirtilen büyüme stresinden korunduğunu bildirmişlerdir. Gruplar arasındaki yem değerlendirme ve canlı ağırlık artışı farklılığının istatistiksel olarak önemli olduğunu belirlemişlerdir ($P < 0,05$).

Genç melez tilapialarla (*O. Niloticus* X, *O. Aureus* Y) yapılan bir çalışmada, diyetle ilave edilen alfa tokoferolün, tüm dokulardaki lipid peroksidasyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Diyetlere sırasıyla 0, 50, 100, 200, 450 ve 700 mg/kg α - tokoferol asetat eklenmiştir. Bu diyetlerle 12 hafta süresince yemlenen tilapialar arasında ağırlık artışı, yem değerlendirme oranı ve protein dönüşüm oranlarında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır ($P > 0,05$). Diğer rasyon grupları ile kıyaslandığında, tüm vücuttaki en düşük protein miktarının kontrol grubunda olduğu bulunmuştur (Huang *et al.* 2003).

Balıklarda büyüme performansı üzerine alfa tokoferolün etkisinin incelendiği çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Sau *et al.* (2004) güney Asya sazanı yavruları (*Carassius carassius*) ile yaptıkları bir deneyde, en iyi gelişimin 131,91 mg/kg'lık E vitamini bulunan diyetle beslenen balıklarda olduğunu belirtmişlerdir. Bunun yanında diyetlerine E vitamini ilavesi yapılan Atlantik salmonunda (*Salmo salar*) yapılan bir çalışmada büyüme ve gelişmenin en yüksek olduğu alfa tokoferol ilavesinin 120 mg/kg, sazanlarda ise (*Cyprinus carpio*) 80-100 mg/kg olduğu bildirilmiştir (Palace *et al.* 2006).

Schmölz *et al.* (2016) yaptıkları bir çalışmada, E vitamininin biyoyararlanımının cinsiyet, yaş, genetik yapı ve yaşam şekli gibi birçok faktörden etkilendiğini, vurgulanmışlardır. Örneğin E vitamini oral yoldan alındığında, gıda matrisi ile rekabet eden faktörler içerebildiğini bulmuşlardır. Bu metabolik süreçler; bağırsak emilimi, vasküler taşıyıcılık, önemli bağlayıcı protein olan alfa tokoferol transfer proteininin vasıtası ile hücre içine bağlanmıştır. E vitamininin metabolizması ω hidroksilasyon bağımlı bir döngü ile CYP4F2 / CYP3A4 ve onu takiben beş siklülü β -oksidasyon ile başlar ve suda çözünür son ürün olan karboksietilhidroksikromanı oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bilinen tüm karaciğer metabolitleri konjuge edilebilir ve yan zincir uzunluğuna bağlı olarak idrar veya dışkı yoluyla atılabildiği bulunmuştur. Bunun kinetiği farklı E vitamini formları arasında değişkenlik bulunmuştur. Yan zincirin saturasyonu ve kromanol halka sisteminin yer

değiştirmesi önemli olduğu görülmüştür. E vitamininin durumunu değerlendirilmek için E vitamini ve metabolitlerinin tesbiti ve ölçümü ile ilgili kullanılan analiz metodları önemli olduğu bilinmektedir. Reaksiyonların ve süreçlerin çoğunun diğer yağda eriyen vitaminler tarafından da paylaşıldığı bilinmektedir. Tüm bu işlemler E vitamini metabolitlerinin oluşumunu, dokularda ve vücut sıvılarındaki konsantrasyonlarını modüle edebildiği görülmüştür.

Ruff *et al.* (2003), pazarlama boyuna gelinceye kadar farklı seviyelerde E vitamini ihtiva eden yemlerle beslenen kalkan balıklarında (*S. maximus*) alfa tokoferolün bazı dokulardaki seviyelerini araştırmışlardır. Başlangıçta canlı ağırlığı ortalama 350 ± 10 g olan kalkanları dört farklı gruba ayırmışlardır. %12 yağ ve %60 protein içeren ticari kalkan yemlerine, α - tokoferol asetat ve askorbil-2 monofosfat sırasıyla 500 - 100, 1000 - 100, 100 - 1000, 100 - 100 mg/kg olarak eklemişlerdir. 120 günün sonunda, kalp, karaciğer ve böbrek dokularındaki α - tokoferol seviyelerinin, yüksek oranda α - tokoferol asetat içeren diyetlerle beslenen kalkanlarda daha fazla olduğunu bildirmişlerdir ($P < 0.05$).

Genç melez tilapia (*O. niloticus X O. aureus*) türlerinde yapılan bir çalışmada alfa tokoferol miktarının balık gelişimindeki, kastaki ve karaciğerdeki etkisi araştırılmıştır. Melez tilapialar, kg diyetlerinde oral yolla 0 IU'den -300 IU'ye kadar farklı oranlarda alfa tokoferol içeren ve %14 oranında lipid bulunduran yemler ile 16 hafta süresince beslemişlerdir. 0-50 IU E vitamini/kg yem ile beslenen tilapialarda büyüme oranının düşük olduğu, 90 IU E vitamini/kg yem ile beslenen tilapialarda ise yüksek olduğu bulunmuştur. En düşük ağırlık artışı ve yem değerlendirme oranları ise, kontrol grubundaki tilapialarda görülmüştür. Tilapiaların kasındaki ve karaciğerindeki alfa tokoferol miktarı, yemlerindeki alfa tokoferol miktarı ile doğru orantılı olarak artmıştır. Ağırlık artışı ve yem değerlendirme oranı bakımından gruplar arasındaki farklılık istatistiki anlamda önemli bulunmuştur ($P < 0.05$) (Huang and Huang 2004).

Mehrad ve Sudagar (2010) başlangıçta ortalama ağırlıkları 0,01 g olan lepişteslerde (*Poecilia reticulata*), 20 hafta süresince yaptıkları bir çalışmada rasyonlarına sırası ile 0,

100, 300, 500 ve 1000 mg/kg E vitamini eklemiştirlerdir. En iyi büyüme oranının 1000 mg/kg E vitamini içeren yemler ile beslenen grupta olduğunu bulmuşlardır. Gruplar arasındaki farklılık istatistikî anlamda önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

Bir diğerk çalışmada ise, levrekler (*Perca flavescens*) E (160 mg/kg) ve/veya C (250 mg/kg) vitamini içeren diyetler ile 32 hafta süresince beslenmiş, ağırlık artışı ve üreme performansları üzerine bu 2 vitaminin etkisi incelenmiştir. Araştırmada, 1. grup kontrol grubu, 2. grup diyetine E vitamini ilave edilmiş C vitamini ilave edilmemiş, 3. grup C vitamini ilave edilmiş E vitamini ilave edilmemiş ve 4. grupta ise C ve E vitaminlerinin her 2si de ilave edilmiş diyet grupları olarak ayrılmıştır. Balıkların oransal büyümeleri gruplara göre sırası ile $80\pm 5,0$, $93,3\pm 7,6$, $97,4\pm 4,5$, $100\pm 7,0$ olarak tespit edilmiştir. Araştırma bulgularında C vitamini eklenmiş E vitamini eklenmemiş ve hem C hem de E vitamini eklenmiş diyetlerle beslenmiş balıkların büyüme oranlarının, kontrol grubu levreklerden önemli derecede yüksek olduğu bulunmuştur ($P<0.05$) Çalışmada diyetlerine C vitamini eklenmiş E vitamini eklenmemiş, C vitamini eklenmemiş E vitamini eklenmiş ve hem C vitamini hem de E vitamini eklenmiş rasyonlarla beslenen balıklarda kontrol grubuna kıyasla ağırlık artışı ve üreme performanslarında önemli derecede yüksek olduğu belirtilmiştir ($P<0.05$) (Lee and Dabrowski 2004).

Galaz *et al.* (2010) Yavru papağan çiklit balıklarında yaptıkları bir çalışmada, alfa tokoferolün büyüme üzerine olan etkisini araştırmak amacıyla, farklı oranlarda (0, 38, 53, 87, 119 ve 583 mg/kg) E vitamini içeren diyetler hazırlamışlardır. Balıklar 16 hafta süresince bu rasyonlarla beslenmişlerdir. Araştırmanın sonucunda en yüksek ağırlık artışının ve en iyi yem değerlendirme oranının 38 mg/kg E vitamini bulduran diyetlerle beslenen grupta olduğunu belirlemiştir.

Mehrad *et al.* (2012), yaptıkları çalışmada E vitamininin zebra balığının (*Danio rerio*) yaşama oranı, büyüme, fekundite ve yumurta çapı üzerine etkilerini araştırmak amacı ile balıkları 5 farklı oranda (0, 100, 300, 500 ve 1000 mg/kg) E vitamini içeren diyetler ile 20 hafta süresince beslemiştirlerdir. Araştırmanın sonucunda en yüksek yaşama oranının 1000 mg/kg E vitamini içeren rasyonla beslenen grupta olduğunu tespit etmişlerdir.

Bunun yanında spesifik büyüme oranı, ağırlık artışı, fekundite ve yumurta çapı gibi parametrelerin rasyondaki E vitamini artışı ile doğru orantılı olarak arttığını bildirilmişlerdir.

α -tokoferol transfer proteini (α -TTP), vücut plazmasındaki α -tokoferolün etkin dolaşımında rol oynayan, üreme için önemli etkiye sahip bir faktördür. Raederstorff ve arkadaşları E vitamininin koyun karaciğerindeki α -TTP gen ekspresyon seviyesi üzerine etkisini araştırmak için nutrigenomik bir çalışma yapmışlardır. Otuz adet dişi koyun rastgele beş gruba ayrılmış ve dört ay süresince sırasıyla 0, 20, 100, 200 ve 2000 IU E vitamini ilave edilmiş diyetler ile beslenmişlerdir. Çalışmanın sonunda, hayvanlar diseksiyona tabi tutularak kalp, dalak, akciğer, böbrek, musculus longissimus ve gluteus doku örnekleri alınmıştır. Denek koyunların karaciğer dışındaki tüm doku ve organlarda α -TTP geninin ifade edildiği tespit edilmiş, E vitamini düzeylerinin ekspresyon seviyeleri üzerinde etkili olduğu anlaşılmıştır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma yeri ve süresi

Deneme, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümüne ait Model Organizma Ünitesinde ve Biyoteknoloji Laboratuvarlarında 8 hafta süreyle yürütülmüştür.

3.1.2. Balık materyali

Bu çalışmada 8 haftalık, $0,014 \pm 0,17$ gr ağırlığındaki toplam 250 adet (1♂:1♀) zebra balığı (*Danio rerio*) kullanılmıştır.

3.1.3. Su materyali

Deneme ünitesinde şebeke suyu kullanılmıştır. Kullanılan su, 8 farklı por özelliğine sahip mekanik filtrelerden geçirilmiştir. Elde edilen su sisteme verilmeden önce 2 gün süreyle havalandırma ve dinlendirilmeye tabi tutulmuştur. Kullanılan suyun fiziksel ve kimyasal parametreleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan suyun kimyasal ve fiziksel özellikler

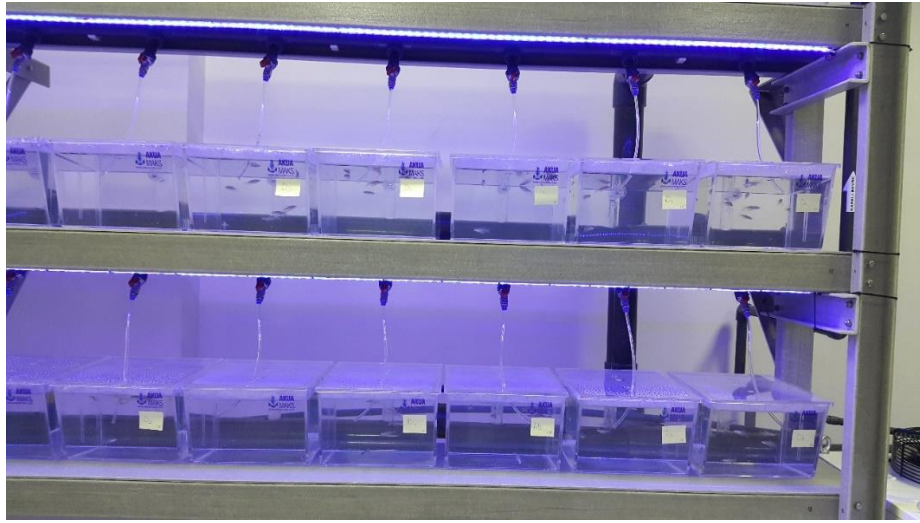
Parametre	Değer
Çözülmüş O ₂ (mg/l)	9±0,5
pH	7,30
Saturasyon (%)	70-80
Sıcaklık (°C)	26±1,0
SO ₄	0,33 mg/l

Çizelge 3.1. (Devamı)

PO ₄	Eser
NO ₃	3,45 mg/l
NO ₂	Eser
İletkenlik	240 µs/cm

3.1.4. Model organizma ünitesi

Bu çalışma kapalı devre resirküle model organizma ünitesinde yapılmıştır. Ünitadaki malzemeler akrilikten yapılmış olup tankların ön kısımları hafif eğimlidir. Bu sayede etkin bir sirkülasyon ve dışkının arka tarafta birikmesi sağlanmaktadır. Araştırmanın yürütüldüğü model organizma ünitesi Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Araştırmada kullanılan model organizma ünitesi

3.1.4.1. Sediment filtre

Çamur, kum, toz vs. gibi partiküllerin tutulup suya karışmasını engeller. Sudaki partikülleri uzaklaştırır.

3.1.4.2. Karbon filtre

Sudaki kloru tutar ve sisteme karışmasını engeller.

3.1.4.3. Granül aktif karbon filtre

Sudaki kloru ve organik maddeleri tutmaktadır.

3.1.4.4. Blok karbon filtre

Sisteme ilave edilen suyun membrana girmeden önce mikro partiküllerden arındırılmasını sağlar.

3.1.4.5. Membran filtre

Ters osmosun gerçekleştiği birimdir. Suyun tazyikli gelmesi ile çalışır. Bulanmış suyu sistemden atar.

3.1.4.6. Dinlendirme tankları

Suyun depolandığı ve havalandırıldığı 25 lt ve 100lt kapasiteli tanklardır. 2 adet 100lt ve 4 adet 25lt hacimli dinlendirme tankı bulunmaktadır.

3.1.4.7. Araştırma tankları

Sistemde 28 adet 13,8 lt lik (25x30x18,5cm boyutlarında), 15 adet 11,6 lt lik (15,5x30x25cm boyutlarında) ve 13 adet 4,5 lt lik (8,2x30x18,5cm boyutlarında) toplam 56 adet tank bulunmaktadır.

3.1.4.8. Isıtma-soğutma cihazı

Sistemdeki suyun arzu edilen sıcaklık aralığında olmasını sağlayan cihazdır.

3.1.4.9. Denge tankları

Sistemdeki suyun bir araya toplandığı ve buradan bütün sisteme paylaştırıldığı, tüm suyun alınarak tekrar sisteme verilmesini sağlayan birimdir.

3.1.4.10. Pompalar

Sistemde 1'i yedek olmak üzere 2 adet pompa bulunmaktadır. Bu birimin görevi suyu filtrelere iletmektir.

3.1.4.11. Oksijen sensörü

%93 saf oksijen üretmektedir. Denge tankına oksijen sağlamaktadır. Cihazdan oksijenin çıkış basıncı 0,4 bardır. Oksijen jeneratörünün kapasitesi 5 lt/dk'dır.

3.1.4.12. Akıllı sensörler (Smartoxy)

Sudaki sıcaklık, saturasyon ve pH'yı ölçmektedir. Android işletim sistemine sahiptir. Bluetooth ile bağlantısı yapılan ekrandan ölçüm değerlerini iletme ve kaydetme özellikleri vardır.

3.1.4.13. Ortam soğutma ünitesi

45390 BTU'luk soğutma kapasitesine sahip ünite ısı dengesinin stabil kalması sağlar. ortam soğutma ünitesi 20 saat süresince çalıştırılmaktadır.

3.1.4.14. Torba Filtreler

Sistemde 1'i yedek olmak üzere 2 torba filtre bulunmaktadır. Torba filtreler; 200 mikrondan 1 mikrona kadar filtrasyon derecelerinde, gövde içine yerleştirilen filtre torbaları vasıtası ile suda ki hassas filtrasyonu sağlamada kullanılmaktadır.

3.1.4.15. UV reaktörü

Ultraviyole sistem reaktörü (UV-C) suların dezenfekte edilmesinde kullanılmaktadır.

3.1.4.16. Biyolojik filtre

Biyolojik filtre tankı kapalı halde ve dış ortamdan izole şekilde çalışır. İçerisine konulan biyomateryelin (bioballar) bakterilerin tutunma alanını artırır. 1 m³ dolgu hacmindeki yüzey alanı 750 m²'dir. bakterilere 550 m² tutunma alanı sağlamaktadır. Nutrifikasyon Bakteri ekimi yapıldığında bioball yüzeyine tutunmaktadır. Bioball yüzeyine tutunamayan bakteriler ise su ile tüm sistemi dolaşarak yine sisteme yayılmaktadır. biyoball üzerine tutunan nitriti nitrata dönüştüren yararlı bakteri kolonisinin artışı sağlar.

3.1.4.17. Otomasyon panosu

Tüm sistemdeki birimlerin kontrolü bu elektronik panodan sağlanmaktadır.

3.1.4.18. Fotoperiyot düzeneği

Model organizma ünitesi ışıktan tamamen izole olacak şekilde kurulmuştur. Fotoperiyot canlıının ihtiyacına göre karanlık ve aydınlık periyodların oluşmasını sağlar. Elektronik sistem 10 saat karanlık 14 saat aydınlık olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.1.5. Yem materyali

Kullanılan yemler çizelge 3.2. da belirtilen rasyon içeriğine göre ticari bir yem fabrikasına hazırlanmıştır. Denemede E1 7,5 mg/kg, E2 5 mg/kg, E3 3,75 mg/kg, E4 2,5mg/kg ve E5 0 mg/kg olacak şekilde 5 farklı düzeyde E vitamini kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Denemede kullanılan yem içeriği

Diyet içeriği (g/kg)	KONTROL	E1	E2	E3	E4
Balık Unu	400,0	400,0	400,0	400,0	400,0
Soya Unu	160,0	160,0	160,0	160,0	160,0
Tavuk Unu	135,0	135,0	135,0	135,0	135,0
Ayçiçek toh. küs.	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
İrmik Altı Unu	271,5	71,5	28,5	233,625	246,25
Balık Yağı	0,0	75,0	50,0	37,5	25,0
Soya Yağı	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Vitamin mix	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Buğday Gluteni	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Mineral Mix	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Vitamin E	0,0	125	250	500	750
Vitamin C	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	1000	1000	1000	1000	1000

3.2. Metot

3.2.1. Aklimatizasyon, deneme dizaynı ve besleme çalışmaları

25 adet zebra balığı tankından her birinine 10 (5♀, 5♂) adet toplamda ise 250 adet zebra balığı yerleştirilmiştir. Deneme boyunca su sıcaklığı 26±1°C’de sabit tutulmuştur. 14 saat ışık 10 saat karanlık olacak şekilde fotoperiyot uygulanmıştır. Zebra balıkları bir hafta süresince E vitamini eklenmemiş yem ile beslenmiştir. 8 haftalık çalışma süresince, zebra balıklarına günlük olarak canlı ağırlıklarının %5’i kadar yem verilmiştir (Martinez and Vasquez 2001). Günlük rasyon 09:00, 12:00, 15:00 ve 18:00 4’e bölünerek verilmiştir.

3.2.2. Balıklardan doku örneklerinin alınması

İki aylık besleme çalışması sonucunda her gruptan 7 balık şansa bağlı olarak seçilmiş ve buzlu suda bayıltılarak kas ve karaciğer doku örnekleri alınmıştır. Diseksiyon sonucunda kas ve karaciğer dokusu örnekleri, 2 ml'lik steril eppendorf tüplerine yerleştirilmiş, üzerine ise RNA Later (QIAGEN, Katalog No: 76106) solüsyonu eklenmiştir. Bu örnekler bozulma ihtimaline karşı 1 gece +4°C'de bekletildikten sonra içerisindeki RNA later uzaklaştırılarak atılmış ve çalışılncaya kadar -86°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Total RNA izolasyonu

Çalışmadaki Total RNA izolasyonu Qiagen-Qiacube izolasyon cihazında yapılmıştır. Kas dokularının RNA izolasyonu için QIAGEN RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Cat:74804) kullanılmıştır.

3.2.3.1. Robotta total RNA izolasyonu

Kas dokularında Qiacube robotuyla RNA izolasyonu aşağıdaki protokol izlenerek yapılmıştır.

1. Tüm dokular çalışılncaya kadar -80°C'de bekletilmiştir.
2. Dokular alınarak, çözünmeleri için, buz üzerinde bekletilmiştir.
3. 100 mg doku örneği alınarak önceden steril edilmiş 2 µL tüplere (Qiagen Cat No:69989) yerleştirilmiştir.
4. Akabinde ise içlerine steril edilmiş penset yardımı ile çelik bilye konulmuştur.
5. Üzerine 500 µL Qiazol Lysis Reagent eklenmiştir.
6. Tissuelyser LT'de (Qiagen Cat No:85600) 40 Hz'de 3+3 dk süreyle parçalanmıştır.
7. Düz bir zemin üstünde 30 sn süresince bekletilmiştir. ardından üzerine 100 µL kloroform ilave edilmiştir.
8. 30 sn süreyle 45 derecelik açı ile tüpler vortekslenmiştir. Ardından 1-2 dk buz üzerinde bekletilmiştir.

9. Örnekler $12000\times g$ $4^{\circ}C$ 'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
10. Santrifüjden çıkan örneklerde oluşan 3'lü tabakadan üst fazdan yaklaşık 500 μL alınarak steril 2 ml'lik kapaksız collection ependorf tüpleri içerisine konulmuştur.
11. Alınan fazlar kontaminasyon riskine karşı ivedilikle QIACUBE cihazına yerleştirilmiştir.

3.2.4.2. Manuel total RNA izolasyonu

Karaciğer doku örneklerinin az olması sebebi ile RNA izolasyonu manuel olarak gerçekleştirilmiştir tüm dokuların RNA izolasyonunda RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Cat:74804) kullanılmıştır. Tüm aşamalar aşağıda belirtilen protokole göre yapılmıştır.

1. $-80^{\circ}C$ 'de saklanan doku örnekleri alınarak karda çözünmeleri için bekletilmiştir.
2. Doku örneklerinden 30 mg tartılarak alınmıştır.
3. steril ependorf tüplerine konulmuştur.
4. Tüp içerisine steril çelik boncuk bir pens yardımı ile konulmuştur (Qiagen Cat No:69989)
5. Üzerine 350 μL Buffer RLT Lysis eklenmiştir.
6. TissueLyser LT'de 40 Hz'de 3+3 dakika boyunca (Qiagen Cat No:85600) parçalanmıştır.
7. Parçalanmış karaciğer dokuları üzerine 350 μL %70'lik Ethanol konulmuştur.
8. Daha sonra 10 sn 45 derecelik açı ile vorteksenerek 2 dk süresince düz bir zeminde bekletilmiştir.
9. RNeasy Mini Kit (Cat:74034) pembe kolonları Her bir örnek için kullanılarak her bir tüpe 700 μL yüklenmiştir.
10. $8000\times g$ 'de $4^{\circ}C$ 'de 15 sn santrifüj edilmiştir.
11. Tampon RW1 Wash solüsyonu 700 μL alınarak kolondan geçirilmiştir.
12. $8000\times g$ 'de $4^{\circ}C$ 'de 15 sn santrifüje konulmuştur.
13. Kolonun altında biriken dikkatle alt kısım atılmıştır.
14. Tampon RPE Wash buffer solüsyonundan 500 μL çekilerek kolondan geçirilmiştir.

15. 8000×g'de 4°C'de 15 sn santrifüj edildikten sonra Kolonun altında biriken kısım atılmıştır
16. Tekrar Tampon RPE Wash buffer solüsyonundan 500 µL alınarak kolondan geçirilmiştir.
17. 8000×g'de 4°C'de 3 dk santrifüj edildikten sonra kolondan geçip altta biriken kısım atılmıştır.
18. 30 µL RNase-free-water kolona yüklenerek yıkama işlemi tamamlanmıştır.
19. Son adımda ise 8000×g'de 4°C'de 1 dk santrifüj yapıldıktan manuel olarak RNA izolasyonu tamamlanmıştır.

3.2.4.3. DEPC hazırlanışı

500 µL DEPC (Cat No: Sigma D-5758) tartılarak bir erlenmayer içerisine konular üzerine 500 ml saf su ölçülüp aktarılır 2 saat süresince manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlanarak otoklavlanmıştır ve +4°C'de bekletilmiştir.

3.2.4.4. 20×MOPS solüsyonu

41,9 gr MOPS (Cat No: Sigma M-1254), 6,8 gr Sodyum asetat (Cat No: Sigma S 2889), 2,6 gr EDTA (Cat No: Sigma 93283) tartılarak 1000 ml'lik erlenmayer içerisine aktarılmıştır. Önceden hazırlanan 500 ml DEPC H₂O'dan 480 ml konular pH metre ile NaOH eklenerek pH 7,0'a ayarlanmıştır. DEPC'li su ile hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır. 1 gün süresince manyetik karıştırıcı yardımıyla (ısı ayarı açılmadan) manyetik bar yardımıyla karıştırılmıştır.

3.2.4.5. 1×MOPS solüsyonunun hazırlanışı;

19 birim saf su 1 birim 20×MOPS solüsyonu ile %5 oranında dilüsyon yapılarak, manyetik karıştırıcı yardımıyla 30 dk. süresince karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.2.4.6. RNA'nın kantitatif tayini

RNA'nın yapısında yer alan pürin ve pürimidin bazları (A_{260}/A_{280}) dalga boyunda ışımaya verdiği için bu dalga boylarında μ Drop™ cihazında ölçümleri yapılmıştır. Örneklerin konsantrasyonu ve saflık dereceleri μ Drop™ Plate'de (Thermo Scientific, Cat No:12391) belirlenmiştir.

3.2.4.7. RNA'nın kalitatif tayini

RNA izolasyonunun sağlıklı bir şekilde yapıldığının teyidi için Agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. RNA'nın kalitatif tayini için thermo elektroforez cihazına yükleme yapılmadan önce aşağıdaki protokol takip edilmiştir.

1. 70 ml'lik elektroforez küveti için %1'lik agaroz jel hazırlanma protokolünde 0,7 gr agaroz (Cat No: Sigma A 9539) tartılarak bir erlenmayere konulmuştur.
2. Üzerine 66,5 ml ddH₂O ve 4,38 ml 20×MOPS solüsyonu eklenmiştir.
3. Mikrodalga fırında bileşenler tamamen çözünene kadar yaklaşık 3 dakika tutulmuştur.
4. Ardından su altında biraz soğutulmuştur ve içine 15,6 μ L formamid (Cat No: Simga F 9037) ve 12,8 μ L etidyum bromür (10 μ g/ μ l) (Cat No: Sigma E8751) ilave edilmiştir.
5. Steril 0,2 ml'lik ependorf tüp içine 5 μ L formamid, 0,5 μ L 20×MOPS solüsyonu, 3,5 μ L ddH₂O ve 1 μ L izole edilen RNA örneklerinden konulmuştur.
6. 65°C'de 15 dk etüvde inkübe edilmiştir.
7. Jel donduktan sonra üzerine jeli kaplayacak kadar 1×MOPS solüsyonu dökülmüştür.
8. Ardından örnekler jel yükleme tamponu Brom Fenol Blue (Cat No: İnvitrogen 10816-015) ile boyanarak kuyucuklara yükleme yapılmıştır. 90V 90A'da 30 dk yürütülmüştür.

3.2.4.8. RT-PCR ile cDNA sentezi

Total RNA'lardan Super Script® III Reverse Transcriptase (Invitrogen Cat. No: 18080-044) kiti ile cDNA aşağıdaki protokol izlenerek sentezlenmiştir.

1. İzole edilen RNA'lar μ Drop™ Plate nanodrop spektrofotometre yardımıyla cDNA sentezinde kullanılacak konsantrasyonu hesaplanmıştır. Konsantrasyonları 1 μ g/ μ L olacak biçimde hesaplanmıştır.
2. Steril olan 0,2 ml'lik PCR tüplerine; 1 μ L 50 μ M Oligo dT₂₀, 1 μ L dNTP Mix (10 μ M) konulmuştur.
3. Toplam hacim 13 μ L'ye tamamlanması gerekmektedir bunun için üzerine konsantrasyonu 1 μ g olan total RNA'dan önceden hesaplanan miktarda (x) konulmuştur.
4. Üzerine 11-x μ L ddH₂O konulmuştur.
5. 65 °C'de 15 dk PCR programında inkübe edilmiştir. Daha sonrada 1 dk boyunca straför içerisindeki buz üstünde bekletilmiştir.
6. (5-10 sn) boyunca bileşenlerin karışması için mikrosantrifüj yapılmıştır.
7. Ardından 4 μ L 5x First Strand Buffer, 1 μ L 0,1 M DTT, 1 μ L RNase OUT™ (40 unit/ μ L), 1 μ L Super Script III RT (200 unit/ μ L) konulmuştur.
8. Karışım pipetajlanmıştır.
9. Bu karışım 50°C'de 60 dk süresince inkübe edilmiştir. Çalışılacak gene spesifik primer reaksiyonu için sıcaklığı 55°C 'e çıkarılmıştır.
10. Bu karışım 70°C'de 15 dk süresince ısıtılarak reaksiyon tamamlanmıştır.
11. İşlem sonucunda elde edilen cDNA'lar μ Drop™ Plate nanodrop spektrofotometre de A₂₆₀/A₂₈₀ absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.2.4.9. Genlere spesifik primer ve TaqMan prob dizaynı

İnternet üzerinden erişime açık olan gen bankasından (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zebra balığında Alfa tokoferol transfer protein ve Beta Aktin genlerine ait mRNA dizilim verilerine erişilerek primer dizaynı yapılabilen primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) üzerinden, çalışılacak olan genlerin maksimum 60-150 bp lik bölümüne spesifik primer ve proplar dizayn edilmiştir. Dizayn edilen primer ve propların ilgili gen bölgelerine spesifiklikleri <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> kullanılarak teyit edilmiştir. Çalışmada kullanılan genlere ait primer ve propların baz dizilimleri, bç ve gen bankası erişim numaraları Çizelge 3.4.'de verilmiştir.

3.2.4.10. Real time PCR uygulamaları

cDNA'lar üzerinde çalışılacak ilgili genlere ait bölgelerin amplifikasyonu Real-time PCR'da çalışılmıştır. TaqMan prob iki primer arasındaki alana bağlanacak şekilde dizayn edilmiştir. Bu yöntemde 5' ucunda flouresan işaretli Reporter ve 3' ucunda da Quencher boya kullanılmıştır. Reaksiyon esnasında serbest kalan reporter boya ışınım yapar. Bu ışınım, her döngüde kopan prob sayısı ile orantılı olarak artmaktadır. Böylece oluşan ürünün miktarı kantitatif olarak ölçülmektedir. FastStart TaqMan® Probe Qiagen Rotor GeneQ kullanılarak gerçekleştirilen Real time PCR karışımı ve protokolü Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Real time PCR karışımı

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

3.2.4.11. Gen ekspresyonu hesaplamaları

Real-Time PCR sonuçlarının hesaplanması için, alınan her bir örneğin referans ve hedef CT değerleri arasındaki farkı kıyaslayan Hedef gen oranı metodu kullanılmıştır (Pfaffl 2001). Kontrol ve muamele (E vitamini) gruplarının bulunduğu ekspresyon seviyelerinin hesaplanması aşağıda gösterildiği gibi hedef gen oranı formülüne göre hesaplanmıştır.

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

Çizelge 3.4. Zebra balığı'nda kullanılacak primer ve problara ait dizilim bilgileri, ürün uzunluğu ve genbank erişim numaraları

Genler	Primer ve Proplar	Baz Dizilimi (5'-3')	Ürün Uzunluğu (bç)	Gen Bankası Erişim Numarası
α -TTP	Forward	GCATCAGCGTGCTCATCAAG	108	AJ937858.1
	Reverse	TGGTCTCCCCTACGGTCAG		
	Prob	^{FAM} - TGGATGACAACGACTCCCTGCCGTT ^{-TAMRA}		
β -Aktin	Forward	CCTCTCTTGCTCCTTCCACC	150	AF057040.1
	Reverse	TACTCCTGCTTGCTGATCCAC		
	Prob	^{CY5} - GGCCTCCCTGTCCACCTTCCAGC ^{-BQ2}		

3.2.5. Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

Bu çalışmada 5 farklı diyet kullanılmış ve diyet uygulanan gruplarda 3 tekrarlı lum yapılmıştır. Elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi ile değerlendirmeye alınmıştır. Ortalamalar arasındaki farklılığı ortaya koymak için Duncan oklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Sonuçlar $P < 0,05$ önem seviyesi ile anlamlı kabul edilmiştir. Çalışmaya ait verilerin istatistiksel analizleri SPSS 17.0 paket programında yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

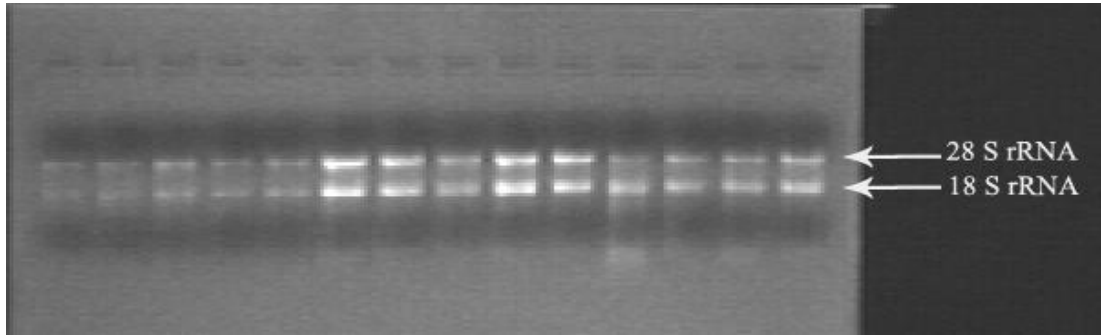
4.1. RNA'nın Kalitatif ve Kantitatif tayini

İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları $\mu\text{Drop}^{\text{TM}}$ cihazında A_{260}/A_{280} dalga boylarında ölçülmüştür. Saf haldeki RNA'nın absorbands değerinin 2.0' civarında olması sonuçların sağlıklı olduğunu teyit etmektedir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Total RNA konsantrasyonları (ng/ μL) VE $_{260/280}$ (nm) oranları

		KAS		KARACİĞER	
		Konsantrasyon (ng/ μl)	Saflik 260/280 (nm)	Konsantrasyon (ng/ μl)	Saflik 260/280 (nm)
E1	1	327,3077	2,3586	1606,6154	2,1827
	2	280,6923	2,1033	1112	2,1033
	3	224,6923	2,4608	449,3846	2,2829
	4	293,4615	2,3889	1132,9231	2,2018
	5	152,3689	2,2122	222,30	2,2552
E2	1	372,1538	2,3406	86,6154	2,9867
	2	249,4615	2,4329	102,3846	2,8319
	3	79,9231	2,2128	997,2308	2,2089
	4	237	2,4241	12,9231	2,1923
	5	175,8545	2,3655	1025,52	2,1928
E3	1	563,6923	2,2836	1250	2,1921
	2	187,7692	2,5374	767	2,2417
	3	110,3846	2,7810	926,6154	2,2058
	4	146,2308	2,5246	367	2,2762
	5	205,78	2,1925	1789,29	2,1325
E4	1	233	2,4368	1572,9231	2,1712
	2	243,5385	2,4429	1626,3077	2,1651
	3	199,6154	2,5420	2385,5385	2,0341
	4	156,1538	2,8860	2428,6923	2,1794
	5	285,458	2,1556	456,12	2,1485
E5	1	250,8462	2,4013	1728,7692	2,0926
	2	336,5385	2,3136	159,2308	2,5182
	3	219,6923	2,4269	364,4615	2,3022
	4	465,3077	2,2749	634,4615	2,2603
	5	314,56	2,2365	2289,69	2,1953

Total RNA örneklerinin elektroforez de yürütülmesi sonucunda 18s rRNA ve 28s rRNA bantları elde edilmiştir. 18s rRNA ve 28s rRNA elektroforez görüntüsü Şekil 4.1.'de verilmiştir.



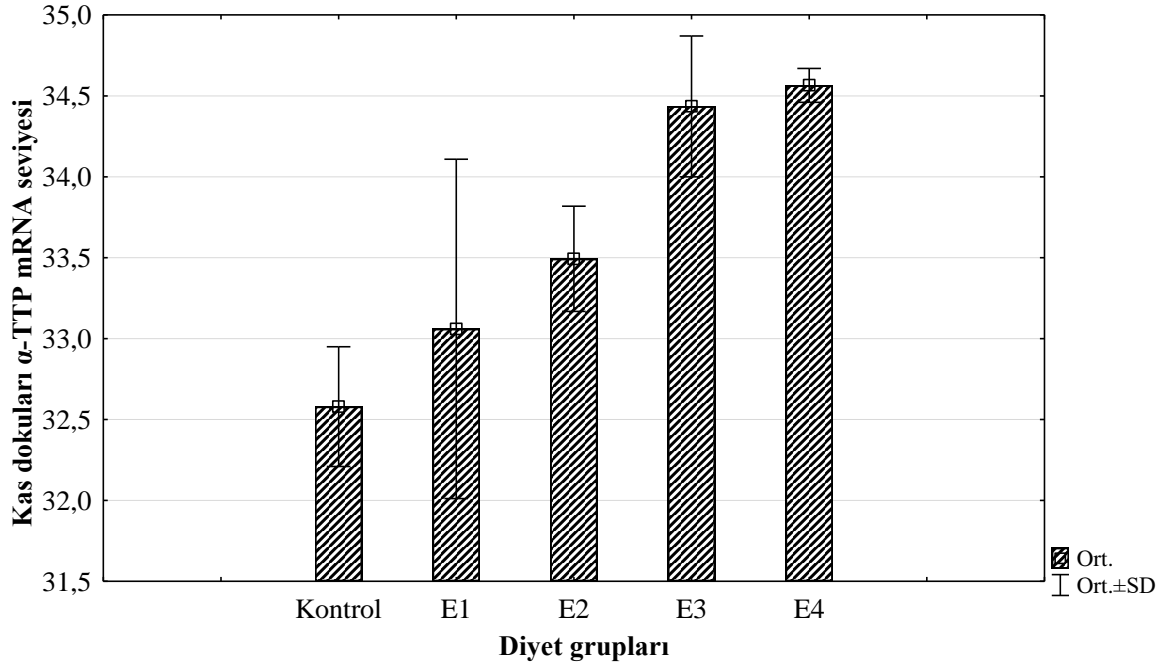
Şekil 4.1. İzole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforez görüntüsü

4.2. Kas ve Karaciğer Dokularında α -TTP'nin mRNA Seviyesi

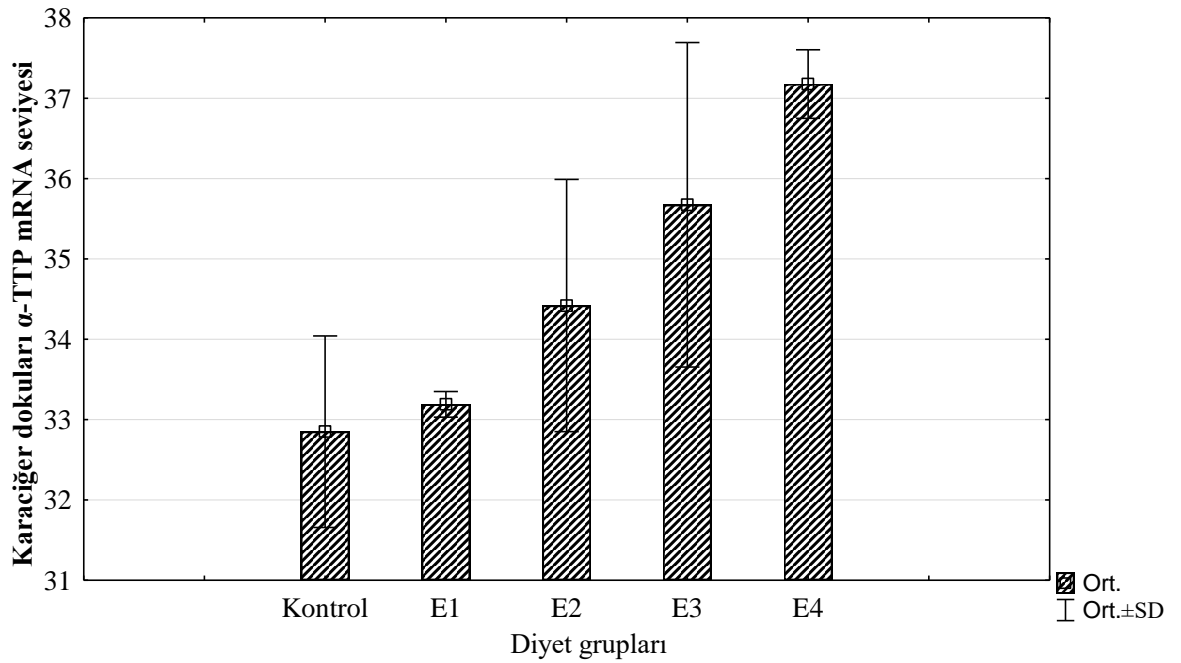
Yapılan araştırmada farklı miktarlarda E vitamini içeren diyetlerin Zebra balığının (*Danio rerio*) kas ve karaciğer dokularında α -TTP mRNA seviyelerine ait farklılıklar Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.'te sunulmuştur. Elde edilen değerlere ait istatistiki sonuçlar Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kas ve karaciğer dokularında α -TTP mRNA seviyesi değerleri

	Kontrol	E1	E2	E3	E4
ATTP-Kas	32,58±0,37 ^a	33,06±1,04 ^a	33,49±0,32 ^{ab}	34,43±0,43 ^{bc}	34,57±0,11 ^c
ATTP-Kc	32,85±1,19 ^a	33,19±0,16 ^a	34,42±1,57 ^{ab}	35,67±2,02 ^{bc}	37,18±0,42 ^c



Şekil 4.2. Farklı oranlarda E vitamini içeren yemlerle beslenen zebra balığı (*Danio rerio*)'nin deneme sonunda kas dokusu α -TTP mRNA seviyesi



Şekil 4.3. Farklı oranlarda E vitamini içeren yemlerle beslenen zebra balığı (*Danio rerio*)'nin deneme sonunda karaciğer dokusu α -TTP mRNA seviyesi

Kas dokusunda en yüksek α -TTP gen ekspresyonu E4 diyeti ile beslenen balıklarda belirlenirken en düşük ekspresyon oranının kontrol grubunda olduğu tespit edilmiştir. Karaciğer dokusunda ise kastakine benzer bir şekilde en yüksek ekspresyon seviyesi E4 grubunda, en düşük değer ise kontrol grubunda bulunmuştur (Şekil 4.2., Şekil 4.3.)

Diyetlere ilave edilen E vitamini miktarına bağlı olarak kas dokusunda α -TTP mRNA seviyelerinin de arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2.). Elde edilen istatistiki sonuçlara göre; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında E1 ve E2 gruplarındaki artışlar istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. E3 ve E4 gruplarındaki artışlar ise kontrol grubuna göre önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Çizelge 4.2.).

Yine benzer şekilde, diyet içeriklerindeki E vitamini seviyelerine bağlı olarak, karaciğer dokusunda da α -TTP mRNA seviyelerinde artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.3.). Gruplar arasındaki istatistiki karşılaştırmalar sonucunda, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında E1 ve E2 gruplarındaki artışın istatistiki olarak önemli olmadığı, E3 ve E4 gruplarındaki artışların ise kontrol grubuna göre önemli olduğu görülmüştür ($p<0,05$) (Çizelge 4.2.).

Miller et al. (2012), gelişmekte olan embriyolarda, ihtiyaç duyulan kritik bölgelere E vitamininin taşınmasında, α -TTP'in önemli rol oynadığını bildirmiştir. Yine aynı şekilde yetişkin karaciğerinden plazmaya α -tokoferol taşınmasında da aynı sistemin etkin rol oynadığını belirtmiştir. Bir başka araştırmada ise Mustacich et al. (2007) insanlarda diyetdeki E vitamini gereksiniminin sadece α -tokoferol ile sınırlı olduğuna, bunun sebebinin ise diğer E vitamini formlarının hepatik α -TTP tarafından zayıf bir şekilde tanındığını ve bu yüzden α -tokoferole dönüştürülemediklerine, α -tokoferolün plazmaya taşınmasında α -TTP'nin rolüne vurgu yapmıştır. Fechner et al., (1998) ise yaptığı bir çalışmada farelerin diyetlerine katılan α -tokoferolün α -TTP mRNA seviyesini artırdığını belirtmiştir. Yaptığımız çalışmadan elde edilen veriler de literatürle paralellik arz etmektedir. Sonuçlardan da görüleceği üzere (Çizelge 4.2.), diyetlere katılan E vitamini seviyesine bağlı olarak hem kas dokusunda, hem de karaciğerde α -TTP ekspresyon seviyesi sürekli bir artış göstermiştir (Şekil 4.2., Şekil 4.3.).

Verilen E vitamini miktarına bağlı olarak α -TTP mRNA seviyesinin artışı, bu proteinin E vitamininin vücuttaki taşınımında temel rol oynamasından kaynaklandığı düşünölmektedir (Fechner et al., 1998, Mustacich et al., 2007, Miller et al., 2012). Gerek karaciğer ve gerekse kas dokudaki α -TTP mRNA seviyelerindeki artışının benzer olması bu birbirini teyit eder niteliktedir.

Sonuç olarak diyetlere E vitamini katılmasının α -TTP sentezini olumlu yönde etkileyeceği kanaatine varılmıştır.

5. SONUÇ

Bu çalışmada diyetlere E vitamini katılmasının α -TTP sentezi üzerindeki etkisi transkriptomik seviyede araştırılmıştır. E vitamini üreme sisteminin düzenlenmesinde etkili olan önemli faktörler arasındadır. Yem rasyonunun kompozisyonu, balıkların üreme sistemleri üzerinde pozitif ya da negatif etki etmektedir. Ayrıca balıkların özellikle Embriyonik dönemlerindeki gelişimlerine E vitamini alımının önemli katkılarda bulunacağı da aşıkardır. Bu sebeple yapılacak yeni çalışmalarla,

1. Farklı miktar aralıkları denenerek balıklardaki optimum E vitamini ihtiyaçlarının belirlenmesi,
2. Gerek anaç balıklar ve gerekse larvalara verilecek E vitamini desteği ile yavru balıkların gelişiminde E vitamininin nasıl etki edeceğinin araştırılması gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Afman, L., Müller, M. 2006. Nutrigenomics: From Molecular Nutrition to Prevention of Disease. *J. Am. Diet Assoc.* 106: 569-576.
- Akkan, G., 1999, Vitaminler. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Akılcı İlaç Kullanımı Sempozyumu, İstanbul, 57 s.
- Akkan, G., 1999, Vitaminler. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. *Akılcı İlaç Kullanımı Sempozyumu, İstanbul, 57 s.*
- Aksoy, N., Vural, H., Sabuncu, T., Arslan, O. ve Aksoy, Şahin., 2005, Beneficial effects of vitamins C and E against oxidative stress in diabetic rats. *Nutrition Research*, 25, 625-630.
- Amlashi, A.S., Falahatkar, B. ve Sharifi S.D. (2012) Dietary vitamin E requirements and growth performance of young-of-the-year beluga, *Huso huso* (L.) (Chondrostei: Acipenseridae), *Arch Pol Fish*, 20:299-306.
- Arslan, A., Nazıroğlu, M., Gönülalan, Z., Sarıgöl, C. ve Aksakal, M., 1997, Farklı muhafaza sıcaklığı ve sürelerinin balık eti vitamin E miktarına etkisi. *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*, 21, 211-213.
- Aydın, A., 2003. Vitamin ve mineraller. İ.Ü. Cerrah Paşa Tıp Fak. Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sağlam Çocuk İzlemi Sempozyumu Derg., (Ekim), 93-97.
- Aydilek, N. ve Aksakal, M. 2003. Testesteron tavşanlarda karaciğer antioksidan sistemi üzerine etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Derg.*, 14(2):22-25.
- Bai, S.C. and Gatlin, D.M., 1992. Dietary vitamin E concentration and duration of feeding affect tissue α -tokopherol concentrations of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 113, 130-135.
- Bandarra, N.M., Nunes, M.L., Andrade, A.M., Prates, J.A.M., Pereira, S., Monteiro, M., Rema, P., Valente, L.M.P., 2006. Effect of dietary conjugated linoleic acid on muscle, liver and visceral lipid deposition in rainbow trout juveniles (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 254, 496–505.
- Banudevi, S., Krishnamoorthy, G., Venkataraman, P., Vignesh, C., Aruldash, M.M. and Arunakaron, J., 2006. Role of α -tocopherol on antioxidant status in liver, lung and kidney of PCP exposed male albino rats. *Food and Chemical Toxicology*, 10: 243-252.
- Barım Öz, Ö., 2005. Keban baraj gölü'nde yaşayan Tatlısu İstakozu (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823) rasyonuna farklı oranlarda ilave edilen vitamin E'nin etkileri. Doktora Tezi. Fırat Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, 73s.
- Başer, C. ve Hüsnü, K., 2002., Fonksiyonel gıdalar ve nutrasötikler. 14. Bitkisel İlaç hammadeleri Toplantısı, Anadolu Üniv. Ecz. Fak. Farmokoloji A.B.D. Bildirileri, Eskişehir, 28 s.
- Benzie, F., 2003. Evolution of Dietary Antioxidants. *Comparative Biochemistry and Physiology* ,Part A, No:136, 113-126.
- Berge, G.M., Ruyter, B., Asgard, T., 2004. Conjugated linoleic acid in diets for juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*); effects on fish performance, proximate composition, fatty acid and mineral content. *Aquaculture*, 237, 365–380.
- Blazer, V.S. 2002. Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26: 85–101.

- Brigelius-Flohe, R., & Traber, M. G. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*, 13(10), 1145-1155.
- Catigmani, L.G., and Bieri, J.G., 1983. Simultaneous determination of retinol and α -tokopherol in serum or plasma by liquid chromatography. *Clinic. Chem.*, 29,4: 708-712.
- Chang, R., Lockman R., Goodwin, A., Ploveen, A. and Dabrowski, K., 2004. Effect of dietary vitamin C and E on alternative complement activity hematology, tissue composition ,vitamin concentration and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus Crysoleucas*). *Aquaculture*, 242, 533-569.
- Company, R., Astola, A., Pendon, C., Valdivia, M.M., Perez-Sanchez, J., 2001. Somatotropic regulation of fish growth and adiposity: growth hormone (GH) and somatolactin (SL) relationship. *Comperative Biochemistry and Physiology*, 130C, 435–445.
- Datta, M., Kaviraj, A. 2003. Ascorbic Acid Supplementation of Diet for Reduction of Deltamethrin Induced Stress in Freshwater Catfish *Clarias gariepinus*, *Chemosphere*, 53 (8): 883-888.
- Delaney, M., Follet, C., Ryan, N., Hanney, N., Lusk-Yablick, J., Gerlach, G., 2002. Social interaction and distribution of female zebrafish (*Danio rerio*) in a large aquarium. *The Biological Bulletin*, 203, p240-241.
- Ding, L., Xu, J., Luo, X., and Chegini, N., 2004. Gonadotropin releasing hormone and transforming growth factor β activate mitogen-activated protein kinase/extracellularly regulated kinase and differentially regulate fibronectin, type I collagen, and plasminogen activator inhibitor-1 expression in leiomyoma and myometrial smooth muscle cells. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 89(11), 5549-5557.
- Düzgüner, V., 2005. Deneysel olarak diabet oluşturulan tavşanlarda çinkonun lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistem üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, M.K.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1-55 s.
- Emate A.C., Borlongan, I.G. and Damaso, J.P., 2000. Dietary vitamin C and E supplementation and reproduction of milkfish *Chanos chanos* forsskal. *Aquaculture Research*, 31, 557-564.
- Ersoy, E. ve Bayşu, N., 1986. Biyokimya. Ders Kitabı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fak. Yayınları, No: 403, Ankara, 476 s.
- Figueiredo-Silva, A.C., Rema, P., Bandarra, N.M., Nunes, M.L., Valente, L.M.P., 2005. Effects of dietary conjugated linoleic acid on growth, nutrient utilization, body composition, and hepatic lipogenesis in rainbow trout juveniles (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 248, 163–172.
- Galaz, G.B., Kim, S. ve Lee, K. (2010) Effects of different dietary vitamin E levels on growth performance, non-specific immune responses, and disease resistance against *Vibrio anguillarum* in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*), *Asian-Aust J Anim Sci*, 23 (7): 916-923
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., & Rosenthal, A. (2000). Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology biochemistry and behavior*, 67(4), 773-782.
- Gök, V., Kayacıer, A.ve Telli, R., 2006. Hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı doğal antioksidanlar. *Gıda Teknolojileri Derg.*,2: 35-40.

- Gündüz, H., Doğan, İ. ve Ekin, S., 2002. Yemlerine vitamin A ve E ilave edilen alabalıklarda (*Oncorhynchus mykiss*) seminal plazmanın biyokimyasal bileşiminin saptanması. *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 13,1-2: 64-68.
- Gür, S., 1996. Boğa spermasında vitamin A ve beta karoten düzeylerinin araştırılması ve bu spermalarla tohumlanan ineklerden elde edilen döl verimi sonuçları. Doktora Tezi, Fırat Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 56s.
- Haffter, P. A. S. C. A. L., & Nusslein-Volhard, C. H. R. I. S. T. I. A. N. E. (2003). Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish. *International Journal of Developmental Biology*, 40(1), 221-227.
- Harlıoğlu, M.M. ve Köprücü, K. and Özdemir, Y., 2002. The effect of dietary vitamin E on the pleopodal egg number of *Astacus leptodactylus* (Escholtz, 1823). *Aquaculture International*, 10, 5: 391-397.
- Hentati, A., Deng, H. X., Hung, W. Y., Nayer, M., Ahmed, M. S., He, X., ... & Siddique, T. (1996). Human α -tocopherol transfer protein: Gene structure and mutations in familial vitamin E deficiency. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 39(3), 295-300.
- Huang, C.H. and Huang, S.L., 2004. Effect of dietary vitamin E on growth, tissue lipid peroxidation and liver glutathione level of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus* fed oxidized oil. *Aquaculture*, 237, 381-389.
- Ibrahim W., Lee U.S., Yen C.H., Clair D.K. and Chow, C.K., 2000. Antioxidant and oxidative status in tissues of manganese superoxide dismutase transgenic mice. *Free Radical Biology & Medicine*, 28,3: 397-402.
- Izquierdo, M.S., Fernandez-Palacios, H., Tacon, A.G.J., 2001. Effect of Broodstock
- Jhonsson, G., 2003. Antioxidant intake, plasma, antioxidants and oxidative stress in a randomized, controlled, parallel, mediterranean dietary intervention study on patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition Journal*, 2:5, 81-90.
- Karatepe, M., 1997. Diabetik hastaların kan serumunda antioksidan vitaminlerin düzeylerinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayini. Yüksek Lisans Tezi, F.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, 33s.
- Kashif, S.M., Zaidi, R. and Banu, N., 2003. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clinica Chimica Acta.*, 340, 229-233.
- Kennedy, S.R., Bickerdike R., Berge, R.K., Dick, J.R., Tocher, D.R., 2005. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) or tetradecylthioacetic acid (TTA) on growth, lipid composition, fatty acid metabolism and lipid gene expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). *Aquaculture*, 272, 489-501.
- Kennedy, S.R., Bickerdike, R., Berge, R.K., Dick, J.R., Tocher, D.R., 2007. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) or tetradecylthioacetic acid (TTA) on growth, lipid composition, fatty acid metabolism and lipid gene expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.). *Aquaculture*, 272, 489-501.
- Kocabas, A. M., & Gatlin, D. M. (1999). Dietary vitamin E requirement of hybrid striped bass (*Morone chrysops* female x *M. saxatilis* male). *Aquaculture nutrition*, 5(1), 3-8.
- Konyalıoğlu, S., 2001, Et kalitesi üzerine diyetle alınan E vitamininin etkileri. *Hayvansal Üretim Derg.*, 40,2: 25-36.
- Kop, F.K. ve Korkut, A.Y., 2002. Balık yemlerinde kalite kontrol. *E.Ü. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 19,1-2: 271-276.

- Köprücü, K. ve Özdemir, Y., 2002. Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) etindeki A, C ve E vitamin miktarları. *Fırat Üniv., Fen Bilimleri Derg.i*, 14,12: 227-232.
- Langenau, D. M., Traver, D., Ferrando, A. A., Kutok, J. L., Aster, J. C., Kanki, J. P., Lin, S., Prochownik, E., Trede, N. S., Zon, L. I., Look, A. T., 2003. Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. *Science Journal*, 299-5608 ,887-890.
- Martínez A.M., B.P.C. Vázquez. 2001. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, México, Reproductive activity and condition index of *Holacanthus passer* (Teleostei:Pomacanthidae) in the Gulf of California, Mexico, Pg.1-3, Centro Interdisciplinario De Ciencias Marinas, Mexico.
- Mehrad, B. ve Sudagar, M. (2010) Dietary vitamin E requirement, fish performance and reproduction of guppy (*Poecilia reticulata*), *AAACL Bioflux*, 3 (3):239246.
- Jeffrey Atkinson⁸, Carrie L. Barton⁴, Robert L. Tanguay^{2,4,5}, Maret G. Traber
Morales E.A., Jimenez, A., Hidalgo, C.M., Abellan, E. and Cardenetre, G., 2004. Oxidative stress and antioxidant defences after prolonged startation in *Dentex dentex* liver. *Comparative Biochemistry and Psicology, Part C*, 139, 153-161.
- Morley, S., Cecchini, M., Zhang, W., Virgulti, A., Noy, N., Atkinson, J., & Manor, D. (2008). Mechanisms of ligand transfer by the hepatic tocopherol transfer protein. *Journal of Biological Chemistry*, 283(26), 17797-17804.
- Muğlalı, H.Ö., Çetinkaya, N., Güler, A., Göğüş, U. ve Ulutürk, S., 2002. Koyunlarda E vitamini toksisitesinin asit miktarı üzerine etkisi. *Türk J. Vet. Anim., Sci.*, 26,33: 901-907.
- Naziroğlu, M., ve Günay, C., 1999. The levels of some antioxidant vitamins, glutathione peroxidase and lipoperoxidase during the anaesthesia of dogs. *Cell Biochemistry and Function Cell Biochem. Funct.*, 17, 207-212.
- Naziroğlu, M., ve Günay, C., 1999. The levels of some antioxidant vitamins, glutathione peroxidase and lipoperoxidase during the anaesthesia of dogs. *Cell Biochemistry and Function Cell Biochem. Funct.*, 17, 207-212. Nutrition on Reproductive Performance of Fish. *Aquaculture*, 197: 25-42.
- Öner, Y., Canbolat, Ö., & Elmacı, C. (2012). Nutrigenomik ve Hayvan Beslemedeki Uygulamaları. *Hayvansal Üretim*, 53(1).
- Palace, V.P., ve Werner, J. (2006) Vitamins A and E in the maternal diet influence egg quality and early life stage development in fish: a review, *Scientia Marina*, 70 (Suppl.2): 41 -57.
- Qian, J., Morley, S., Wilson, K., Nava, P., Atkinson, J., & Manor, D. (2005). Intracellular trafficking of vitamin E in hepatocytes: the role of tocopherol transfer protein. *Journal of lipid research*, 46(10), 2072-2082.
- Raederstorff, D., Wyss, A., Calder, P. C., Weber, P., & Eggersdorfer, M. (2015). Vitamin E function and requirements in relation to PUFA. *British Journal of Nutrition*, 114(08), 1113-1122.
- Raederstorff, D., Wyss, A., Calder, P. C., Weber, P., & Eggersdorfer, M. (2015). Vitamin E function and requirements in relation to PUFA. *British Journal of Nutrition*, 114(8), 1113-1122.
- Ramos, A., Bandarra, N.M., Rema, P., Vaz-Pires, P., Nunes, M.L., Andrade, A.M., Cordeiro, A.R., Valente, L.M.P., 2008. Time course deposition of conjugated linoleic acid in market size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. *Aquaculture*, 274, 366–374.

- Reindl, K.M., Sheridan, M.A., 2012. Peripheral regulation of the growth hormone-insulin-like growth factor system in fish and other vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology*, 163, 231-245.
- Santiago, C.B., Gonzal, A.C. 2000. Effect of Prepared Diet and Vitamins A, E and C Supplementation on The Reproductive Performance of Cage-Reared Bighead Carp *Aristichthys nobilis* (Richardson). *Journal of Applied Ichthyology*, 16: 8-13.
- Sarı, M. ve Çakmak, M.N., 1996. Balık Besleme, Fırat Üniv. Yayınları, No:37, Elazığ, 270s.
- Sato, Y., Hagiwara, K., Arai, H., & Inoue, K. (1991). Purification and characterization of the α -tocopherol transfer protein from rat liver. *FEBS letters*, 288(1-2), 41-45.
- Sau, S.K., Paul, B.N., Mohanta, K.N., Mohanty, S.N. (2004) Dietary vitamin E requirement, fish performance and carcass composition of rohu (*Labeo rohita*) fry, *Aquaculture*, 240: 359-368.
- Schmölz, L., Birringer, M., Lorkowski, S., & Wallert, M. (2016). Complexity of vitamin E metabolism. *World journal of biological chemistry*, 7(1), 14.
- Sen, C. K., Khanna, S., & Roy, S. (2006). Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. *Life sciences*, 78(18), 2088-2098
- Shiau S.Y. and Hsu Y.C., 2002. Vitamin E sparing effect by dietary vitamin C in juvenile hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* \times *O. aureus*). *Aquaculture*, 210: 335-342.
- Sirkecioğlu, A.N., 2011. Farklı yağ kaynakları ve su sıcaklığının Zebra balığı (*Oncorhynchus mykiss*) yavrularının büyüme performansı, lipid metabolizması ve bazı genlerin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Spence, R., Fatema, M.K., Reichard, M., Huq, K.A., Wahab, M.A., Ahmed, F., Smith, C., 2006a. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*, 69(5), p1435-1448.
- Stump, M., Dupont, S., Thorndyke, M. C., & Melzner, F. (2011). CO₂ induced seawater acidification impacts sea urchin larval development II: gene expression patterns in pluteus larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 160(3), 320-330.
- Tekkeş, Y., 2006. Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve E vitaminin dokularda lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması. T.C. Kahraman Maraş Sütçü İmam Üniv., Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya ABD., 81s.
- Toker, Y.N., 2004. HPLC ile vitamin A ve E'nin floresans dedektör ve ters faz kolon aracılığında miktar tayini ve kolon performansının ölçümü. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Dergisi, 1: 83-97.
- Trenzado, C.,E. Higuera M. and Morales A., 2006. Influence of dietary vitamin E, C and hufa on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) performance under crowding conditions. *Pharmacological Research*, 24: 4-26.
- Valente, L.M.P., Bandarra, N.M., Figueiredo-Silva, A.C., Cordeiro, A.R., Simoes, R.M., Nunes, M.L., 2007a. Influence of conjugated linoleic acid on growth, lipid composition and hepatic lipogenesis in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 267, 225–235.
- Valente, L.M.P., Bandarra, N.M., Figueiredo-Silva, A.C., Rema, P., Vaz-Pires, P., Martins, S., Prates, J.A.M., Nunes, M.L., 2007b. Conjugated linoleic acid in diets

- for large-size rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on growth, chemical composition and sensory attributes. *British Journal of Nutrition*, 97, 289–297.
- Vargesson, N.A., 2007. Zebrafish in *Manual of Animal Technology* (ed. S. Barnett) Blackwell Publishing Ltd: Oxford, UK.
- Xu, J., Luo, X., and Chegini, N., 2003. Differential expression, regulation, and induction of Smads, transforming growth factor- β signal transduction pathway in leiomyoma, and myometrial smooth muscle cells and alteration by gonadotropin-releasing hormone analog. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 88(3), 1350-1361.
- Yamamoto, Y., Fujisava, A., Hara, A. and Dunlap, W.C., 2001. An unusual vitamin E constituent (α -tokomonoenol) provides enhanced antioxidant protection in marine organisms adapted to cold-water environments. *Pnas*, 98,23: 13144-13148.
- Yıldırım, Ö. ve Korkut, A.Y., 2004. Su ürünleri yemlerinin çevreye etkisi. E.Ü. *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 21,1-2: 167-172.
- Zhang, P. and Omley, S.T., 2001 (a). β -Carotene: Interactions with α -Tokoferol and Ascorbic Asid in Microsomal Lipid Peroxidation. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 12, 38-45.
- Zhang, P. and Omley, S.T., 2001 (b). Antioxidant and prooxidant roles for β -Carotene, α -tokoferol and ascorbic asid in human lung cells. *Toxicology in Vitro*, 15, 13-24.
- Zuo, Z. Y., Luo, H. L., Liu, K., Jia, H. N., Zhang, Y. W., Jiao, L. J., & Chang, Y. F. (2014). Dietary vitamin E affects α -TTP mRNA levels in different tissues of the Tan sheep. *Gene*, 541(1), 1-7.

ÖZGEÇMİŞ

12.01.1988 yılında Van'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Van'da tamamladı. 2009-2013 tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümünden mezun olup 2013 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Hayvansal Biyoteknoloji Bilim dalında yüksek lisans eğitimine başlamıştır. 15.11.2014-15.11.2015 tarihleri arasında TÜBİTAK tarafından desteklenen 1140755 nolu COST projesinde bursiyer olarak görev almıştır.