

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (VETERİNER) DOKTORA PROGRAMI

**GÖKKUŞAĞI ALABALIKLARINDA (*Oncorhynchus mykiss*)
BÜYÜME GENLERİNİN (GH, IGF-1, IGF-2) EKSPRESYONU
İLE SERUM KORTİZOL DÜZEYLERİ ÜZERİNE YAŞ VE
MEVSİMSEL DEĞİŞİMLERİN ETKİSİ**

**Hakan TEKELİ
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
ADÜ-VTF-15025 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Veteriner) Doktora Programı çerçevesinde Hakan TEKELİ tarafından hazırlanan “Gökkuşuğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) büyüme genlerinin (GH, IGF-1, IGF-2) ekspresyonu ile serum kortizol düzeyleri üzerine yaş ve mevsimsel değişimlerin etkisi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 14.06.2019

Üye: Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK (Tez Danışmanı)	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye: Prof. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye: Prof. Dr. Ferda BELGE	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye: Prof. Dr. Fatmagül YUR	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	
Üye: Prof. Dr. Tülay BÜYÜKOĞLU	Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi	

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cavit KUM
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktoramın her aşamasında yardımını ve hoşgörüsünü esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, desteğini her zaman hissettiğim kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora sürecimde bilgi ve becerilerinden faydalandığım Biyokimya Anabilim Dalı'nda görev yapan kıymetli hocalarım Prof. Dr. Funda KIRAL'a, Prof. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ'a ve Doç. Dr. Serap Ünübol AYPAK'a, çalışmamın analiz bölümünde yardımlarından dolayı Dr. Araş. Gör. Gamze Servi EKREN'e ve Dr. Öğr. Gör. Mürüvet ABBAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora eğitimim boyunca anlayış ve hoşgörülerinden dolayı MAKÜ ailesine, manevi desteğinin yanında örnekleri toplama aşamasında yardımcı olan sevgili hayat arkadaşım Berna Pınar BADEMKIRAN'a ve manevi desteklerini hissettiğim dostlarıma, hayatımın her anında maddi ve manevi olarak yanımda olan ve yoğun tez çalışmalarımnda hoşgörülerini ve desteklerini esirgemeyen anne ve babama sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Gökkuşığı Alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	3
2.2. Balıklarda Hipotalamus ve Hipofiz İlişkisi	6
2.3. Büyüme Hormon Metabolizması.....	8
2.3.1. Büyüme Hormon Reseptörü (GHR).....	15
2.4. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1) ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-2 (IGF-2).....	18
2.4.1. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Proteinler (IGFBP'ler).....	25
2.4.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktör Reseptörü-1 (IGF-1R) ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktör Reseptörü-2 (IGF-2R).....	26
2.5. Balıklarda Stres Metabolizması.....	28
2.5.1. Kortizol Hormonu	31
2.5.1.1. Kortizol hormon sekresyonunun düzenlenmesi	33
2.5.1.2. Kortizol hormonunun fizyolojik etkileri.....	34
2.6. Real Time PCR.....	36
2.6.1. Real Time PCR’da Kullanılan Metodlar	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
3.1. Gereç.....	38
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	39
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	39
3.1.3. Primerler	39

3.2. Yöntem	40
3.2.1. Glikoz Tayini	40
3.2.2. Kortizol Hormon Tayini	41
3.2.3. Büyüme Hormon Tayini	43
3.2.4. Total RNA İzolasyonu	44
3.2.5. RT-PCR ile cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması	46
3.2.6. Real Time PCR Uygulamaları	47
3.2.7. Gen Ekspresyonu Hesaplamaları	48
3.2.8. İstatistiksel Analizler	48
4. BULGULAR	50
4.1. Biyokimyasal Analizler	50
4.1.1. Serum Glikoz Düzeyleri	51
4.1.2. Serum Kortizol Hormon Düzeyleri	52
4.1.3. Serum Büyüme Hormon Düzeyleri	53
4.2. Gökkuşaağı Alabalığı Karaciğer ve Kas Dokusu GHR, IGF-1 ve IGF-2 Ekspresyon Düzeyleri	54
4.2.1. Karaciğer ve Kas Dokusu GHR Ekspresyon Düzeyleri	54
4.2.2. Karaciğer ve Kas Dokusu IGF-1 Ekspresyon Düzeyleri	57
4.2.3. Karaciğer ve Kas Dokusu IGF-2 Ekspresyon Düzeyleri	60
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	86
KAYNAKLAR	89
EKLER	111
ÖZGEÇMİŞ	112

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AC	: Adenilat siklaz
ACTH	: Adrenokortikotropik hormonu
ATP	: Adenozin trifosfat
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CCK	: Kolesistokinin hormonu
cDNA	: Komplementer DNA
COR	: Kortizol hormonu
CRH	: Kortikotropin uyarıcı hormon
DA	: Dopamin hormonu
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
dT	: Oligo primerler
ERK	: Hücre dışı sinyal tarafından düzenlenen kinaz
FRET	: Floresan rezonans enerji transferi
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
GH	: Büyüme hormonu
GHBP	: Büyüme hormonu bağlayıcı protein
GHR	: Büyüme hormon reseptörü
GHRH	: Büyüme hormonu uyarıcı hormon
GnRH	: Gonadotropin uyarıcı hormon
GPCR	: G-protein reseptör
GRF	: Büyüme hormonu salma faktörleri
GS	: Glukokortikosteroid
GSP	: Gen spesifik primer
HNF-1α	: Hepatosit nükleer faktörü-1 α
HNF-3β	: Hepatosit nükleer faktörü-3 β
HPA	: Hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen
HPI	: Hipotalamo-hipofiz-interrenal eksen
HRP	: İkincil antikör
HSI	: Hepatosomatik indeks
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü

IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IGF-2	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-2
IGF-1R	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 reseptörü
IGF-2R	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-2 reseptörü
IGFBP	: İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinleri
IR	: İnsülin reseptörü
IR-A	: İnsülin reseptörü-A
IR-B	: İnsülin reseptörü-B
IRS-1	: İnsülin reseptör substratı
JAK-2	: Janus kinaz-2
KBG	: Kortizol bağlayıcı globülin
KD	: Janus kinaz-2 alanı
LH	: Lüteinleştirici hormon
MAPK	: Mitojenle aktive edilen protein kinaz yolu
MSH	: Melanosit uyarıcı hormon
M-6-PR	: Mannoz-6-fosfat reseptörü
NPY	: Nöropeptid Y
PACAP	: Hipofiz adenilat siklaz aktive edici peptid
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyon
PI3K	: Fosfotidil inozitol 3-OHkinaz
PKA	: Protein kinaz A
Plc-pkc	: Fosfolipaz C-proteinkinaz C yolu
PRL	: Prolaktin hormonu
PrP	: Prolaktin salgılayan peptid
RNA	: Ribo Nükleik asit
RNAaz	: Ribonükleaz
RT	: Reverse transkriptaz
RT-PCR	: Reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu
SHC	: Mitojenle aktive olan protein kinazı aktive eden protein
SGR	: Somatik büyüme oranı
SL	: Somatolaktin hormonu
SRIF	: Somatostatin hormonu
STAT	: Sinyal iletici ve transkripsiyon başlatıcı
T3	: Triiodotironin

T4	: Tiroksin
TSH	: Tiroid uyarıcı hormon
TRH	: Tirottopin uyarıcı hormon
11β-HSD	: 11 Beta-hidroksisteroid dehidrogenaz enzimi



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Yavru balık gelişimin nöroendokrin kontrolünün şematik gösterimi..	8
Şekil 2. Somatostatinin (SRIF) - büyüme hormonu (GH) - insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) sistemi üzerindeki etkileri	11
Şekil 3. Büyüme hormonunun (GH) endokrin ve otokrin/parakrin etkisinin gösterimi	13
Şekil 4. Büyüme hormonu (GH) ile büyüme hormon reseptörünün (GHR) aktivasyonunun gösterimi	16
Şekil 5. Büyüme hormon reseptörünün (GHR) Janus kinaz (JAK-2) aktivasyonu sonrası transkripsiyon sinyal yolunun gösterimi.....	17
Şekil 6. PreproIGF ve olgun IGF'nin şematik gösterimi	19
Şekil 7. Balıklarda farklı çevresel faktörlerin GH/IGF-1 eksenini etkileme mekanizmasının şematik gösterimi.....	23
Şekil 8. Memelilerde insülin büyüme faktör reseptörlerinin (IGFR) metabolik ve mitojenik etkileri	27
Şekil 9. Normal veya stresli durumda balıkların enerji harcama durumunun şematik gösterimi	29
Şekil 10. Memelilerde kortizol hormonu sentez yolu	32
Şekil 11. Kortizol hormonunun feedback düzenlenmesi	34
Şekil 12. Serum kortizol hormon standart eğrisi.....	42
Şekil 13. “4 PL curve analysis” kullanılarak oluşturulan büyüme hormon standart eğrisi.	44
Şekil 14. Serum glikoz düzeylerine ait grafik	52
Şekil 15. Serum kortizol hormon düzeylerine ait grafik	53
Şekil 16. Serum büyüme hormon düzeylerine ait grafik.....	54
Şekil 17. Ergin ve yavru <i>Oncorhynchus mykiss</i> 'in farklı mevsim sıcaklığında karaciğer ve kas dokusunda GHR gen ekspresyon düzeylerinin grafiksel karşılaştırılması.....	56
Şekil 18. Grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4'e ait GHR'nin qRT-PCR'de elde edilen amplifikasyonunun eş zamanlı ekspresyon görüntüsü (a) ve mRNA ekspresyonunun melting point (Tm) grafiği (b).....	57
Şekil 19. Ergin ve yavru <i>Oncorhynchus mykiss</i> 'in farklı mevsim sıcaklığında karaciğer ve kas dokusunda IGF-1 gen ekspresyon düzeylerinin grafiksel karşılaştırılması.....	59

Şekil 20. Gruplara ait IGF-1'in qRT-PCR'de elde edilen amplifikasyonunun eş zamanlı ekspresyon görüntüsü (a) ve mRNA ekspresyonunun melting point (Tm) grafiği (b)	60
Şekil 21. Ergin ve yavru <i>Oncorhynchus mykiss</i> 'in farklı mevsim sıcaklığında karaciğer ve kas dokusunda IGF-2 gen ekspresyon düzeylerinin grafiksel karşılaştırılması.....	62
Şekil 22. Grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4'e ait IGF-2'nin qRT-PCR'de elde edilen amplifikasyonunun eş zamanlı ekspresyon görüntüsü (a) ve mRNA ekspresyonunun melting point (Tm) grafiği (b)	63



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Yavru (a) ve ergin (b) gökkuşuğı alabalığı	4
--	---



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Gökkuşığı alabalığının (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) taksonomik sınıflandırılması	3
Tablo 2. Balıklarda stres cevabı oluşturan fiziksel, kimyasal, biyolojik ve balıkçılık yönetiminden kaynaklanan stres faktörleri	30
Tablo 3. Çalışmada kullanılan örnekler ve grupları.....	38
Tablo 4. qRT-PCR için kullanılan primer dizileri	40
Tablo 5. PCR karışımı	47
Tablo 6. Real Time PCR döngü koşulları.....	48
Tablo 7. Ergin ve yavru <i>Oncorhynchus mykiss</i> 'in farklı mevsim sıcaklığında serum glikoz, kortizol ve büyüme hormon düzeyleri	50
Tablo 8. Serum glikoz, kortizol ve büyüme hormon düzeylerinin korelasyon düzeyleri.....	51
Tablo 9. Ergin ve yavru <i>Oncorhynchus mykiss</i> 'in farklı mevsim sıcaklığında karaciğer ve kas dokusunda GHR ortalama Ct değerleri	55
Tablo 10. Ergin ve yavru <i>Oncorhynchus mykiss</i> 'in farklı mevsim sıcaklığında karaciğer ve kas dokusunda IGF-1 ortalama Ct değerleri	58
Tablo 11. Ergin ve yavru <i>Oncorhynchus mykiss</i> 'in farklı mevsim sıcaklığında karaciğer ve kas dokusunda IGF-2 ortalama Ct değerleri	61

ÖZET

Gökkuşığı Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Büyüme Genlerinin (GH, IGF-1, IGF-2) Ekspresyonu ile Serum Kortizol Düzeyleri Üzerine Yaş ve Mevsimsel Değişimlerin Etkisi

TEKELİ H. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya (Veteriner) Programı Doktora Tezi, Aydın, 2019.

Ektotermik omurgalılar olan balıklar, büyüme süreçleri boyunca mevsimsel sıcaklık değişimlerinden etkilenir ve bu değişime karşı hormonal yollu bir yanıt oluşturur. GH ve IGF'ler, mevsimsel sıcaklık değişimlerine karşı balıklarda büyüme ve gelişimi düzenlemektedir.

Bu çalışmada; farklı mevsim sıcaklığı ve yaş aralığındaki gökkuşığı alabalıklarının karaciğer ve kas dokularında, büyümenin biyolojik belirteçleri olan büyüme faktör genlerinin belirlenmesi ve stres parametrelerinden serum kortizol ve glikoz düzeyleri arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Araştırmada ocak ve temmuz dönemlerine ait 50 - 1000 gr ağırlığında 20 adet yavru ve 20 adet ergin gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanılmış ve 10'ar örnekten 4 gruba ayrılmıştır. Alabalıkların kuyruk venlerinden kinaldin anestezisi altında kan alınmış ve serum örnekleri elde edilmiştir. Kas örnekleri, dorsal yüzgeç ile yan çizgi arasında kalan kas dokusundan alınmıştır. Elde edilen serum örneklerinde GH ve kortizol hormonları ELISA yöntemi ile glikoz düzeyleri kolorimetrik olarak belirlenmiştir. Karaciğer ve kas doku örneklerinden mRNA ve cDNA sentezleri yapılmış ve RT-PCR'da uygun primerler kullanılarak GHR, IGF-1 ve IGF-2 genlerine ait ekspresyon düzeyleri incelenmiştir.

Analiz sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek serum glikoz düzeyine sahip temmuz dönemi ergin alabalık grubu ile ocak dönemi yavru alabalık grubu arasında istatistiksel bir fark gözlemlenirken ($p<0,001$), diğer gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Serum kortizol düzeylerinin temmuz dönemi yavru alabalık grubunda diğer gruplara göre artış gösterdiği ancak gruplar arasında istatistiksel düzeyde fark olmadığı tespit edilmiştir. Temmuz dönemi yavru alabalık grubunun serum GH düzeylerinin, ocak dönemi yavru ve ergin alabalık gruplarına göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$).

Ocak döneminde yavru alabalıkların karaciğer dokusunda IGF-1 ve IGF-2 genlerinin ergin alabalıklara göre 8 - 18 kat, aynı şekilde kas dokusunda GHR, IGF-1 ve IGF-2 genlerinin

yavru alabalıklarda 2 - 11 kat daha yüksek eksprese olduğu tespit edilmiştir. Benzer artışlar temmuz dönemi yavru alabalıkların karaciğer GHR, IGF-1 ve IGF-2 genlerinde gözlenirken, kas dokusunda yaşa bağlı büyüme faktör genlerinde önemli bir artış gözlenmemiştir.

Mevsimsel sıcaklık değişimine bağlı aynı yaştaki ergin alabalıkların karaciğer dokusunda GHR ve IGF-2 genlerinin ocak döneminde temmuz dönemine göre 2 kat; kas GHR, IGF-1 ve IGF-2 genlerinin ise temmuz döneminde 2 - 6 kat fazla eksprese olduğu belirlenmiştir. Yavru alabalıkların karaciğer ve kas dokularında IGF-1 gen ekspresyonunun temmuz ve ocak dönemleri arasında farklı olmadığı; IGF-2 geninin ise ocak döneminde 2 kat daha yüksek eksprese olduğu görülmüştür.

Farklı mevsim sıcaklığı ve yaş aralığındaki gökkuşağı alabalıklarında sıcaklık değişimlerinin stres oluşturmadığı görülmüştür. Yavru ve ergin gökkuşağı alabalıklarının yüksek sıcaklıkta artan GH düzeyleri ile büyüme ve gelişimi düzenleyebileceği, aynı zamanda büyüme ve gelişim süreçlerinde düşük sıcaklığa yavru gökkuşağı alabalıklarının ergin gökkuşağı alabalıklarına göre daha iyi uyum sağladığı kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: GH, GHR, IGF-1, IGF-2, kortizol, mevsimsel sıcaklık ve yaş.

ABSTRACT

The Effect of Age and Seasonal Changes on Serum Cortisol Levels with Expression of Growth Genes (GH, IGF-1, IGF-2) in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*).

TEKELİ H. Aydın Adnan Menderes University, Institute of Health Science, Biochemistry (Veterinary) Program PhD Thesis, Aydın, 2019.

Fish, which are ectothermic vertebrates, are affected by seasonal temperature changes throughout the growth processes and create a hormonal response against these changes. GH and IGFs regulate growth and development of fish against the seasonal temperature changes.

The aim of this study is to determine growth factor genes, which are biological markers of growth in liver and muscle tissues of Rainbow trout in different seasonal temperatures and age ranges and the reveal of the relationship between serum cortisol and glucose levels from stress parameters.

A total of 20 juvenile and 20 adult Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ranging from 50 to 1000 gr, belonging to the january and july period, were used and separated into four groups of 10 samples each. Blood was drawn from the tail veins of the trout under quinaldine anesthesia and serum samples were obtained. Muscle samples were obtained from the muscle tissue between the dorsal fin and the side line. GH and cortisol hormone levels from the obtained serum samples were obtained using the ELISA method and glucose levels were determined colorimetrically. mRNA and cDNA syntheses were made from liver and muscle tissue samples and the expression levels of GHR, IGF-1 and IGF-2 genes were examined using appropriate primers for RT-PCR.

The analysis results showed that there was a statistical difference between the july period adult trout group, with the highest serum glucose level, and the january period juvenile trout group ($p<0,001$) but no significant difference between the other groups. The serum cortisol levels showed an increase in the july period juvenile trout group in comparison to the other groups but no statistically significant difference was determined between the groups. It was determined that the serum growth hormone levels of the july period juvenile trout group were significantly higher than those of the january period juvenile and adult trout groups ($p<0,001$). Also, the IGF-1 ve IGF-2 gene expression in the liver tissue of the january juvenile trout group was 8 to 18 times higher compared to the adult trout group and the GHR, IGF-1 and IGF-2 gene expression in the muscle tissue was two to eleven times higher in the juvenile

trout group than in the adult trout group. Similar increases were observed in the GHR, IGF-1 and IGF-2 gene expression in the liver of the July period juvenile trout but no significant increase in growth factor genes regarding muscle tissue was observed.

The GHR and IGF-2 gene expression in the liver tissue of adult trout of the same age due to seasonal temperature change was two times higher in the January period compared to the July period and it was determined that the GHR, IGF-1 and IGF-2 genes in the muscle showed a two to six times higher expression in the July period. It was observed that the IGF-1 gene expression in the liver and muscle tissue of juvenile trout showed no difference between the July and January period but that the IGF-2 gene showed a two times higher expression in the January period.

It was seen that the temperature changes did not cause stress in the Rainbow trout with different seasonal temperatures and age ranges. It was concluded that the GH levels, which increase with high temperatures in juvenile and adult Rainbow trout, can regulate growth and development and that juvenile Rainbow trout better adapt to low temperature during growth and development processes in comparison to adult Rainbow trout.

Key words: Cortisol, GH, GHR, IGF-1, IGF-2, seasonal temperature and age.

1. GİRİŞ

Balıklarda büyüme esas olarak iskelet kas kütlelerinin artışına bağlıdır. İskelet kasının oluşumunda bağ dokuda bulunan mezenkim hücreleri farklılaşarak miyoblastları, miyoblastlar ise bölünüp çoğalarak miyotüpleri, miyotüpler de birleşip kas proteinlerini oluştururlar. Memelilerin aksine balıklarda iskelet kas kütlelerinin artışı hem hiperplazi hem de hipertrofi ile gerçekleşmektedir.

Balıklarda büyüme ve gelişme, iç ve dış değişkenlerden oluşan karmaşık bir dizi ve bunların etkileşimleri ile kontrol edilir. Mevsimlere bağlı olarak su sıcaklığındaki değişiklikler, çevresel fotoperiyodun değişimi, mineral madde miktarı, tuzluluk ve toksisite gibi dış faktörler ile yaş, hormonların regülasyonu, beslenme, stres ve hastalıklara karşı bireysel yanıtlar gibi iç faktörler büyüme oranları üzerinde önemli etkilere sahiptir. Özellikle günlük ve mevsimsel sıcaklık değişimlerinin, ektotermik canlılarda stres oluşturabildiği ve metabolik süreçleri etkileyerek canlı gelişimini etkilediği düşünülmektedir.

Balıklar büyüme süreci boyunca farklı çevresel uyarlardan etkilenir ve bu uyarılara karşı organizma hormonal yollu bir yanıt oluşturarak gelişim sürecini ya baskılar ya da başlatırlar. Sıcaklık gibi dış uyarılara karşı yanıt oluşturan hormonlardan biri olan GH balık gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Ön hipofiz bezinin somatotropik hücreleri tarafından sentezlenen GH, diğer büyüme faktörlerinin (IGF-1 ve IGF-2) aktivitesini de düzenleyerek somatik büyümeyi GH/IGF ekseninde kontrol etmektedir. Aynı zamanda IGF'lerde, hem büyümeyi hem de metabolizmayı kontrol eden süreçlerin temel unsurlarıdır.

Balıklarda karaciğer ve kas hücrelerinde eksprese olan büyüme faktörleri genleri, bu hücrelerdeki karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasını düzenleyerek, büyüme oranları üzerinde önemli belirteçler haline gelmiştir. Son yirmi yılda larval dönemden yavruya, ergin dönemden büyüme aşamasına kadar balıkların gelişim süreçlerinde GH ve IGF sisteminin fizyolojik rolüne olan ilgi giderek artmaktadır. IGF'lerin, özellikle de IGF-1 ve son yıllarda IGF-2'nin, bunların reseptörlerinin (IGF-1R, IGF-2R), GH ve GHR'nin balık gelişimi ve büyümesi üzerindeki önemi, farklı değişkenler incelenerek araştırılmaktadır. GH/IGF ekseninin işlevini arttırmak veya azaltmak için yaş, beslenme, mevsimler, çevresel sıcaklık, fotoperiyot, tuzluluk ve toksisite gibi değişkenlerin potansiyel etkisi araştırmaların yoğunlaştığı konulardır.

Bu çalışmada, farklı mevsimsel sıcaklıkta ergin ve yavru gökkuşağı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğer ve kas dokularında büyüme gen ekspresyonları kantitatif olarak değerlendirilmiş ve stres parametrelerinden olan serum kortizol ve glikoz düzeylerinin değişimleri incelenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)

Dünyanın birçok ülkesinde yaygın olarak üretimi yapılan Kuzey Amerika kökenli gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), iklim koşulları ve ekolojik özellikleri uygun olan ülkemizde de kültürü en fazla olan balık türlerinden biridir. Gökkuşığı alabalıkları; çevre koşullarına kolay adapte olmaları, iyi yemleme koşulları altında hızlı büyümeleri, kısa kuluçka süreleri, geniş sıcaklık aralığında yaşamaları, hastalıklara karşı dirençli olmalarından dolayı kültür balıkçılığında tercih edilmektedir ve ekonomik önemi olan bir türdür (Akbulut ve Keten, 2001).

Uzun yıllar *Salmo gairdneri* olarak bilinen bu tür 1988 yılında Amerika Balıkçılık Derneği Balık isimlendirme Komitesi tarafından, bütün Pasifik alabalık ve salmonları için *Oncorhynchus* cins isminin kullanılmasına karar vererek salmon ve Atlantik alabalıklarının ayırt edilmesine olanak sağlamıştır. Böylece gökkuşığı alabalıklarının tür adı olarak *Oncorhynchus mykiss* kullanımı uluslararası alanda kabul görmüştür. Ülkemizde 1970’li yıllardan itibaren üretimi yaygınlaşan gökkuşığı alabalığının taksonomik sınıflandırması şu şekildedir (Smith ve Stearly, 1989);

Tablo 1. Gökkuşığı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) taksonomik sınıflandırması.

Türkçe	Latince
Alem:	<i>Animalia</i>
Şube:	<i>Chordata</i>
Alt şube:	<i>Vertebrata</i>
Üst sınıf:	<i>Osteichthyes</i>
Sınıf:	<i>Actinopterygii</i>
Alt Sınıf:	<i>Neopterterygii</i>
Üst Takım:	<i>Ostariophysi</i>
Takım:	<i>Salmoniformes</i>
Aile:	<i>Salmonidae</i>
Cins:	<i>Oncorhynchus</i>
Tür:	<i>Oncorhynchus mykiss</i>

Morfolojik olarak gökkuşaağı alabalıklarının vücudu uzamış ve basıktır. Ağız yapısı diğeer alabalık türlerine göre büyüktür. Sırt yüzgeci 10 - 12, anal yüzgeci ise 8 - 12 yumuşak ışına sahiptir ve sırt kısmında bir yağ yüzgeci bulunur. Alt yüzgeçler, lekesiz, açık pembe renktedir. Renklenme, bölgelere ve yaşa göre farklılıklar gösterir. Yetişkin tatlı su formları genelde mavi-yeşil veya zeytin yeşili olup yanal çizgi üzerinde siyah benekler görülür. Yavru formlardan daha baskın şekilde yetişkin formlarda, solungaçlarından kuyruğa doğru yanal çizgi boyunca geniş kırmızı-pembe gökkuşaağı şeklinde bir şerit bulunur. Renkli şeride sahip olmasından dolayı gökkuşaağı alabalığı ismini almıştır. Özellikle bu bantlar yumurtlama dönemleri olan aralık ve mayıs aylarında daha göz alıcı hale gelmektedir. Yumurtlama döneminde özellikle erkeklerin alt çeneleri uzamakta ve çengelimsi bir şekile dönüşmektedir (Behnke, 2002).



a)



b)

Resim 1. Yavru (a) ve ergin (b) gökkuşaağı alabalığı.

Gökkuşaağı alabalığı için en uygun yaşam sıcaklığı 9 ila 20 °C arasındadır. Kültürünün yapılabilmesi için larva ve yavru dönemlerinde ideal su sıcaklığının 9 ila 13 °C, ergin dönemde ise 12 ila 20 °C arasında olması yetiştiricilik için uygundur. 4 °C'nin altındaki ve 26 °C'nin üzerindeki su sıcaklıklarında, beslenme ve büyümenin olumsuz etkilendiğı görülür. Çünkü alabalıklar gibi soğuk su balıklarının spesifik bir metabolizma türü vardır; düşük sıcaklıklarda metabolizma aktif şekilde çalışırken, 26 °C'nin üzerindeki yüksek sıcaklıklarda daha az yiyecek tüketilmesi ile metabolizma yavaşlamaktadır (Avkhimovich, 2013).

Balıklar doğal yaşam alanlarında mevsimsel sıcaklık değişimlerine kolay adapte olarak ve metabolizmalarını minimuma düşürerek canlı kalabilmektedir. Gökkuşaağı alabalığı için her ne kadar ideal yaşam sıcaklığı için 9 ila 18 °C arası tercih edilse de, bulunduğu ortama kolay adapte olma yeteneğinden dolayı yüksek sıcaklıklarda da yaşayabilen bir türdür. Gökkuşaağı alabalığının 29 °C'ye ulaşan su sıcaklığını tolere edebilmek için fizyolojisini benzersiz bir

şekilde ayarladığı ve canlılık faaliyetlerini devam ettirebildiği genomik çalışmalarla gösterilmiştir (Narum ve ark, 2010).

Gökkuşığı alabalıkları oksijence zengin, soğuk ve berrak suları sevmektedir. Çözünmüş oksijen seviyesi için optimal konsantrasyon 9 mg/l'den az olmamalıdır. Sudaki ölümcül oksijen konsantrasyon ise 2,5 mg/l'dir. Balık büyümesinde önemli role sahip olan oksijen konsantrasyonu sıcaklık ile orantılı olarak değişmektedir. Bu yüzden 10 °C'de en az 5 mg/l, 15 °C'de en az 6 mg/l ve 20 °C'de 7 mg/l'den az olmamalıdır. Karbondioksit konsantrasyonu ise alabalık yetiştiriciliğinde uygun koşullarda 10 mg/l'yi geçmemelidir, ancak 50 mg/l'ye kadar suda canlı kalabilmektedir Suyun pH'nin 6 - 8,5 değerleri arasında olması ideal iken 4,5'un altındaki ve 9'un üzerindeki pH değerleri canlı için kritik değerlerdir. Genel olarak, asitli sulardaki alabalıkların büyüme oranı alkali sulardakine göre daha düşüktür ve büyüme oranı sabit pH'ta değişken pH değerlerine göre daha yüksektir (Avkhimovich, 2013).

Erkek ve dişi alabalıklar 2 - 3 yıl içinde farklı oranlarda olgunlaşır ve yetişkinleri ortalama 0,5 gr ve 2,3 kg arasındadır. Olgunlaşması için kuluçkadan sonra 12 °C ila 18 °C optimum sıcaklık gereklidir (Narum ve ark, 2010). Yumurtlama döneminde olgun dişi gökkuşığı alabalığı vücut ağırlığının kilogramı başına 2000 yumurta bırakır. Büyüme için normal diyetin % 40 - 55 protein oranına sahip olması önerilir. Büyüme oranları su sıcaklığına ve bulunduğu ortamdaki besin miktarına göre değişkenlik gösterir. Beslenme özellikleri bakımından karnivordur ve doğal olarak zooplankton, yumuşakça, aquatik böceklerin larvaları ve küçük balıklarla beslenirler (Yaseen ve ark, 2016).

Gelişime bağlı olarak alabalıklarda kas doku istemli ve istemsiz kaslar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Bu kas doku sıcakkanlı hayvanların kas sistemi ile benzerlik gösterirken, tek fark kas fibrillerinin uzunluğunun sıcakkanlı hayvanların kas fibrillerinin uzunluğu kadar olmamasıdır. İstemli kaslar hareketi sağlayan somatik kaslardır ve çizgili kaslardan oluşmaktadır. Miyomer olarak adlandırılan, alabalıkların hareketini sağlayan bu kaslar; özellikle başın arka kısmından kuyruğa kadar halkasal bir şekilde uzanırlar ve her bir yüzgecin kaidesine yerleşmişlerdir. Somatik kaslar kompleks bir yapıya sahip olmakla birlikte vücudun total kütlesinin yaklaşık % 50'sini oluşturmaktadır. İstemsiz kas dokusunda visceral kaslar düz kaslardan oluşurken sindirim ve boşaltım gibi fonksiyonları sağlamaktadır (Guyton ve Hall, 2006).

2.2. Balıklarda Hipotalamus ve Hipofiz İlişkisi

Balıklarda endokrin sistem aşamalı şekilde düzenlenir ve hipotalamus ön hipofiz bezinin aktivitesini düzenleyerek çok sayıda periferik endokrin bezin işleyişini kontrol eder. Bu bezler, ürünlerini kan dolaşımına ve vücut dokularına salgılayan, merkezi sinir sistemi ile birlikte birçok vücut fonksiyonunu kontrol eden ve düzenleyen endokrin bezlerdir. Aynı şekilde balık endokrin dokuları omurgalılarla benzerlik gösterirken, bu endokrin dokular omurgalılarda bulundukları yerden farklı yerlerde oluşabilmektedir. Farklı yerlerde oluşmalarına rağmen çoğu aynı veya benzer hormonlar sentezlerler (Tonsfeldt ve Chappell, 2012).

Hormonlar, vücut sıvıları ile hücreler arasında taşınan protein yapıdaki kimyasal habercilerdir. Bu kimyasal haberciler çok hücreli olan birçok canlı türünde bulunmaktadır. Sentezlendikleri bezlerden direkt olarak kan dolaşımına, vücut sıvılarına veya bitişik hücrelere salınırlar. Dolaşımdaki hormonlar difüzyon ya da aktif taşıma yoluyla hedef hücrelere, dokulara veya organlara geçerek bu yapılarda spesifik özelliklerine göre belirli etkiler oluşturmaktadır. Büyüme oranının düzenlenmesi, immün sistemin harekete geçirilmesi ya da durdurulması, metabolik aktivitelerin kontrolü ve üreme gibi birçok yaşamsal aktivitede hormonların etkili olduğu bilinmektedir (Machluf ve ark, 2011).

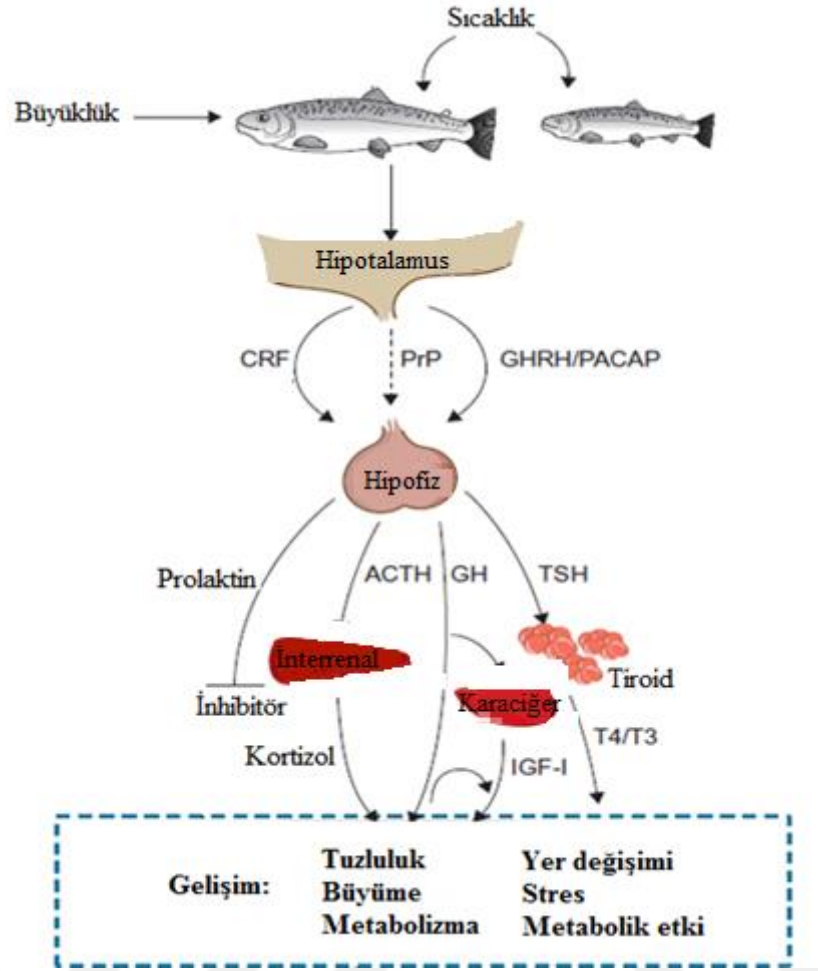
Balıklarda hipofiz bezi ve kısımlarının adlandırılmasında Pickford ve Atz'ın (1957) önerdiği terminoloji kabul görmektedir. Balıkların çoğunda hipofiz, hipotalamusun altında küçük bir organ olarak bulunmaktadır. Balık hipofizinin; büyüme ve cinsel olgunlaşma sırasında, sıcaklık ve osmotik stres gibi çevresel faktörlerin olumsuz etkilerine karşı koruyucu rolü olduğu bilinmektedir.

Diğer omurgalılarda olduğu gibi balık hipofizi, nörohipofiz ve adenohipofiz olarak adlandırılan iki farklı bölümden oluşmaktadır. Ektodermal kaynaklı olan bu iki bölüm, embriyolojik açıdan aralarına bezi besleyen kan damarlarını içeren mezodermal rudimenti olarak birleşmektedir. Bu bölümlerden biri olan nörohipofiz, beyin tabanında diyensefalonun ventralinde yer alır ve belirgin bir sinir dokusu şeklinde olup adenohipofizin fonksiyonlarını düzenlemektedir. Nörohipofiz hormonları, hipotalamusun nörosekresyon hücreleri tarafından salgılanarak nörohipofizde depo edilir ve oradan kana verilmektedir. Bu hormonlar vazopresin benzeri peptidler ve oksitosin benzeri peptidler olmak üzere iki farklı hormon ailesini oluşturmaktadır; vazopressin benzeri peptidlerden vasotisin hormonu, oksitosin benzeri peptidlerden ise oksitosin ve isotisin hormonlarıdır. Bu hormonlar osmoregülasyon ve üreme olaylarında görev yapmaktadır (Machluf ve ark, 2011). Adenohipofiz ise, farenksin

üst kısmından ektodermal bir çıkıntı biçiminde oluşan Rathke cebidir. Bez yapısında olup memelilerinkine benzer görevleri vardır. Adenohipofiz, histolojik olarak birbirinden farklı üç bölümden oluşmaktadır (*pro-adenohipofiz*, *mezo-adenohipofiz* ve *meta-adenohipofiz*) ve bu bezin anterior bölümü *pars distalis* olarak adlandırılmaktadır. *Pars distalis*, rostral (pro-adenohipofiz) ve proksimal (mezo-adenohipofiz) kısımlarından oluşur. *Pars distalisin* bu bölgelerinin, memelilerin anterior lobunun karakteristik hücre tiplerinin hepsini içerdiği ve salgılama işlemi genellikle bu bölümde meydana geldiği belirtilmiştir. *Pars intermedia* (metaadenohipofiz) ise aynı bölgenin posterior bölümüne denilmektedir ve memelilerdekinden daha belirgindir. Adenohipofiz bölgesi, farklı peptid hormonlarının sentezlendiği, depolandığı ve kana salınmasının gerçekleştirildiği bölümdür. Adenohipofiz hormonların salgılanması, hipotalamik nöronlar tarafından üretilen salınım faktörlerinin kontrolü altındadır (Zohar ve ark, 2010).

Balıklarda hipofiz fonksiyonunu kontrol eden ilgili salınım faktörleri, nörosekretuar hipotalamik nöronlarında üretilerek adenohipofizin pars distalisine ulaştırılır ve böylece hipotalamik-hipofizyal eksen oluşmaktadır. Hipotalamik-hipofizyal ekseninde, birçok hormonun salınımı kontrol edilmektedir (Machluf ve ark, 2011). Bu ekseninde hipotalamik salınım hormonları [Gonadotropin uyarıcı hormon (GnRH), kortikotropin uyarıcı hormon (CRH), büyüme hormonu uyarıcı hormon (GHRH)], adenohipofizdeki farklı tropik hormon üreten hücreler (Gonadotropin, kortikotrop, tirotroplar, somatotropik) tarafından kontrol edilmektedir. Adenohipofizde; tiroidin salgısını kontrol eden tirotropin (TSH) gonadların gelişmeleriyle gonad hormonlarının salgılanmasında rol oynayan gonadotropinler (FSH ve LH) gibi glikoprotein hormonları, somatotropin (GH)/(PRL) ailesi hormonlarından olan büyümede rol oynayan somatotropin ya da büyüme hormonu (GH) ve somatolaktin hormonu (SL), osmoregülasyonda rol oynayan prolaktin (PRL) hormonları, adrenal korteksin fonksiyonlarını kontrol eden adrenokortikotropin (ACTH) ve melanogeneze rol oynayan intermedin salgılayan (MSH) hormonları sentezlenmektedir (Cowan ve ark, 2017).

Yavru dönem aynı oranda olmasa da, gelişim sırasında farklı fizyolojik etkilere sahip birçok hormonun arttığı, 'hiperendokrin' bir dönem olarak nitelendirilmektedir. Yavru balık gelişimi sırasında görülen metabolik olayların genellikle bir uyarıcı hormon ve bir inhibitör hormon tarafından kontrol edildiği belirtilmektedir. Bu durumun yavru dönem boyunca balıklara fizyolojik, morfolojik ve davranışsal özellikler bakımından esneklik sağladığı düşünülmektedir (McCormick, 2012).



Şekil 1. Yavru balık gelişiminin nöroendokrin kontrolünün şematik gösterimi. Yavru balık gelişiminde dolaşımdaki GH, kortizol ve tiroid hormon sentezini uyarmak için sıcaklık-beyin-hipofiz eksenini daha yüksek yanıt ile sonlanmaktadır. GH ve kortizol hormon sentezi kas, karaciğer, böbrek ve tiroidlerde büyüme ve metabolizma değişikliklerine neden olmaktadır. Prolaktin, genel olarak yavru gelişiminin birçok yönünü inhibe ettiği düşünülmektedir. Birçok hormonun salgılanması ve periferik reseptörlerin düzenlenmesi de dahil olmak üzere endokrin bileşenler arasında önemli bir etkileşim bulunmaktadır. (CRF: Kortikotropin salma faktörü; PrP: Prolaktin salgılayan peptid, GHRH: Büyüme hormonu uyaran hormon; PACAP: Hipofiz adenilat siklaz aktive edici peptid; ACTH: Adrenokortikotropik hormon; TSH: Tiroid uyarıcı hormon) (McCormick, 2012).

2.3. Büyüme Hormon Metabolizması

Balıklarda büyüme, çoğunlukla çeşitli hormonlar ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenen karmaşık bir işlemdir. GH, somatik büyümenin beslenme ve üreme durumu ile sıkı

sıkıya bağlantılı olmasının yanısıra; hücre bölünmesi, protein sentezi, iskelet gelişimi ve üreme gibi organizmanın gelişimi ve büyümesinden sorumludur. GH sekresyonu birçok hormon tarafından düzenlenen kompleks bir endokrin sisteme sahiptir (Bergan ve Sheridan, 2018).

Büyüme hormonu, prolaktin (PRL)/somatolaktin (SL) sitokin ailesinin bir üyesidir. GH diğer adıyla somatotropin; molekül ağırlığı 22 kDa olan, iki disülfid bağı ve 191 aminoasitten oluşan tek zincirli bir polipeptittir. Ön hipofizin pars distalis bölgesindeki somatotrop hücrelerinden sentezlenerek kan yoluyla biyolojik etki için hedef organlara taşınır. Hipotalamusun kontrolünde; nöronal, nöroendokrin ve endokrin sinyaller ile GH sekresyonu düzenlenmektedir. Bu sinyaller, hücrelerdeki biyokimyasal reaksiyonlarda görevli hormonlar, çevresel faktörler ve fizyolojik süreçlerden kaynaklanan negatif geri bildirimler ile gerçekleşmektedir. Memelilerde GH; lenfositler, plasenta, meme dokusu, pineal bez ve beyin tarafından sentezlenir (Won ve Borski, 2013).

Hipotalamik düzenleme hem uyarıcı hem de inhibe edicidir. GH salgılatıcı faktörleri (GRF), GH salgılanmasını uyarır ve tüm omurgalı gruplarında bulunur. GH'nin sentezi, adenilat siklaz (AC)/siklik adenosin monofosfat (cAMP)/protein kinaz A (PKA) ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yollarının aktivasyonu ile gerçekleşir (Butler ve Le Roith, 2001).

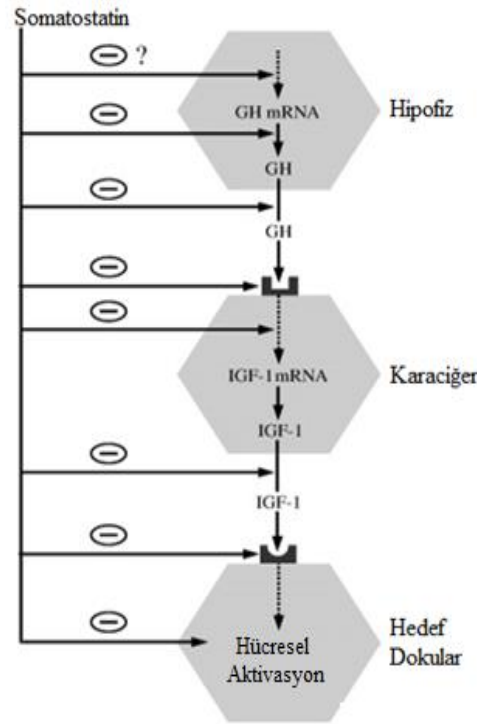
Sekresyonu sağlayan hormonlardan olan tiroid hormonları (T3 ve T4) normal bir büyüme hızı için gereklidir ve tiroid bezi tarafından üretilmektedir. Bu iki hormonun fonksiyonu nitelik olarak aynı olmakla birlikte etki hızı ve şiddeti yönünden birbirlerinden farklılık göstermektedir. Özellikle T3 hormonu bazal metabolizma hızını arttırarak balık büyümesini teşvik etmektedir (Won ve Borski, 2013). Büyüme de etkili hormon olan büyüme hormonu uyarıcı hormon (GHRH), hipotalamus tarafından salgılanan, 44 aminoasit içeren bir polipeptiddir. Memeli GHRH'nin birincil görevi, yedi proteinli G-protein reseptör sınıfına (GPCR'ler) ait spesifik bir GHRH reseptörüne (GHRH-R) bağlanarak hipofiz somatotroflerinden GH salınımını uyarmaktır. GHRH, hücre çoğalması aktivasyonu ve hücre farklılaşmasının düzenlemesi gibi metabolik olaylarda rol oynar. GHRH'yi şifreleyen ilk balık cDNA'ları 2007'de hem zebra balığı hem de akvaryum balığı olarak tanımlanmıştır. GHRH ile indüklenen balıklarda GH salgılanmasının uyarılması, hem adenilat siklaz/cAMP/protein kinaz A yolu hem de nitrik oksit/nitrik oksit sentaz yolu ile gerçekleşir. Sekresyonda etkili olan uyarılar hücre yüzeyinde bulunan uygun hormon reseptörü tarafından algılanarak hücre membranında bulunan adenil siklaza bağlanır. Fosfodiesteraz enzimi tarafından ATP, cAMP'ye indirgenir ve hücreye Ca^{+2} iyonlarının eklenmesi ile hücrelerden GH sekresyonu

gerçekleştirilir (Canosa ve ark, 2008). Ayrıca hipotalamusta aynı anda GHRH sekresyonunun arttığı ve somatostatin (SRIF) sekresyonunun azaldığı durumlarda GH sekresyonun olduğu rapor edilmiştir (Bodart, 2017). Ghrelin tüm büyük omurgalı gruplarında açlık hormonu olarak bilinen GH'yi düzenleyen bir peptid hormonudur. Bu hormon, hipofizin GRF sinerjisti olarak hareket ederek somatotrof hücrelerinde GH salgılanmasını uyarır (Kling ve ark, 2012). Dopamin (DA), nöropeptid Y (NPY), gonadotropin uyarıcı hormonlar (GnRH), tirotopin uyarıcı hormon (TRH), kolesistokinin (CCK), bombesin ve aktivin gibi birçok hormon GH sekresyonunu düzenlemektedir (Chang ve Wong, 2009). Ayrıca endojen (beslenme ve humoral değişiklikler) ve eksojen (sıcaklık, fotoperiyot, tuzluluk) faktörlerde, büyüme hormonunun (GH) sentezini etkilemektedir (Chauvigné ve ark, 2003d; Saera ve ark, 2007; Imsland ve ark, 2008; Árnason ve ark, 2013).

Plazma GH'nin % 60'ı, dolaşımdaki büyüme hormon bağlayıcı proteinlerine (GHBP) bağlıdır. GHBP'ler 50 - 60 kDa'luk tek zincirli bir glikoproteindir. Yapıları GHR'nin ligand bağlama bölgesi ile benzerlik göstermektedir. GHBP'ler, membrana bağlı GHR'den proteolitik olarak salınarak ya da doğrudan pre-GHR/GH mRNA'sının alternatif bir ekleme ürünü olarak sentezlenmektedir. Sonuçta her iki oluşum şeklide GHR'ler ile gerçekleşmesine rağmen plazma GH'un GHBP'lere bağlanma eğilimi GHR'lere göre daha yüksektir (Herington ve Brooks, 2004). GHBP'lerin fizyolojik ilişkisine dair farklı görüşler vardır. GHBP'ler, GH'nin fizyolojik aktivitesini iki şekilde değiştirirler; birincisi hormonun degradasyondan korunması ve biyolojik yarı ömrünü uzatması, ikincisi ise GH bağlanması için GHR ile rekabet ederek dolaşımdaki GH'nin reseptör uyarımını azaltmasıdır. Bir diğer görüş ise doku seviyesinde GHBP'ler, ligand için GHR'ler ile rekabet ederken, belki de hücre yüzeyinde GHR/GHBP dimerleri oluşturarak GH etkisini düzenlemektedir. Her iki durum da GH hareketini antagonize etme eğiliminde olup, hem *in vitro* koşullarda GH'nin GHR'lere bağlanmasını engellemekte hem de GH aktivitesini inhibe etmektedir (Katsumata, 2010). Sohm ve ark (1998), GHR'nin hücre dışı alanına yönelik bir antikör kullanılarak, gökkuşağı alabalıklarında 130 - 150 kDa'luk GH-GHBP kompleksleri oluştuğunu rapor etmişlerdir. Bu yüzden araştırmacılar, gökkuşağı alabalıklarında GHBP'lerin hücre dışında GHR gibi görev yaptığını belirtmişlerdir.

Büyüme hormonunu inhibe eden hormonlardan biri olan somatostatin (SRIF), 14 aminoasitten oluşmuş bir bileşiktir ve hem *in vitro*; hem de *in vivo* koşullarda büyüme hormonunun sekresyonunu azaltarak güçlü bir inhibitör etkisi gösterir. Memelilerde SRIF, GH ve PRL de dahil olmak üzere çoğu hipofiz hormonu salgılanmasını inhibe eder (Sheridan ve Hagemeister, 2009). SRIF, gonadotropin uyaran hormon (GnRH), dopamin (DA) ve

hipofiz adenilat siklaz aktifleştirici peptid (PACAP) gibi bir dizi uyarıcı faktör tarafından uyarılan GH sekresyonunu azaltır veya ortadan kaldırır. SRIF'in, kalkan balığında GH bazal salgılanmasını % 95 oranında azalttığı ve PACAP'ın GH salgılaması üzerindeki uyarıcı etkilerini sadece SRIF varlığında ortaya çıkardığı belirtilmiştir (Hagemeister ve Sheridan, 2008). Eksojen SRIF uygulaması akvaryum balığı, gökkuşağı alabalığı, tilapia ve Chinook somonunda bazal GH salgılanmasını azaltmıştır (Canosa ve ark, 2008). SRIF'in GH sekresyonu üzerindeki inhibitör etkisi, çeşitli in vitro deneylerde açıkça gösterilmiştir (Mark ve Sheridan, 2010). SRIF, gelişimsel aşamadan beslenme durumuna kadar birçok süreçte balık gelişimini GH yoluyla etkilemektedir (Canosa ve ark, 2008). Çalışmalar SRIF'in balık hepatositlerinin büyüme hormonu hassasiyetinin düzenlenmesinde yer aldığını ve GHR ekspresyonu ve IGF-1 biyosentezi ve sekresyon seviyelerinde bir azalmaya yol açabileceğini göstermektedir (Very ve ark, 2008). Jesus ve Hirano (1992) gökkuşağı alabalıklarında yaptıkları çalışmada, SRIF'in GH mRNA ekspresyonu sentezini baskılamadığını, sentez oranından ziyade sadece salınım mekanizmalarını etkilediğini bildirmişlerdir. Ayrıca büyüme hormonunun kendisi de SRIF üzerinden negatif geri bildirim yaparak GH sekresyonunu baskılamaktadır. Aynı zamanda noradrenalin ve serotonin hormonlarının da GH sekresyonunu üzerinde önleyici etkisi bulunmaktadır (Poppinga ve ark, 2007).



Şekil 2. Somatostatinin (SRIF) - büyüme hormonu (GH) - insülin benzeri büyüme faktörü -1 (IGF-1) sistemi üzerindeki etkileri. SRIF, hipofiz düzeyinde GH üretimini ve karaciğer gibi

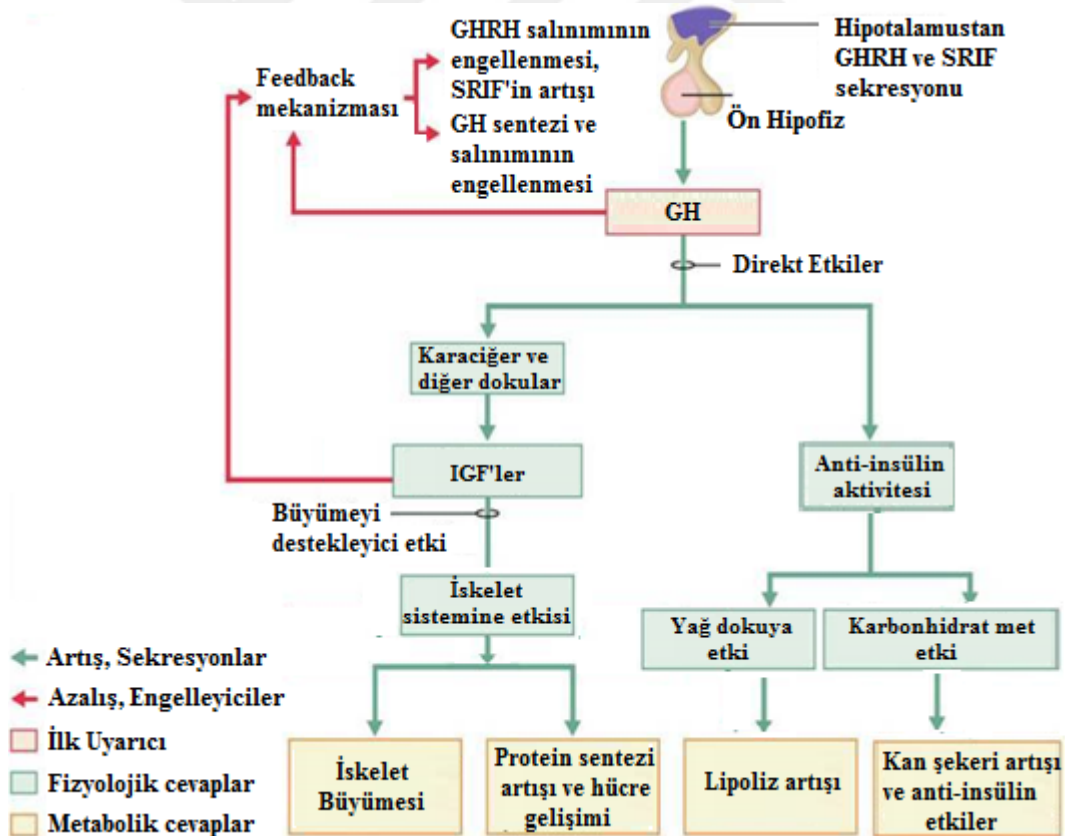
periferik dokulardan IGF-1 üretimi ve salımını inhibe eder. SRIF ayrıca, GH ve IGF-1 reseptörlerini inhibe ederek periferik dokuların GH ve IGF-1'e duyarlılığını azaltır (Sheridan ve Hagemester, 2009).

Büyüme hormonu, vücut dokuları üzerinde etkisini büyüme hormon reseptörü (GHR) aracılığıyla direkt ya da indirekt şekilde göstermektedir. Direkt etkide hedef hücrelerdeki reseptörlere (GHR) bağlanarak hücre içi sinyal yolunu başlatmaktadır. İndirekt etkide ise insülin benzeri büyüme faktörleri ailesinden olan IGF-1'in sekresyonunu sağlayarak gerçekleştirmektedir. GH, dolaşımdaki IGF-1'in ana kaynağı olan balık karaciğeriindeki IGF-1 ekspresyonunu uyararak indirekt etkisini ortaya çıkarmaktadır. Böylece karaciğerin GH'nin indirekt etkisinin sağlanmasında hedef organ olduğu gösterilmiştir (Reindl ve Sheridan, 2012). Bununla birlikte, balıkların büyüme ve gelişiminde GH ve IGF-1 etkisi bilinse dahi, bu etkinin direkt mi yoksa indirekt mi olduğu konusunda belirsizliğin devam ettiği bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Reinecke, 2010; Fuentes ve ark, 2013). GH sekresyonunda direkt ve indirekt etkiler dışında; IGF-1'in, hipofiz ve hipotalamusun üzerindeki negatif geri bildirim etkisi ile GH sekresyonunu düzenlediği gözlemlenmiştir. Bunu da kendi spesifik reseptörlerine bağlanarak baskıladığı ileri sürülmüştür. Ayrıca GH, hipotalamusa etki ederek kendi sekresyonunu da ayarlamaktadır (Fuentes ve ark, 2013).

Sıcaklık, beslenme ve fotoperiyot gibi çevresel faktörler GH sekresyonunu etkiler. 26 °C'de tutulan tilapia balıkları, 20 °C'de tutulana göre daha yüksek plazma GH'ye sahipken (Ricordel ve ark, 1995), çipura balıklarının 18 °C'den 9 °C'lik ortama koyulması sonucunda plazma GH'nin hızlı bir şekilde azaldığı görülmüştür (Rotllant ve ark, 2000). Aynı zamanda artan sıcaklık, balıkların olgunlaşma sürecinde artan GH üretimi ile ilişkilendirilmiştir. İlkbahar ve yaz aylarında cinsel olgunlaşma süresince somon balığı (Duan ve ark, 1995), çipura balığı (Pe´rez-Sa´nchez ve ark, 1994), gökkuşağı alabalığı (Gabillard ve ark, 2005) ve sazan balıklarında (Figuerola ve ark, 2005) serum GH düzeylerinin arttığı görülmüştür. Mevsim döngüsünde fotoperiyot sürelerinin değiştiği ve ilkbahar/yaz aylarında en uzun olacağı göz önüne alındığında; fotoperiyodun, GH üretimini modüle ettiği belirtilmiştir. Kısa fotoperiyot ve düşük sıcaklığa uyum sağlayan akvaryum balıklarında plazma GH düzeylerinin yükseldiği ancak uzun fotoperiyot ve daha yüksek sıcaklığa alıştırmış balıklarda bu yükselme gözlenmemiştir (Canosa ve ark, 2005). Beslenme ve açlık sırasında GH salınımı için nöroendokrin faktörleri arasındaki etkileşimler karmaşıktır ve hipotalamik düzenleyicilerin bazıları beslenme davranışını ve doygunluğunu da etkiler. Birçok balık türünde, uzun süreli gıda yoksunluğu serum GH'yi artırır. GH-transgenik sazanlarda GH

seviyelerinin yükselmesi, hipotalamik açlık hormon faktörünü gıda alımını ve beslenme davranışını etkileyerek büyüme ve gelişimi düzenler (Cao ve ark, 2014). Tuzluluk, hapsetme, popülasyon artışı, ksenoöstrojenler ve ağır metaller gibi diğer çevresel faktörler de GH sentezini etkilemektedir (Deane ve Woo, 2009).

Büyüme hormonunun, organizmada birçok metabolik olayın gerçekleşmesinde etkili olduğu bilinmektedir. GH'nin karbonhidrat metabolizması üzerinde insülin benzeri etki ve anti-insülin etki olmak üzere iki farklı aktivitesi görülmektedir. GH, insülin benzeri etkisinde, lipojenez, glikoz ve aminoasit metabolizmasını düzenlenmektedir. Glikoz, hücrenin içine alınarak glikojen şeklinde depolanmaktadır. GH'nin anti-insülin etkisi ile lipoliz, hiperglisemi ve hiperinsülinemi gibi metabolik olaylar düzenlenmektedir. Ayrıca karaciğerde ketojenezi gerçekleştirerek hepatik glikoz 6-fosfataz enzim aktivitesini arttırmakta ve glikoz salınmasına neden olmaktadır. Metabolizmada kan glikoz seviyelerini heksokinaz enzim aktivitesini düzenleyerek artıran GH, kas dokularına glikozun alınımını engeller ve dokuların insülin etkilerine karşı hassasiyetini azaltır (Vijayakumar ve ark, 2010).



Şekil 3. Büyüme hormonunun (GH) endokrin ve otokrin/parakrin etkisinin gösterimi. Hipotalamustan salgılanan büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH) ve somatostatin (SRIF) ile iki hipotalamik yolla GH salınımı düzenlenir. SRIF, GH salınımı gerçekleştirirken,

yükselen GH seviyeleri kendi salınımını engeller. SRIF, GH salınımını inhibe ederek, GH ve IGF'lerin geri bildirimleri tarafından düzenlenir. Artan GH seviyeleri direkt etkide kan şekerinin yükselmesini ve yağ dokuda lipoliz artışını düzenler. İndirekt etkide GH tarafından dokularda artan IGF'ler protein sentezi, hücre gelişimi ve proliferasyonunu, iskelet sisteminin gelişimini sağlar (Fuentes ve ark, 2013).

Depolanan lipidlerin parçalanması omurgalı metabolizmasında kritik öneme sahiptir. Memelilerde, birincil depolama adipoz dokusundadır. Sırasıyla glikolitik/glukoneojenik yollar veya oksidasyon yoluyla diğer hücrelerde alım ve enerji üretimi için yağ asitleri ve gliserolü serbest bırakan lipid depolarına erişmek için enzimatik hidroliz gereklidir. GH, omurgalıların yağ dokusundaki lipolizi uyararak, lipojenez ve anti-lipolizi inhibe ederek trigliseritlerin yıkımını gerçekleştirir. Bu etkisi ile hem serbest yağ asidi seviyelerini yükseltmekte hem de gliserolün karaciğer hücrelerinden salınımını arttırmaktadır (Vijayakumar ve ark, 2010). GH, fosfolipaz C-Proteinkinaz C yolu (Plc-pkc) ve mitojenle aktive edilen protein kinaz sinyal yolunu (MAPK) aktive ederek lipolizi teşvik etmektedir. Besin eksikliğinde büyüme faaliyetleri lipidlerin kullanılması yoluyla karşılanır ve olumsuz beslenme koşullarında karaciğer dokularında GH'ye olan duyarlılık reseptör transkript düzeylerinin düşmesi ile azalmaktadır. Bununla birlikte, yağ dokusunda GH'ye olan duyarlılık, lipid depolarının kullanılması yoluyla artmaktadır (Bergan ve Sheridan, 2018). In vivo olarak GH ile uyarılmış gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) lipoliz aktivitesi artmıştır (Kling ve ark, 2012). Benzer şekilde eksojen GH uygulaması sonrası lipoliz aktivitesi ile dolaşımda yağ asitleri ve gliserol düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Vijayakumar ve ark, 2010).

Büyüme hormonu protein sentezini artırarak yağsız kas kütlesinde artışa neden olmaktadır. GH, protein metabolizmasının regülasyonu ile ilgili olarak hem protein sentezinin uyarılmasını hem de protein yıkımının önlenmesine neden olmaktadır. GH için transgenik hale getirilmiş gökkuşağı alabalıklarında yapılan bir çalışmada, kas hipertrofisi veya hiperplazisi yoluyla önemli derecede somatik büyümeler gözlemlendiği rapor edilmiştir. Aynı zamanda sadece GH değil GHRH, IGF ve insülin de dahil olmak üzere birçok büyüme faktörü kas hipertrofisini ve hiperplazisini kontrol ederek balıklarda kas büyümesini düzenlemektedir (Vijayakumar ve ark, 2010; Sheridan ve Hagemester, 2009). Yapılan bir çalışmada 7 aylık GH-transgenik zebra balığında oluşan kas kütlesi hipertrofiye bağlı iken, 2 aylık GH-transjenik Coho somon balığında oluşan kas kütlesinin hiperplaziye bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Bu yüzden araştırmacılar hipertrofi ve hiperplazi yoluyla balık kas büyümesinin hem türe hem de yaşa bağlı olduğu fikrini desteklemektedir (Hill ve ark, 2000).

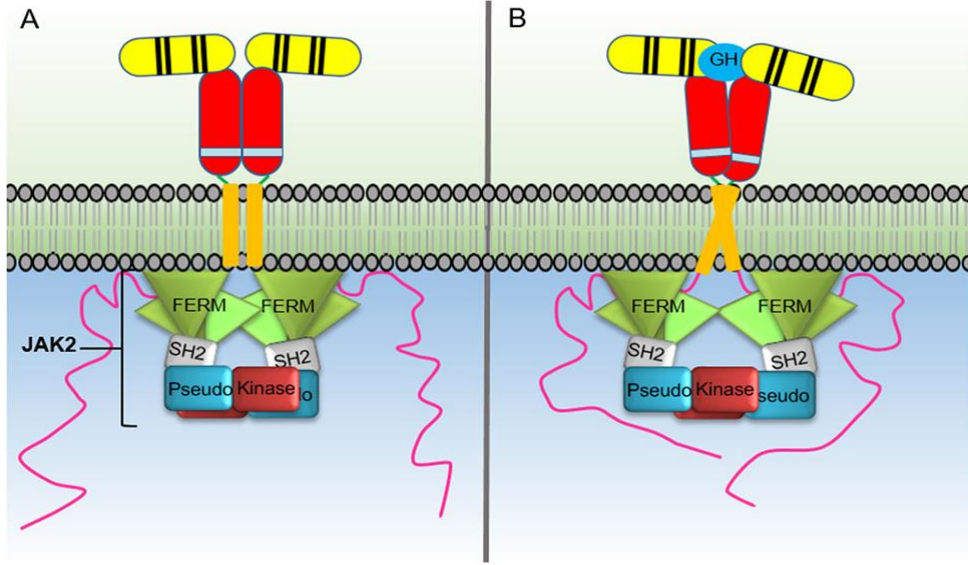
Bununla birlikte gökkuşağı alabalıklarında; GH, IGF-1 ve insülin, kas hücreleri tarafından glikoz ve aminoasit alımı uyararak kas büyümesini doğrudan teşvik etmektedir (Castillo ve ark, 2004). Kas dokularında aminoasit alımına bağlı olarak protein sentezinde artışa, protein oksidasyonunda ise azalışa neden olduğu ve bunu da GHR ve IGF-1 aracılığıyla gerçekleştirdiği rapor edilmiştir (Kuradomi ve ark, 2011).

2.3.1. Büyüme Hormon Reseptörü (GHR)

Sitokin reseptörü süper ailesine ait olan GHR, 638 aminoasit içeren ve 22 kDa molekül ağırlığında bir polipeptiddir. GHR'nin yapısı, birçok farklı tür arasında % 70'den fazla aminoasit dizi benzerliği göstermektedir. Omurgalı grupları arasındaki bu benzerlikten dolayı, reseptörün ligand bağlayan ekstrasellüler kısmı iyi korunmuştur. Bu durum balık GHR'lerinin memeli GH'yi tanıyabildiğini açıklamaktadır. Balıklarda GHR'nin, insanlardaki gibi somatotropik ekseninde benzer bir rol oynadığı, plazma GH seviyelerinin hücreye yanıt ve özellikle de IGF üretimine aracılık ettiği belirtilmiştir (Dehkhoda ve ark, 2018).

Bir reseptör olarak GHR, hücre membranında GH uyarıcı sinyali ile IGF-1 de dahil olmak üzere birçok genin transkripsiyonunu indükleyerek hedef hücreler üzerindeki GH'nin biyolojik etkilerine aracılık etmektedir. Bu yüzden GHR'nin; büyüme, hücre farklılaşması ve hücre proliferasyonunda düzenleyici etkisi olduğu ileri sürülmektedir (Valdes ve ark, 2012a). GHR'ler, post-reseptör sinyali vermede rol oynayan aynı bölümlere sahiptir. Her bir GH molekülü iki GH reseptörü ile eş zamanlı olarak etkileşim sağlayan iki reseptör bağlanma bölgesine sahiptir (Dehkhoda ve ark, 2018).

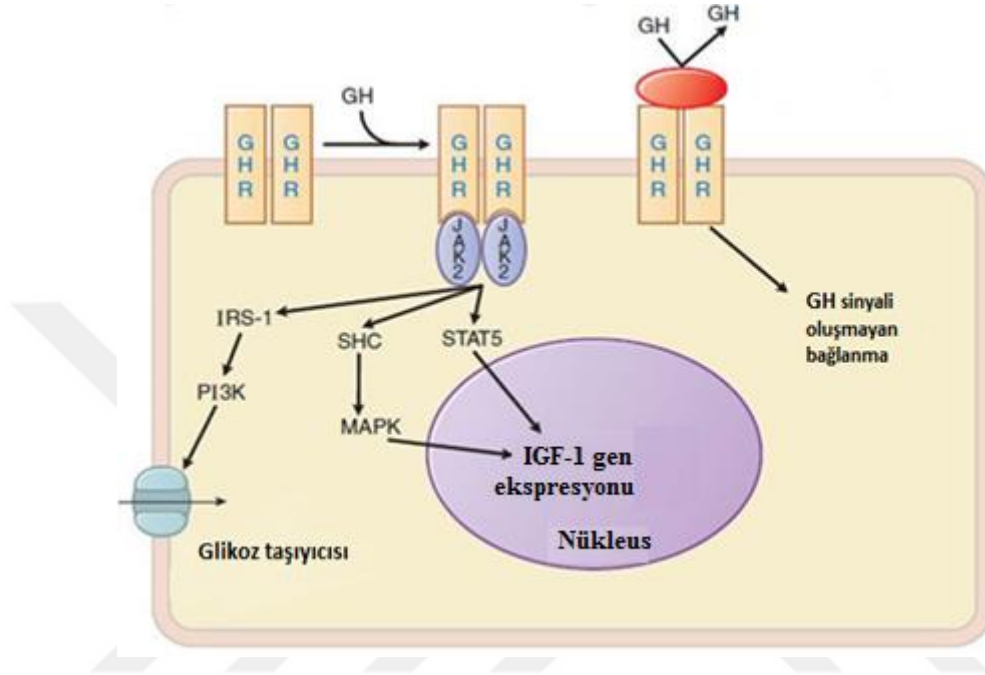
Büyüme hormon sekresyonunda bağlayıcı özellik gösteren GHR, sitoplazmik bölüm, hidrofobik transmembran bölüm ve GH bağlayıcı hücre dışı bölüm olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır. Hücre içi bölüm olan sitoplazmik bölüm, reseptörün sinyal iletiminde görevlidir. Prolin açısından zengin olan hücre içi bölüm, Janus kinaz 2'nin (JAK-2) bağlanma bölgesidir ve GHR'nin sinyal verme işlevleri için vazgeçilmezdir. GHR reseptörünün hücre dışı alanı ise, bağlayıcı proteinler ile reseptör dimerizasyonu için gerekli olan tek bir sistein kalıntısı içermektedir. Hücreler hem GH hem de GHR ürettiğinde, reseptörlere bağlanan GH molekülleri salgı veziküllerinde depolanır ve bir GHRH sinyali üzerinden tekrar salgılanmak üzere uyarı oluşturur. Otokrin GH üreten hücrelerde GHR'ye bağlanmayan GH'ler salgısal veziküllerde depolanmaktadır (Dehkhoda ve ark, 2018).



Şekil 4. Büyüme hormonu (GH) ile büyüme hormon reseptörünün (GHR) aktivasyonunun gösterimi. İnaktif homodimerik GHR'de (A bölümü) Janus kinaz (JAK-2) alanı (KD), homodimer içindeki JAK-2'den farklı reseptöre bağlı psödokinaz alanı ile bağlanarak inhibe edilir. GH'nin hücre dışı domenindeki (B bölümü) GHR'ye bağlanması; JAK-2 aktivasyonuna ve FERM ve mitojenle aktive olan protein kinazı aktive eden protein (SH) gibi birçok sitosolik proteinin fosforilasyonuna neden olur. JAK-2'lerin hareketi, psödokinazın JAK-2 kinaz alanını (KD) inhibe edici etkisini bitirir ve iki JAK-2, KD'yi yakın bir yere getirerek JAK-2 aktivasyonu gerçekleştirir (Dehkhoda ve ark, 2018).

Büyüme hormonu, sinyali oluşturabilmek için ilk olarak GHR'nin hücre dışı bölgesinde bulunan bağlayıcı proteinlere bağlanır ve 1:2 heterodimer kompleksi oluşturarak JAK-2 sinyal yolağını aktifleştirir. GHR'nin tirozin kinaz aktivitesi yoktur ancak oluşan dimerizasyon ile iki GHR'nin hücre içi kuyruklarında yer alan ve birer hücre içi tirozin kinaz olan JAK-2'ler birbirlerine yaklaşır. JAK-2'ler, sinyal iletici ve transkripsiyon başlatıcı (STAT) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) dahil olmak üzere, aşağı yönlü sinyal yolaklarını aktive eden sitoplazmik proteinleri fosforile etmektedir. Böylece kuyruk üzerindeki tirozinler fosforillenir ve fosforilasyon yolağı başlatılmış olur. GH sinyal iletimi, JAK-2 fosforilasyonu sonrası dört farklı transdüksiyon yolağı üzerinden devam etmektedir. Dört farklı sinyal iletim yolağı GH'nin pleiotropik etkilerini açıklamakta büyük önem taşır. Bu yollar; sinyal iletici ve transkripsiyon başlatıcı (STAT), mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), hücre dışı sinyal tarafından düzenlenen kinaz (ERK) ve fosfotidil inozitol 3-OHkinaz (P13 kinaz) yolaklarıdır. Yolaklar aracılığı ile oluşan GH-GHR kompleksi, GHR'nin aktifleşmesi sonrası nükleusa geçerek gen ekspresyonu gerçekleştirir ve sonrasında

GH uyarısı kaybolur. Endoplazmik retikulumdaki (ER) sentez ve dimerizasyon sonrasında, serbest kalan GHR golgi organelinde glikozile edilir ve tekrar kullanılmak üzere hücre yüzeyine taşınır. GHR, aynı zamanda, plazma zarındaki artan glikoz taşıyıcıların ekspresyonuna aracılık edebilen IRS-1'i aktive etmektedir (Valdes ve ark, 2012a; Fuentes ve ark, 2013).



Şekil 5. Büyüme hormon reseptörünün (GHR) Janus kinaz (JAK-2) aktivasyonu sonrası transkripsiyon sinyal yolunun gösterimi. GHR'nin JAK-2 aktivasyonundan sonra gen transkripsiyonunun GH tarafından düzenlenmesi 2 temel sinyal yolunu içerir: Bu yollardan ilki MAPK kaskadı, diğer yol ise STAT proteinleridir. JAK-2 tarafından fosforillenen bu proteinler nükleusta IGF-1 gibi çeşitli genlerin transkripsiyonuna neden olurlar. Ayrıca GHR plazma zarı üzerinde artan glikoz taşıyıcı ekspresyonuna aracılık eden IRS-1'i aktive eder. (JAK2: Janus kinaz; IRS-1: İnsülin reseptör substratı; PI3K: Fosfotidilinositol 3-kinaz; STAT: Sinyal iletilci ve transkripsiyon başlatıcı; MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinaz; SHC: Mitojenle aktive olan protein kinazı aktive eden protein) (Mark ve Bernard, 2018).

Büyüme hormon reseptörleri, karaciğer ve kas gibi birçok hücrede bulunmaktadır. Bu hücreler dışında balıklarının solungaç, yağ doku, böbrek ve bağırsak hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda büyüme hormonu reseptörleri bulunur. Pe'rez-Sa'nchez ve ark (1991), gökkuşağı alabalıklarında karaciğer GHR mRNA ekspresyonunun, periferik dokulardan en az 10 kat fazla olduğunu, bu yüzden karaciğerin GH aktivitesinin ana hedefi olduğunu ileri sürmüşlerdir. Kas hücrelerinde GHR'nin aktivitesi, balık türleri arasında karaciğerin aksine

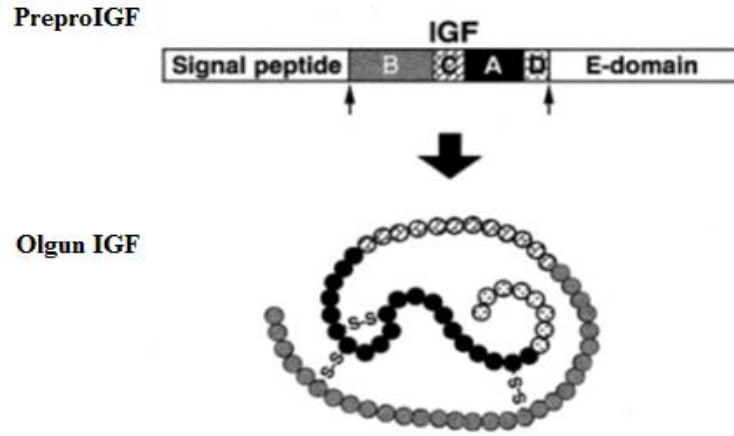
oldukça değişkenlik gösterir. Birçok çalışmada kas GHR mRNA düzeylerinin belirgin şekilde eksprese olduğu ve organ büyüklüğüne bağlı olarak balıklarda kas gelişimi ve metabolizmasının düzenlenmesinde GHR'nin etkili olduğu rapor edilmiştir (Gabillard ve ark, 2006; Hevry, 2013; 2015). GHR mRNA ekspresyonu japon balığı, kalkan balığı ipura, pisi balığı, yılan balığı ve gökkuşağı alabalığı gibi birçok balık türünün dokularında tespit edilmiştir (Fuentes ve ark, 2013).

2.4. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1) ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-2 (IGF-2)

İnsülin benzeri büyüme faktörleri, somatik büyümeyi uyarıcı anabolik etkilerinden dolayı '*somatomedin*' adını almıştır ve ilerleyen süreçlerde molekül yapılarının insülin ile benzerliğinin keşfi ile "insuline benzer büyüme faktörleri (IGF)" olarak adlandırılmıştır. IGF'ler, IGF-1 (Somatomedin C) ve IGF-2 (Somatomedin A) olmak üzere iki formda bulunur ve GH'nin anabolik ve mitojenik etkilerinin birçoğunda görev alır. IGF'ler hücrelerde protein, lipid, karbonhidrat ve mineral metabolizmasını düzenleyen polipeptid hormonlardır (Moriyama ve ark, 2000).

Yapısal ve fonksiyonel olarak IGF primer aminoasit dizilimleri birbirlerine çok benzerdir ve büyüme faktörleri ailesi içerisinde yer alır. Balık türleri arasında IGF-1 baz dizilim benzerliği % 67 ile % 97 arasındadır ve insan IGF-1 baz dilimi ile % 60 - % 83 benzerlik göstermektedir. Aynı şekilde IGF-2 baz dizilimi balık türleri arasında % 66 - % 95 benzerken, insan IGF-2 baz dizilimi ile % 64 - % 78 benzerdir. Birbirlerine ve insan proinsline benzeyen bu peptidler, spesifik hücrelerde büyümeyi stimüle ederler ve karaciğerden sentezlenerek kana salınırlar (Rosenfeld, 2003).

Balıklarda IGF genlerinin baz dilimleri; PreproIGF, bir sinyal peptidi ve B-, C-, A-, D- ve E- bölgelerinden oluşurken, preproinslin sadece bir sinyal peptidi, B-, C- ve A- bölgelerinden oluşur. Bu alanlardan E- bölgesi ve sinyal peptidi, proteolitik olarak preprohormondan ayrılarak olgun IGF-1 ve IGF-2'leri oluşturur. Üretim sırasında IGF'lerde  disülfür bağı oluşur; ikisi B- ve A- bölgesi arasında oluşurken diğeri A- bölgesinde oluşmaktadır (Moriyama ve ark, 2000; Rosenfeld, 2003).



Şekil 6. PreproIGF ve olgun IGF'nin şematik gösterimi (Moriyama ve ark, 2000).

İnsan ve somon balığında IGF-1 aminoasit diziliminde bulunan 70 aminoasitten sadece 14 amino asitte değişiklik olduğu, 9 aminoasitin D- ve C- alanında; diğer 5 aminoasitin ise B- ve A- alanında farklılık gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca, somon balıklarında IGF-1 için varsayılan primer dizide, 56 aminoasitin insan IGF-1'i benzer olduğu bulunmuştur (Moriyama ve ark, 2000; Rosenfeld, 2003).

Rekombinant DNA teknolojisinin ortaya çıkmasıyla birlikte, balıklarda IGF genlerinin yapısal analizi üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Balıklarda ilk defa IGF-1 cDNA'sı, somon balığının karaciğerinden izole edilmiştir. Shamblott ve ark (1995), gökkuşağı alabalıklarında IGF-2 cDNA'sının dizisini gözlemlemiştir. Uzun yıllardır IGF-1 ve IGF-2 cDNA'larının nükleotid dizisi kemikli balık türlerinde; alabalıkgiller, kedi balığı, çipura, sazan, japon balığı, pisi balığı, balon balıkları, köpek balıkları ve gökkuşağı alabalıklarında tespit edilmiştir (Moriyama ve ark, 2000).

İnsülin benzeri büyüme faktörleri, gelişim ve büyümede, doku onarımı ve düzenlenmesinde, doku çeşitliliğinde, DNA sentezinde, hücre bölünmesi ve farklılaşmasında rol oynayan metabolik ve mitojen faktörlerdir (Bodart, 2017). IGF'lerin biyolojik etkileri; IGF-1 ve IGF-2, IGF bağlayıcı proteinleri (IGFBP) ve IGF reseptörleri (IGF-1R ve IGF-2R) tarafından düzenlenir. Birçok dokuda özellikle de karaciğerde bulunurlar. Çeşitli doku ve hücre gruplarının çoğalması için, dolaşımdaki IGF'ler somatik büyüme ile direkt endokrin etki göstermektedir. Dolaşımdaki konsantrasyonları insülinde yüksektir ve plazmada, IGFBP'lere bağlı olarak, serumda ise çoğu IGFBP-3'e bağlı olarak bulunur. Serumda bulunan IGF'lerin % 80'i karaciğerde üretildiğinden, karaciğerin IGF'in önemli etki alanlarından biri olduğu düşünülmektedir. Ayrıca IGF'lerin hücre çoğalmasında etkili olması önemli otokrin ve

parakrin etkilerinin olduğunu göstermektedir. IGF'lerin karaciğer dışında; kas, solungaç, böbrek, kıkırdak, gonad ve pankreas gibi birçok dokuda lokal olarak sentezlendiği; dokuların büyümesinden ve farklılaşmasından sorumlu olduğu görülmektedir (Reinecke, 2010).

Somatomedin C olarak da bilinen IGF'lerden IGF-1, 70 aminoasitli ve molekül ağırlığı 7.65 kDa olan bir polipeptiddir. IGF-1, glikozun hücre içine alınması, lipid metabolizmasının düzenlenmesi, protein sentezi, DNA sentezi, hücre hipertrofi ve hiperplazisi gibi birçok etkisi saptanırken etkileri yaşam boyu devam etmektedir (Reinecke, 2010). IGF-1, karaciğerde sentezlenen ve periferik dokularda hipofiz GH kontrolü altında sentezlenen anabolik bir hormondur ve karaciğerde üretimi, GH tarafından vücut büyümesinin endokrin kontrolünde anahtar bir faktördür. Dokularda etki gösterebilmek için kan yoluyla taşınmaktadır (Francino ve ark, 2011). IGF-1'in, biyoaktivitesi ve biyoyararlanımında biyolojik etkilere sahip altı IGFBP rol oynamaktadır. Hücre sağkalımı ve proliferasyonda etkileri görülen IGFBP-3, serumda en bol bulunan ve IGF-1 bağlayıcı özelliği olan proteindir. Plazma IGF-1 düzeylerinin vücut büyüme oranını etkilediği ve IGF-1 enjeksiyonunun balık büyümesini ve gelişimini arttırdığı, endojen plazma IGF-1 düzeylerinin genellikle büyüme hızı ile pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir (Beckman, 2001; Castillo ve ark, 2004; Picha ve ark, 2008).

Büyüme ve anabolik süreçlerin endokrin kontrolü, GH/IGF-1 eksenini üzerinden gerçekleşir. Endokrin GH/IGF-1 eksenini farklı süreçlerin birleşiminden ortaya çıkmaktadır. Uyarıcı hormon olan GHRH aracılığıyla ön hipofizden salgılanan GH, dolaşımda GHBP ile hedef dokulara ulaşarak bu dokularda GHR'lere bağlanır ve özellikle karaciğerde IGF-1'in üretimini ve serbestlenmesini sağlamaktadır. Postnatal dönemde karaciğerde sentezlenen IGF-1 hemen dolaşıma katılır. Dolaşıma katılan IGF-1 ya serbest hale geçer ya da IGFBP'lere bağlanarak birçok organdaki hedef dokulara ulaşır. Hedef dokulara ulaşan ve protein yapısında olan IGF-1, hücre membranını geçemez ve etkisini membrandaki IGF-1R'e bağlanarak gerçekleştirir. Ayrıca IGF-1 negatif geri bildirim ile hipofizde GHRH'nin etkisini bloke ederek, GH'nin salınımını inhibe etmektedir (Benedito-Palos ve ark, 2007).

Sadece karaciğerde değil aynı zamanda IGF-1 otokrin/parakrin etki ile kas hücrelerinin çoğalmasını, diferansiyasyonunu ve hipertrofiyi doğrudan uyarır ve kas atrofisini önler. IGF-1, kas hücrelerine glikoz-aminoasit alımını sağlayarak protein sentezini arttırmakta ve kas kütlesini geliştirici etki göstermektedir. Ayrıca IGF-1, artan DNA ve protein sentezi, amino asit alımı, hücre proliferasyonu ve mitogenezin aktivasyonu ile birlikte protein yıkım oranının azaltılması da dahil olmak üzere, kas dokusunda birçok anabolik süreç için güçlü bir uyarıcı olarak çalışmaktadır (Gutiérrez ve ark, 2006). Sentezlenen IGF-1'ler hücre

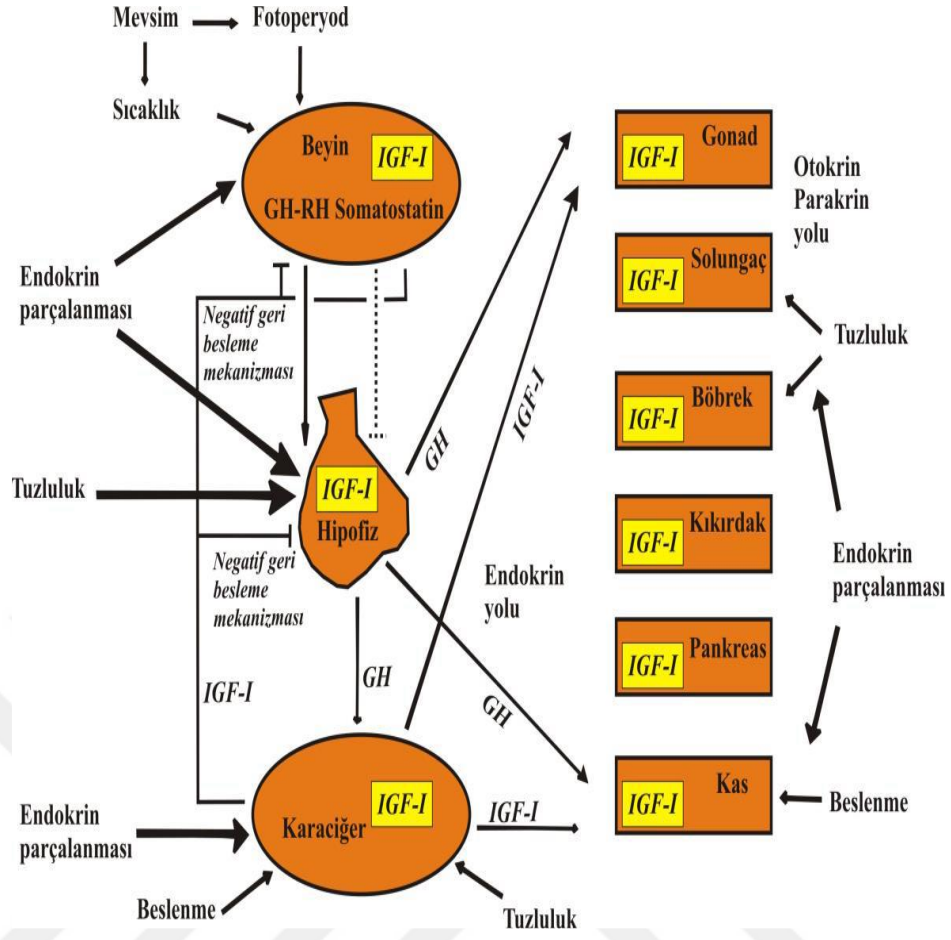
düzeyde metabolizmayı etkilemektedir ve anabolik etki ile hücreyi mitoz hazırlayarak G1 fazında yönlendirilmiş hücreleri harekete geçirmektedir. Böylece hücre proliferasyonunun yanı sıra hücre farklılaşmasında da IGF-1'in etkileri görülmektedir (Castillo ve ark, 2004; Reinecke, 2010).

İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 hormonu balıkların bütün yaşam evrelerinde bulunur. Üretim süreçleri boyunca büyüme oranları ve plazma IGF-1 düzeyleri arasında mevsimsel değişikliğe bağlı olarak gecikmeler yaşanmasına rağmen, yavru alabalıklarda dolaşımdaki IGF-1'in büyüme performansının en güvenilir belirteçlerinden biri olduğu rapor edilmektedir (Vera ve ark, 2006; Picha ve ark, 2008). IGF-1'in aynı yaştaki balıklar arasında vücut büyüklüğü ile değişebileceği ve yaşlanmaya bağlı GH sekresyonunda ve IGF-1 üretiminde kademeli bir düşüş ve değişim olabileceği belirtilmektedir. “*Somatopause*” olarak adlandırılan bu hipotez, erginlerde anabolik hormon eksikliğine neden olmaktadır. “*Somatopause*”, GH eksikliği olan ergin balıklarda gözlenenlere benzer şekilde metabolizmada kemik ve kas kütesinin azalması ile birlikte artmış bir yağ kütlesi ile ilişkilidir. Aynı zamanda GH/IGF-1 ekseninin bozulmuş aktivitesinin, çok sayıda metabolik, biyokimyasal ve fonksiyonel değişikliğin temeli olduğu düşünülmektedir (De Marinis ve ark, 2002).

Büyüme ve gelişimde rol oynayan önemli hormonlardan biri de IGF-2'dir. IGF-2, 67 aminoasit kalıntısından oluşan ve molekül ağırlığı 7,5 kDa olan bir polipeptittir. GH'nin major mediatörü gibi görev yapan IGF-2, hepatik glikoz üretimini azaltma, periferik dokulara glikoz alımını ve oksidasyonunu artırma, lipid ve protein sentezini artırma gibi dokularda farklı metabolik olaylarda rol oynamaktadır (Codina ve ark, 2008). Sentez yeri karaciğerdir ve otokrin/parakrin etkiyle kas, böbrek, solungaç, gonad, kıkırdak ve pankreas dokularında da salgılanmaktadır. IGF-2'nin, dolaşımda IGFBP-2 ve IGFBP-3'e bağlı olarak taşınımını gerçekleştirmektedir. Ayrıca IGFBP-3 ile IGFBP-4, IGF-2'nin plazma düzeylerini kontrol ederek IGFR bağlanması önemli rol oynamaktadır. Kas hücrelerinde proliferasyon ve metabolizmada IGF-2'nin IGF-1'e benzer etkiler gösterdiği hatta IGF-2'nin etkisinin IGF-1'den daha güçlü olduğu gözlenmiştir. Gökkuşuğu alabalıklarının miyojenik hücrelerinde MAPK/ERK ve PI3K/AKT sinyal yollarını aktive ettiği ve kas büyümesinin uyarılmasında IGF-2'nin IGF-1'den daha güçlü etki gösterdiği yapılan bazı çalışmalarda rapor edilmiştir (Francino ve ark, 2011). Bu yüzden, IGF-2 birçok dokuda hücrelerin büyümesini ve bölünmesini düzenlemektedir (Eppler ve ark, 2010; Francino ve ark, 2011).

Büyüme hormonunun balıklarda ve diğer omurgalılarda IGF ekspresyonunu stimüle ettiği mekanizma, JAK/STAT yolağının aktivasyonu ile gerçekleşir. STAT-3, STAT-5, hepatosit nükleer faktörü-1 α (HNF-1 α) ve -3 β (HNF-3 β), IGF gen ekspresyonunda rol oynayan transkripsiyon faktörleridir (Valdes ve ark, 2012a). IGF-1 gen lokusunun olgun IGF proteinleri üretmek için translasyon sonrası modifiye edilmiş sinyal peptitleri ve uzatma peptitleride dahil olmak üzere birçok öncülü kodlamaktadır. Karaciğerde dört propeptit formunun varlığı, karaciğerde diğer dokulara kıyasla yüksek IGF-1 mRNA ekspresyonu bulgularını açıkladığı gösterilmiştir (Zou ve ark, 2009). GH'nin balıkların karaciğer ve kas dokularında IGF-I mRNA ekspresyonunu uyardığı bildirilmiştir (Duan, 1997). *In vivo* ve *in vitro* hepatik IGF-2 ekspresyonunun GH tarafından stimüle edildiği belirtilmiştir (Tse ve ark, 2003; Vong ve ark, 2003). Gökkuşaağı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) kas dokularında IGF-2 gen ekspresyonunun IGF-1'e göre, karaciğer dokularında ise IGF-1 gen ekspresyonunun IGF-2'e göre daha yüksek oranda ifade edildiği gösterilmiştir (Aksakal, 2013). Özellikle IGF-2'nin embriyonik bir büyüme faktörü olarak etki ettiği, IGF-1'in doğum sonrası olgunlaşma sürecinde daha önemli bir rol oynadığı, buna karşın son yıllarda memelilerde ve balıklarda yapılan birçok çalışmada IGF-1 ve IGF-2 ekspresyonunun doğum öncesi ve sonrasında büyüme ve gelişme için hayati önem taşıdığı rapor edilmiştir (Leung ve ark, 2008; Pierce ve ark, 2011).

Balıklarda çevresel faktörler dokularda büyüme hormonlarının ekspresyonunu etkilemektedir. Bu faktörler arasında fotoperiyot, beslenme düzeyi, stres durumu, sıcaklık, sudaki tuzluluk miktarı ve toksisite göze çarpmaktadır (Şekil 7).



Şekil 7. Balıklarda farklı çevresel faktörlerin GH/IGF-1 eksenini etkileme mekanizmasının şematik gösterimi. Anterior hipofizden salınan GH, GHR aracılığı ile karaciğerde IGF-1 sentezini ve dolaşımdaki salınımını uyarır. IGF-1, dolaşım yoluyla dokulara ulaşarak hücre membranında IGF-1R ile etkileşime girer ve etkilerini uygular. Dolaşımdaki IGF-1, hipofiz GH salınımının negatif geri bildirim düzenleyicisidir ve özellikle GH gen transkripsiyonunu ve salınımını inhibe eder. Böylece, IGF-1'in fizyolojik rolü endokrin olarak anlaşılır. Bu yolak memelilere benzer şekilde, balıklarda da “GH/IGF-1 eksen” olarak adlandırılır. Bu eksen sonucunda beyin, solungaç, kalp, gastrointestinal sistem, pankreas, böbrek, dalak, gonadlar, kas, kıkırdak, kemik ve deri gibi bazı organlarda IGF-1 üretimi gösterilmiştir. GH ekstrahepatik dokularda otokrin-parakrin etki ile IGF-1'in salınımını ve ekspresyonunu gerçekleştirir (Aksakal, 2013).

Birçok balık türünün cinsel olgunlaşması sırasında, plazma GH ve IGF-1 seviyelerinin yükseldiği ve mevsimsel büyüme gösteren ılıman balıklarda, plazma IGF düzeylerinin bahar sonu ve yaz aylarında artış gösterdiği belirtilmiştir (Reinecke ve ark, 2005). Yaz döneminde olgunlaşma süresince ergin somon balıklarının yavru balıklara göre daha yüksek plazma

IGF-1 ve hepatik IGF-1 mRNA düzeylerine sahip olduğu saptanmıştır (Maugars, 2007). Benzer şekilde yaşa bağlı olarak ergin alabalıkların yavru alabalıklara göre daha yüksek hepatik IGF-1 mRNA seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir (Shamblott ve ark, 1995). Taylor ve ark (2005), yavru ve olgun gökkuşuğu alabalıklarında, altı ay boyunca kademeli olarak ortam sıcaklığını artırmaları sonucunda plazma IGF-1 seviyelerinin sıcaklıkla birlikte artış gösterdiği görülmüştür. Diğer taraftan yüksek sıcaklıklarda hipofizden GH'nin salınımının arttığı ve buna paralel plazma IGF-1 seviyelerinin ve karaciğer IGF-1 mRNA ekspresyon düzeylerinin de artış gösterdiği gözlenmiştir (Beckman ve Dickhoff, 1998). Sıcaklık değişimlerinin karaciğer ve kas dokularında IGF-2 mRNA ekspresyonunu etkilediği rapor edilmiştir (Li ve Letherland, 2008).

Sadece çevresel fizikokimyasal faktörler değil aynı zamanda hormonlar ve hormon benzeri yapılar çeşitli hücresel işlevlerde rol oynayarak balıkların büyüme ve gelişimi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Örneğin somatostatin, ghrelin, peptidler, kortizol, östrojen ve tiroit hormonları ve steroidler gibi farklı hormonlar dokularda IGF-1 ve IGF-2 ekspresyonunu düzenlemektedir. Somatostatin'in ERK ve PI3K sinyal yollarını aktive ederek hepatik büyüme hormonu reseptörü ve IGF-1 mRNA ekspresyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir (Mark ve Sheridan, 2010). Hipotalamik somatostatin konsantrasyonunun, mevsimsel olarak plazma GH ile ters orantılı olarak değiştiği gözlenmiştir (Mark ve Sheridan, 2010). Diğer bir hormon olan ghrelinin de GHR aracılığıyla öncelikle GH salınımını uyardığı ve karaciğerde IGF-1 ve GHR'nin ekspresyonunun düzenlenmesinde rolü olduğu rapor edilmiştir (Hevrøy ve ark, 2012). Balık hepatositlerinde T3 veya T4 hormon tedavisi ile IGF ekspresyonunda değişiklikler elde edilmiştir. Metabolik olarak insülin ve kortizol hormonları da, organizmanın anabolik/katabolik durumunu etkilemektedir. İnsülin ve kortizol hormonlarının, IGF-1 ve IGF-2 gen ekspresyonunu farklı şekilde düzenlediği, GH ile birlikte uygulandığında GH'nin etkisini azalttığı görülmüştür. Bu yüzden glukokortikoidlerin balıklarda karaciğer dokularında endokrin IGF-1 ve IGF-2 ekspresyonlarını farklı şekilde düzenleyerek organ ve doku büyümesini etkilediği belirtilmiştir (Pierce ve ark, 2011).

Son yıllarda IGF sisteminin balık büyümesine olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla; balıkların büyüme ve gelişimi boyunca IGF-1 ve IGF-2 hormonlarının fizyolojik etkileri (Duan ve ark, 1997; Wood ve ark, 2005; Reinecke, 2010), IGF-1R'lerin üreme üzerine olan etkileri (Gutiérrez ve ark, 2006) ve IGFBP'lerin fizyolojik özellikleri üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır (Wargelius ve ark, 2005).

2.4.1. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Proteinler (IGFBP'ler)

İnsülin benzeri büyüme faktörlerinin büyük çoğunluğu, spesifik yüksek afiniteli IGFBP'ler ile ya da serbest IGF'ler şeklinde hedef dokulara salınırlar. Dolaşımdaki IGF'lerin yaklaşık % 98'i bağlayıcı proteinlere bağlıdır. Bu bağlayıcı proteinler karaciğerde sentezlenmesinin yanı sıra lokal olarak parakrin ve otokrin etki gösterdikleri diğer pek çok dokuda sentezlenir. IGFBP'ler, hücre yüzeylerine ve kılcal damarlara tutunabilen amino asit motifleri veya glikozaminoglikan parçaları içermektedir ve bu şekilde IGF'leri kılcal damar duvarlarından geçirerek hedef dokulara ulaştırmaktadırlar. Aynı zamanda IGFBP'ler, IGF'lerin proteolitik bozunmasını önleyerek yarı ömürlerini uzatırlar ve yüzey membran reseptörleri ile ilişkisini sağlayarak dolaylı olarak IGF'lerin biyolojik aktivitelerini kontrol ederler (Gatti ve ark, 2012).

Serum proteazlarının etkisiyle IGF'ler, IGFBP'lerden ayrıldıktan sonra aktivite göstermektedir. IGF reseptörlerine kıyasla IGFBP'lerin, daha yüksek afinite ile IGF'lere bağlandığı ve spesifik hedef hücrelere IGF'lerin ulaştırılmasının IGFBP'ler tarafından daha iyi koordine edildiği ileri sürülmüştür. Ancak dolaşımda IGFBP düzeyleri fazla olduğunda, IGF'lerin etkisini baskılayıcı etki göstermektedir. Bu yüzden IGFBP'lerin sadece IGF'leri taşımakla kalmayıp aynı zamanda IGF'lerin etkilerini hücresel düzeyde arttırıp azaltabilme özelliğine sahip olduğu gösterilmiştir (Gatti ve ark, 2012).

İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinlerin, amino asit sekansları birbirine benzerlik gösterir ancak her biri yapısal ve biyokimyasal özellikleri bakımından farklıdır. Bugüne kadar altı farklı IGFBP (IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 ve IGFBP-6) karakterize edilmiştir. IGFBP-3, plazmada en fazla bulunan formdur ve IGF-1'in dokulara transferinden sorumludur. IGF'ler gibi sentezi GH kontrolündedir. Molekül ağırlığı 40 - 46 kDa'dır ve karaciğerde portal venöz ve kupffer hücrelerinden sentez edilmektedir. Ayrıca plazmada asit labil subunit (ALS) proteinine bağlanarak ikili-üçlü kompleks oluşturur. Oluşan ikili-üçlü kompleks IGFBP-3'ün yarı ömrünü 16 kata kadar uzatabilme kapasitesine sahiptir. Böylece IGF'lerin dolaşımda kalış süreleri ve etki süreleri artmaktadır. Sadece pasif bir taşıyıcı molekül olmayan IGFBP-3, IGF-1'in biyolojik aktivitesini arttırırken buna karşın IGF-1'den bağımsız olarak büyümeyi inhibe edici etki de göstermektedir. Bir diğer bağlayıcı protein olan IGFBP-2, dolaşımda IGFBP-3'ten sonra en çok bulunan proteindir. Molekül ağırlığı 31 kDa olan IGFBP-2, yavru ve ergin balıkların birçok dokusunda bulunur. Yarı ömrü daha az olan IGFBP-2'nin IGF'lere afinitesi düşüktür. Ancak IGFBP-2'nin serbest IGF'ler üzerinde önemli düzenleyici etkisi bulunmaktadır. Molekül ağırlığı 24 kDa olan IGFBP-4,

serumda bulunmakta ve birçok hücre tarafından sentezlenmektedir. IGFBP-3 ve IGFBP-4, IGF'lerin reseptörlerine bağlanması için yeterli olan IGF-1 ve IGF-2 miktarlarını düzenlemektedir (Picha ve ark, 2009; Schultz, 2015).

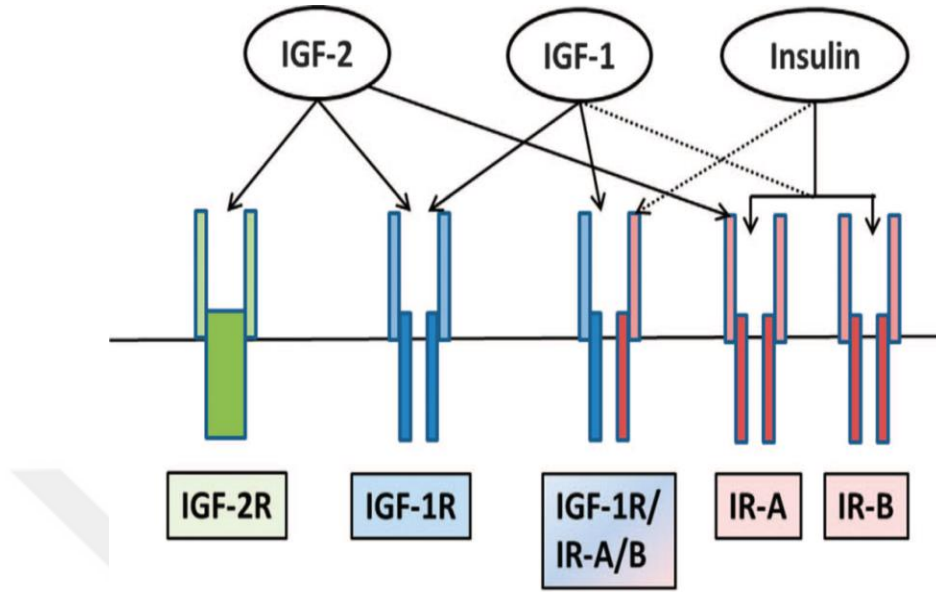
İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinlerin, GH eksikliğinde azaldığı, fazlalığında ise artış gösterdiği belirtilmiştir. Aynı zamanda IGFBP'lerin, metabolik durum, beslenme ve çevresel koşullar (sıcaklık, oksijen ve fotoperiyot mevcudiyeti) gibi faktörlerden etkilendiği ve serum IGFBP düzeylerinde azalma veya artışa neden olduğu rapor edilmiştir. , Gökkuşluğu alabalığı, somon, tatlı su çuprası, kanal yayın balığı ve levrek gibi kemikli balıklarda yapılan çalışmalarda IGF'ler için bağlanma afinitesi ve özgünlüğü olan bir veya daha fazla IGFBP serumda gözlenmiştir (Wood ve ark, 2005; Schultz, 2015).

2.4.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktör Reseptörü-1 (IGF-1R) ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktör Reseptörü-2 (IGF-2R)

İnsülin benzeri büyüme faktörleri etkilerini, hedef hücre membranında bulunan reseptörleri aracılığı ile göstermektedir. Balıklarda IGF'leri spesifik olarak tanıyan dört reseptör vardır; insülin reseptörü (IR), IGF-1 reseptörü (IGF-1R), IGF-2 reseptörü (IGF-2R) ve hibrit (IR/IGF-IR) reseptörüdür. IGF-1R, insülin reseptörlerinden IR-A ve IR-B ile % 60 benzerliğe sahiptir ve her iki reseptör tipi hücre içi birçok molekül ve sinyal yolağını ortaklaşa kullanmaktadır. IGF reseptörleri, IGF-1'e yüksek afinite gösterirken, IGF-2'ye düşük afinite göstermektedir (Chauvigné ve ark, 2003d; Weil ve ark, 2003a).

İnsülin benzeri büyüme faktör-1 reseptörü, yaklaşık olarak 400 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Bu reseptör 2α (125kDa) ve 2β (90kDa) alt birimlerini disülfid köprüsü ile bağlayan heterotetramerik bir yapıya ve bir tirozin kinaz bölgesine sahiptir. Alfa alt birimi hücre dışında ve sisteinden zengin kısımlarını içerirken, beta alt birimi membran üzerinde olup tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Reseptörün α alt birimi IGF-1'in tanınması ve bağlanması işlevini gerçekleştirmektedir. Reseptörün α alt birimine bağlanan IGF-1, reseptörün üç boyutlu yapısında bir değişiklik oluşturarak 2α alt biriminin dimerizasyonuna neden olmakta ve otoaktivasyonu meydana getirmektedir. Otoaktivasyon sonucunda transmembran tirozin kinaz aktif hale gelir ve β alt ünitesindeki tirozinlerin ve hücre içi sinyal basamaklarının fosforillenmesi ile IGF-1'in metabolik etkileri oluşmaktadır. Ayrıca IGF-1R'nin aktivasyonu, sadece IGF-1'in aktivitesini değil aynı zamanda IGF-2'nin biyolojik etkilerinin birçoğunu düzenlediği belirtilmiştir. Bu yüzden IGF sisteminde IGF-1R, büyüme ve metabolik olgularda kritik öneme sahip bir reseptördür. Çünkü hücre döngüsünün gerçekleşmesi, farklılaşması ve

gelişimi gibi durumları kontrol edebilme özelliğine sahiptir. Sonuçta IGF'lerin mitojenik etkisi IGF-1R etkisi ile oluşmaktadır (Butler ve ark, 2003; Shoshana ve Martin, 2012).



Şekil 8. Memelilerde insülin büyüme faktör reseptörlerinin (IGFR) metabolik ve mitojenik etkileri (Klement ve Fink, 2016).

İnsülin benzeri büyüme faktör-1 reseptörünün, insülin reseptörleri (IR) ile birlikte GF-1R/IR heterodimerleri oluşturarak hibrid reseptörlerini meydana getirdiği ve birçok metabolik olayda rol oynadığı ileri sürülmüştür. Bu hibrid reseptörlerin gerek insüline gerekse de IGF'lere yüksek affinite ile bağlandığı, ancak IGF-1R'nin, IGF-1'i insülden daha yüksek affinite ile bağladığı bildirilmiştir. Hücresel düzeyde IGF-1R'nin büyümeden; IR'nin metabolik enerji homeostazisinden sorumlu olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda kas hücrelerinde IGF-1R miktarının insülin reseptörlerine (IR) göre çok daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu durum memelilerdeki durumun tam aksine, balıklarda insülin reseptörlerinden daha çok IGF-1'in kas yapısının düzenlenmesinde rol oynadığını ortaya koymaktadır (Chauvigné ve ark, 2003d; Holly ve Perks, 2012).

İnsülin benzeri büyüme faktör-2 reseptörünün, tek zincirli polipeptiddir ve ekstrasellüler uzun zincir kısa transmembran kısım ile devam etmektedir. IGF-1'in aksine heterotetramik yapıya sahip olmayan ve alt üniteleri bulunmayan bir transmembran proteindir. IGF-1R'de görülen tirozin kinaz aktivitesi yoktur ve bu yüzden IGF-1R'den farklı yapı göstermektedir. IGF-2R'nin, IGF-2'ye bağlanma özelliğinin yanı sıra mannoz-6 fosfat reseptör görevi gördüğü de belirtilmektedir. Ayrıca alabalıklarda IGF-2, memelilerde bilinen IGF-2/mannoz-6-fosfat-reseptörüne (IGF-2/M-6-PR) bağlanan iki bölgeden birinde bir aminoasit farkı

içerdiği bildirilmiştir. IGF-2R, IGF alım ve yıkımında rol oynamasına rağmen reseptörün IGF'lerin metabolik faaliyetlerindeki rolü ise tam olarak saptanamamıştır (Codina ve ark, 2008; Clayton ve ark, 2011; Klement ve Fink, 2016) (Şekil 8).

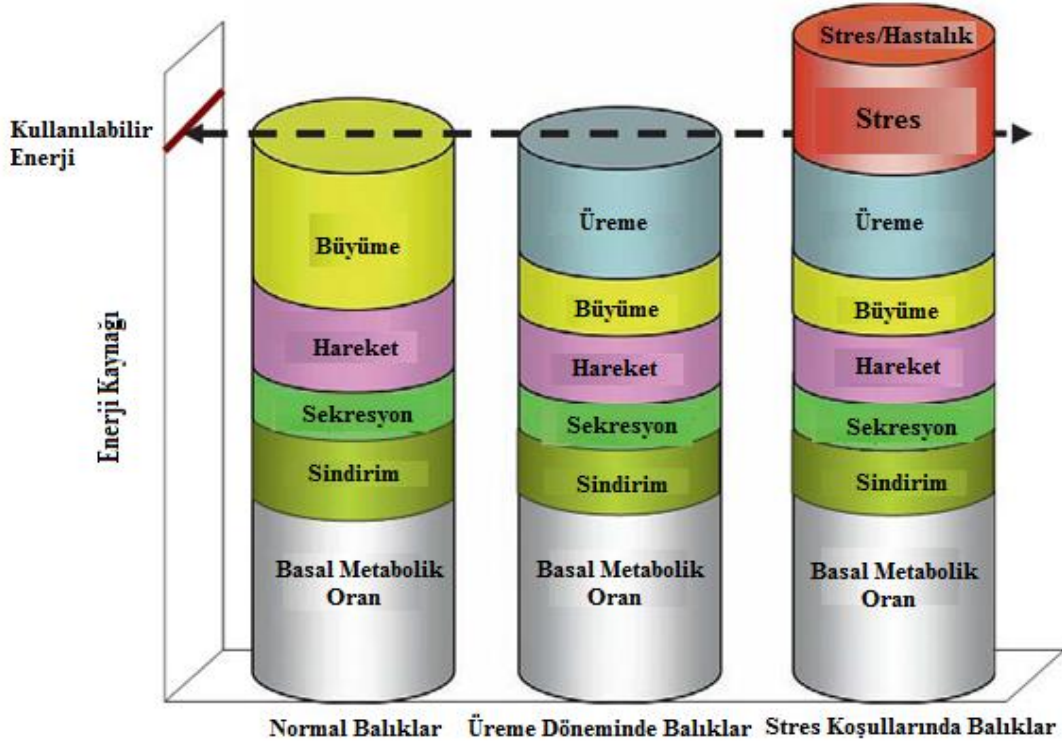
2.5. Balıklarda Stres Metabolizması

İnsanlar dahil tüm memelilerde stres kavramı, uyarıcıların farklı oranlardaki uyarılarına genel tepki olarak tanımlanmaktadır. Normal düzeylerin dışında farklı çevresel değişimlerin etkisinden kaynaklanan enerji kazancı ve kaybı arasındaki denge stres kavramı olarak adlandırılmaktadır. Wendelaar Bonga da (2011) stresi, omurgalı organizmanın dinamik dengesini değiştiren iç veya dış kaynaklı uyarıcıların sonucu olarak tanımlamıştır. Genellikle stres, organizmanın verdiği yanıtın ortadan kalkması ile son bulmakta ve zamanla organizma stres öncesindeki denge durumuna geri dönebilmektedir. Uzun süren stres faktörlerine karşı organizma yeni bir biyolojik denge oluşturarak adapte olmayı başarabilse de bu denge durumu vücut için her zaman faydalı olmamaktadır.

Doğal ve kültür ortamda yetiştirilen balıklar çevresel faktörlerin (fiziksel, kimyasal, biyolojik ve davranışsal faktörler) etkisiyle sürekli stres faktörlerine maruz kalmakta ve stres faktörlerine karşı organizmada, akut ve kronik stres oluşmaktadır. Akut stres, canlılarda ani ve şiddetli şok durumları ile karakterize edilirken, kronik stres uzun zaman dilimlerinde devam eden kesintisiz uyarım sonucu oluşmaktadır. Akut veya kronik olabilen fiziksel, kimyasal, biyolojik ve davranışsal faktörlere karşı balığın ortaya koyduğu fizyolojik değişimlerin toplamı “*stres cevabı*” olarak kabul edilmektedir (Rottmann ve ark, 1992).

Stres faktörlerinin şiddeti ve süresi balık tarafından bir stres cevabın verilip verilmemesinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır ve balıkların sağlıkları, büyümeleri, üremeleri ve hayatta kalmaları ile ilişkilendirilmektedir. Stres vericinin kronik veya akut yapısı stres cevap oluşturulmasında farklılaşmalara neden olmaktadır. Stres cevabının oluşması, organizmayı tehditle veya güçlkle karşılaşabilecek şekilde hazırlamaktır ve bu nedenle homeostatiktir. Organizmanın mevcut stres vericiler karşısında hayatta kalması için gereklidir; ancak durdurulamadığında ve nöroendokrin yolla organları/organ sistemlerini olumsuz etkilediğinde tehlikelidir (Martinez ve ark, 2009).

Balıkların stres koşullarında daha fazla enerjiye ihtiyacı olduğu ve herhangi bir faktörün stres oluşturuıcı faktör olarak nitelendirilebilmesi için, canlı açısından bir enerji maliyetinin olması gerekmektedir (Şekil 9).



Şekil 9. Normal veya stresli durumda balıkların enerji harcama durumunun şematik gösterimi. Normal koşullar altında balıklar, bazal metabolizma dışında enerjinin çoğu büyüme aktivitelerinde kullanılırken, üreme dönemlerinde besinlerden elde edilen enerji büyüme yerine daha çok üreme için kullanılmaktadır. Stres faktörlerin ortadan kaldırılması ya da stres yoğunluğunun en aza indirilmesi verimliliğin artmasına neden olmaktadır (Tort, 2011).

Kemikli balıklarda stres tepkileri, karasal omurgalı canlılarla benzerlik göstermektedir. Stres faktörleri altında, balıklar birincil ve ikincil yanıt olmak üzere birbirini takip eden iki tepki mekanizması oluşturur. Birincil yanıt, balıklarda stres yanıtının bir parçasını oluşturan bir nöroendokrin/endokrin yanıttır (Dai ve ark, 2015). Bu cevap, katekolaminler ve kortizol gibi stres hormonlarının dolaşıma hızlı bir şekilde salınmasını içerir. İkincil yanıt ise, dolaşıma salınan stres hormonları tarafından oluşturulan ve stres ile ilişkili çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik durumları içerir. İkincil yanıtlar genellikle, oksijen alımı, enerji substratlarının mobilizasyonu ve hidromineral dengesinin kontrol etmektedir. Birincil yanıt ve ikincil yanıt balıklarda stres cevabının oluşturulmasında oldukça önemlidir. Bu yanıtlar hem hipofiz hem de adrenal bezlerde birlikte meydana gelmektedir (Aerts ve ark, 2015).

Herhangi bir stres vericinin bir ortamda hakim olması durumunda öncelikle bir stres vericinin olduğu sinyali merkezi sinir sistemi ile beyine iletilmektedir. Beyin hipofiz bezini harekete geçirerek hipofizin uygun hormonları üretmesi için böbrekteki interrenal dokuyu

uyarmaktadır. Bu uyarı sonucunda glukokortikosteroidler (GS) ve katekolaminler salgılanmaktadır. GS'ler hipofiz-interrenal aksının son aşamasında salgılanan bir hormondur. Katekolaminler ise adrenal dokusunun kromaffin hücrelerinin sempatik olarak uyarılması sonucunda sentezlenmektedir (Martinez ve ark, 2009). Böylece katekolaminler (adrenalin ve epinefrin) kısa sürede glikojenez aracılığıyla enerji sağlama görevini üstlenirken, GS'ler glikojen, lipid ve protein katabolizmasını uyararak enerji sağlama görevini üstlenmektedir. Bu hormonlar, organizmanın homeostazisini korurken çevresel bir değişime veya olumsuz bir duruma karşı toleransını arttırmaktadır (Lowe ve Davison, 2005; Ögüt, 2005).

Balıklarda stres tepkisine neden olabilecek faktörler aşağıdaki gibi gruplandırılmaktadır (Van Ham, 2003; Ögüt, 2005; Tort, 2011).

Tablo 2. Balıklarda stres cevabı oluşturan fiziksel, kimyasal, biyolojik ve balıkçılık yönetiminden kaynaklanan stres faktörleri.

Fiziksel stres faktörleri	Kimyasal stres faktörleri	Biyolojik stres faktörleri	Balıkçılık yönetiminden kaynaklanan stres faktörleri
Sıcaklık	Düşük çözünmüş O ₂	Yaş ve Cinsiyet	Bakım
Fotoperiyot	Optimal olmayan pH	Genetik geçmiş	Temizlik
Ses	Kirlilik	Stok yoğunluğu (Toplanma ve kalabalık)	Sayım
Çözünmüş gazlar	İlaç ve kimyasal kullanımı	Diğer balık türleri (Baskıcı, alan muhafazası, yer ihtiyacı, rekabet)	Transfer
Çevresel tuzluluk	Diyet içerikleri	Mikro canlılar ve makro canlılar (Patojenik olan veya olmayan canlı türleri)	Hastalık tedavisi

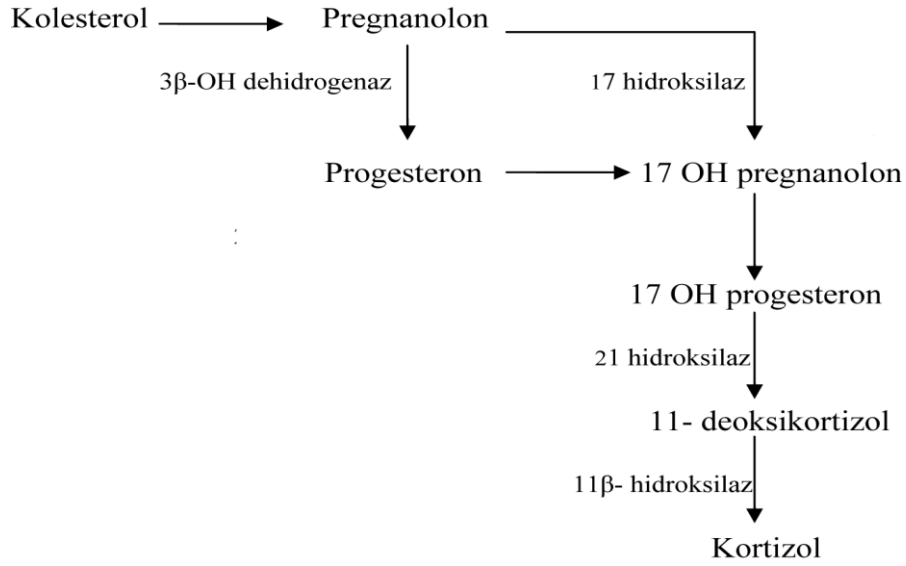
Bazı serum metabolitleri, stres koşulları altında balıkların fizyolojik durumlarını değerlendirmek için kullanılmaktadır. Serum endokrin hormonların ölçümü ile stresin direkt olarak ölçümü gerçekleştirilir. Aynı zamanda stres cevabından sonra kan ve dokularda oluşan

fizyolojik değişimlerin (ikincil) tespiti ile karşılaşılan stresin seviyesi hakkında fikir sahibi olunabilmektedir. Serumda doku veya organ zararının göstergesi olan enzimlerin tespiti ve kanda glikoz seviyesi ölçümü ile hormonal aktivitenin indirek göstergesi olarak stres etkisi belirlenmektedir. Özellikle serum kortizol hormonu ve glikoz metabolitleri balıklarda stres indikatörü olarak görev yapmaktadır. Ayrıca birçok araştırmacı stresin balıklarda serum kortizol ve glikoz seviyelerini artırdığını "*kural olarak*" değerlendirmektedir (Peterson ve Small, 2004; Martinez ve ark, 2009; Arnason ve ark, 2013; Madison ve ark, 2015).

2.5.1. Kortizol Hormonu

Kortizol, adrenal korteksin zona fasikulata ve retikularis tabakasında vücudun strese gösterdiği tepkiyle ilişkili olarak salgılanan bir kortikosteroid hormondur. Tüm steroid hormonlar gibi kortizolde 21 C'lu kolesterolden sentezlenmektedir. Yapısında üç tane 6 karbonlu sikloheksan halkasının oluşturduğu fenantren halkası ile bir tane 5 karbonlu siklopentan halkasının yer aldığı siklopentanoperhidrofenantren halka sistemi bulunmaktadır. Kolesterolden kortizol sentezinin bir kısmı mitokondride gerçekleşirken bir kısmı endoplazmik retikulum organelinde gerçekleşmektedir. Steroid hormonların sentezinde ilk basamak kolesterolün mitokondri içinde kolesterol desmolaz etkisi ile yan zincirdeki 6 karbon atomunu kaybedip pregnanolona dönüşmesidir (Fürtbauer ve Heistermann, 2016).

Pregnenolon, ilk olarak endoplazmik retikulumda 17 α -hidroksilaz ve 17/20-desmolaz aktivitesine sahip P450-C17 enzim sistemiyle 17-OH-pregnenolona, sonra 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz ve Δ^5 -ketosteroid izomeraz ile 17-OH-progesteron sentezlenmektedir. Sentez edilen 17-OH-progesteron, endoplazmik retikulumda 21-hidroksilaz aktivitesine sahip P450-C21 enziminin etkisi ile 11-deoksikortizole dönüşür ve son basamakta 11-deoksikortizolden, mitokondride 11 β -hidroksilaz aktivitesine sahip P450-C11 etkisi ile kortizol hormonu oluşmaktadır. Kortizol, 11 beta hidroksisteroid dehidrogenaz (11beta-HSD) tip 2 enzimi ile kortizona dönüşmektedir (Esmer ve Akbayır, 2012) (Şekil 10).



Şekil 10. Memelilerde kortizol hormonu sentez yolu (Esmer ve Akbayır, 2012).

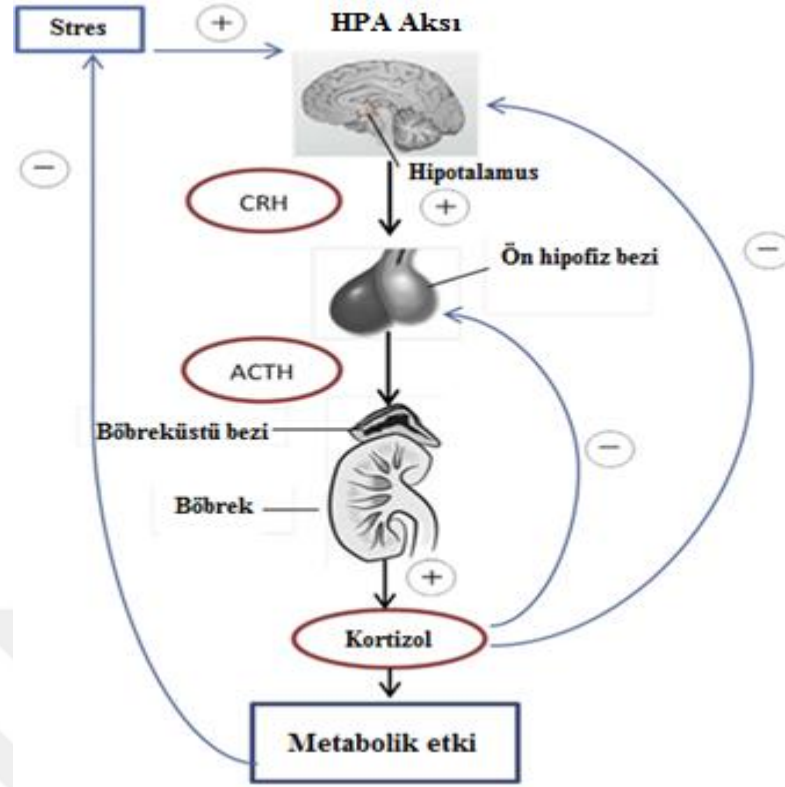
Adrenal korteksten salgılanan hormonların yarısını oluşturan kortizolün, yaklaşık % 90'tan fazlası plazma proteinlerine bağlı olarak taşınmaktadır. Bu plazma proteinleri kortizol bağlayıcı globulin (KBG), albümin ve α_1 asit glikoproteindir. Geriye kalan kortizolün % 10'luk kısmı dolaşımda serbest halde bulunur ve biyolojik olarak aktif olan kısımdır. Stres faktörlerine maruz kalındığında kortizol salınımı çok yüksek olduğu için ilk olarak KBG kortizolü bağlar ve geri kalan bağlanamayan kortizolleri bağlamak için de organizmada her zaman yeterli miktarda albümin bulunmaktadır. Albümin, KBG'ye göre daha düşük afiniteyle daha fazla kortizol bağlar ve KBG bağlama kapasitesi doygunluğa ulaşınca albumine bağlanma oranı artmaktadır. Bağlanma miktarı ve metabolik inaktive edilme hızı kortizolün plazma yarı ömrünü belirlemektedir. Bağlı durumda steroidler inaktif haldedir ve bu durum metabolik klirensi geciktirir ve böylece dolaşımdaki kortizol havuzu sağlanmış olur ve plazma serbest kortizolü epizodik dalgalanmalardan korunur (Greenspan ve Gardner, 2004).

Yağda çözünme özelliği olan kortizol hücre zarından kolayca diffüze olur ve etkilerini intrasellüler reseptörlerine bağlanarak göstermektedir. Bu reseptörlerden biri glukokortikoid reseptörüken, diğer reseptör ise mineral kortikoid reseptörüdür. Her iki reseptör de stoplazma içerisinde inaktif halde bulunur ve ilk olarak glukokortikoid reseptörü nükleusa girerek glukokortikoid'e bağlanarak aktifleşmektedir. Aktive olan hormon-reseptör kompleksi, glukokortikoid sentezleyen genlerin promoter bölgeleriyle etkileşir ve DNA'ya bağlanarak doğrudan transkripsiyonu artırıcı veya azaltıcı etkiler gösterir. Ayrıca

glukokortikoidler doğrudan DNA'ya bağlanmadan protein transkripsiyonu ile de etkilerini göstermektedir (Girod ve Brotman, 2004).

2.5.1.1. Kortizol hormon sekresyonunun düzenlenmesi

Kortizol hormonu, hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) ekseninde hipotalamik kortikotropin salgılatıcı faktörün (CRH) kontrolü altında Adrenokortikotropik Hormonu (ACTH) tarafından sentezlenmektedir. Balıklar stres koşullarına maruz kaldığında, santral sinir sistemi stres ile ilgili nörolojik ya da hormonal uyarıları hipotalamusa gönderir. Uyarılara karşı hipotalamustan CRH serbest kalır. Hipotalamustaki paraventriküler nükleustan salgılanan CRH, 41 aminoasitten oluşan peptid yapıda bir hormondur. Organizmanın hücre ve dokularında gözlenen hipoksi, hipoglisemi, yüksek sıcaklık, nekroz ve toksisite gibi durumların sonucunda ortaya çıkan stresler nörosekretör hücreleri uyarır ve CRH salınımı artar. CRH'ler parakrin etki göstererek hipofizer portal dolaşım yoluyla ön hipofize ulaşır ve kortikotrop hücrelere etki ederek ACTH salgılanmasına neden olur. Sentezlenen ACTH, adrenal kortikal steroid sentezini, kolesterolün adrenal kortikal hücrelere girişini, depolanmış kolesterol esterlerinin hidrolizini ve kolesterolün yan zincirinin koparılması sonucunda pregnenolon oluşumunu hızlandırarak kortizol sentezini gerçekleştirir. ACTH aşırı salındığında serum kortizol düzeyi yükselir ve yüksek kortizol düzeyleri, hipotalamus ve hipofizi negatif feed back mekanizması ile uyararak ACTH salınımını engeller. Serum kortizol düzeyi düşük olduğunda ise kortikotropin salgılatıcı hormon salınımında bir artış görülür. Aynı zamanda serum kortizol düzeyi azaldığında ACTH düzeyi yükselirken, plazmada kortizol düzeyi yükseldiğinde ise ACTH düzeyi azalmaktadır. Böylece ACTH salınımı dolaşımdaki kortizolün geri bildirim mekanizması ile kontrol edilmektedir (Onat ve ark, 2006; Martinez ve ark, 2009; Kulkarni ve ark, 2016) (Şekil 11).



Şekil 11. Kortizol hormonunun feedback düzenlenmesi (Kulkarni ve ark, 2016).

Serum kortizol sekresyonunu ayarlayan iç ve dış faktörler bulunmaktadır. Serum kortizol düzeyinin sıcaklık, yaş, beslenme, beslenme sonrası durum, cinsiyet, yetiştirme alanları ve mevsim gibi birçok faktörden etkilendiği rapor edilmiştir (Pottinger ve ark, 2003). Strese karşı oluşan yeterli kortizol düzeyi konak immun yanıtı ve homeostazı sağlar. Organizma herhangi bir stres durumu ile karşılaştığında önce hipotalamustan CRH salgısı artar ve sırasıyla hipofizden ACTH salgısını uyarır ve ACTH’da adrenal kortizol salgılanmasını gerçekleştirir. Stres etkeni ortadan kalkınca, aşırı uyarılmışlık durumu normale döner ve kortizol, hipotalamustan salgılanan CRH ve hipofizden salgılanan ACTH’yı kısıtlar. Stres cevabının oluşturulmasında kortizolün salgısı katekolaminlerden daha yavaştır ancak etkileri daha uzundur ve homeostaziyi sağlamak için mineral ve glukokortikoid aktivasyonlarını düzenler (Martinez ve ark, 2009; Fürtbauer ve Heistermann, 2016).

2.5.1.2. Kortizol hormonunun fizyolojik etkileri

Kortizolün organ sistemleri ve metabolizma üzerinde birçok etkisi bulunmaktadır. Sıvı elektrolit dengesi, kan basıncının devamlılığı, enerji metabolizması, stres yanıtı, iskelet sistemi ve bağ doku gelişimi, hücresel çoğalma ve farklılaşma gibi birçok yaşamsal olayın

düzenlenmesinde de kortizol önemli rol oynamaktadır. Kortizolün GLUT-4 reseptörleri vasıtasıyla glikoz alımını azalttığı ve böylece insüline zıt etkili çalışarak glukagon hormonu gibi kan şekerini arttırıcı etki gösterdiği ileri sürülmektedir (Mert, 2009).

Kortizolun en önemli etkisi glikojen depolanması ve glukoneojenezdir. Bunu da protein, yağ ve karbonhidrat moleküllerinin yapım ve yıkımını eş güdümlü bir biçimde gerçekleştirerek glikoz üretimini arttıracak şekilde düzenlemektedir. Özellikle karaciğer dışındaki dokulardan aminoasitlerin serbest hale geçerek hücre dışı sıvıya ve seruma geçmesine neden olmaktadır. Böylece aminoasitlerin hücre dışı sıvıdan karaciğer hücrelerine taşınımını sağlamak ve karaciğerde fosfoenol pirüvat karboksikinas ve glikoz-6 fosfataz gibi enzimleri uyarak glukoneogenezi artırmaktadır ve organizmanın tüm hücrelerinde glikoz kullanma hızını düşürmektedir. Aynı zamanda karaciğerde glikojen sentaz enzim aktivitesini arttırarak glikojen sentezini gerçekleştirmektedir (Sözbilir ve Bayşu, 2008).

Bu hormon kas doku üzerinde katabolik etkiler göstermektedir. Özellikle organizmada hücre onarımı, doku büyümesi ve gelişimi, enerji metabolizması için hücre ve plazmada aminoasitlerin bulunması gerekmektedir. Bu hormon kaslardaki protein yıkımını arttırıp, yeni protein sentezini baskılayarak; karaciğerde glikoz sentezi için plazmaya amino asit sağlamaktadır. Ayrıca karaciğerde aminoasitlerin glikoza dönüşümünü gerçekleştiren alanin transaminaz, tirozin transaminaz ve triptofan pirolaz gibi enzimlerin düzeylerini de artırmaktadır. Böylece kortizol, plazmada belirli düzeyde artmış durumda hazır aminoasit bulunmasını sağlamaktadır. Diğer taraftan yoğun kortizol etkisi ile sürekli gerçekleşen protein katabolizması ve artan plazma aminoasitlerin karaciğerde glikoza dönüşümleri; karaciğer dışındaki dokularda aminoasit miktarlarını ve protein depolarını azaltmaktadır. Bu durumda; önemli miktarda protein kaybı doku hasarlarına ve çizgili kaslarda kayıplara neden olmaktadır. Aynı şekilde kortizolün, çizgili ve kalp kası aktivitesini ve kasılmasını koruduğu, miyokardiyal Na^+ , K^+ - ATPaz ve β -adrenerjik reseptörlerini arttırdığı, ancak yüksek kortizolün kas kütlelerinde ve kas kuvvetinde azalmaya neden olduğu, kas protein sentezini azalttığı ve kas metabolizmasını arttırdığı rapor edilmiştir (Madison ve ark, 2015).

Kas dışında yağ dokudan yağ asitlerini harekete geçirerek plazma serbest yağ asit konsantrasyonunu arttırmakta ve hücrelerde yağ asitlerinin oksidasyonunu yükseltmektedir. Kortizolün aşırı sentezlenmesi, lipolizi uyarak hiperlipidemiye neden olmakta ve canlının bazı bölgelerinde yağ birikimine neden olabilmektedir. Kortizolün bu etkilerinin dışında, osteoblast fonksiyonunu baskılayarak, yeni kemik oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (Karadağ, 2010).

2.6. Real Time PCR

Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR), hücrelerden izole edilen RNA moleküllerinin revers transkriptaz enzimi (RT) ile komplementer DNA'ya (cDNA) sentezini gerçekleştiren, PCR uygulamalarında optimum performansa ulaşabilmek için geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu yöntem, az sayıdaki hücreden aynı anda fazla miktarda RNA'nın analizini olası kılmaktadır. Ayrıca hücresel bir RNA örneğindeki tüm mRNA'lardan PCR yoluyla cDNA kitaplıklarının oluşturulması için de uygun bir yöntemdir. Bu yüzden RT-PCR, mRNA miktarının belirlenmesi ile RNA düzeyinde gen anlatımı çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Edwards ve Saunders, 2009).

RT-PCR'da, ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapıldığı için, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi ve agaroz jel elektroforezi gibi farklı işlemlerin uygulanmasına gerek duyulmamaktadır. Ürünlerin niteliksel ve sayısal analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problemlerden yararlanılmaktadır. DNA sarmalına bağlanan özel boyalar ışığa yaparak ürün miktarını göstermektedir. RNA ve DNA örnekleri, kantitatif olarak kısa sürede analiz edilirken, çok sayıda örnekle oldukça düşük kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir. Hızlı olmasının yanı sıra duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir yöntemdir (David ve ark, 2019).

2.6.1. Real Time PCR'da Kullanılan Metodlar

Higuchi ve ark (1993), PCR ürünlerinin oluşumunu izleyen bir sistem geliştirmişlerdir. Bu sistemin temeli, ısısal döngü cihazında gerçekleşen her PCR reaksiyonlarının ethidyum ilavesi yaparak, elde edilen floresansın bilgisayar destekli bir kamera ile saptanmasına dayanmaktaydı. PCR işleminde çoğalan çift iplikli DNA miktarının artması döngü sayısı ile doğru orantılı olarak sinyali de arttırdığından sistem PCR ürününün kantitatif olarak değerlendirilmesini mümkün kılmaktaydı. Higuchi ve ark (1993) bu sistemde, ilk kez RT-PCR deneyini enterkalatör ethidyum bromür boyası kullanarak 1993 yılında yayımlamışlardır.

Enterkalatör boyalardan bir diğeri SYBR Green, etidyum bromid gibi çift zincirli DNA'ya bağlanarak floresan emisyonunda artışa neden olmaktadır. SYBR Green, serbest formda tespit edilemeyen miktarda düşük floresan verirken, çift zincirli DNA'ya bağlandığında ise yüksek miktarda floresan emisyonu vermektedir ve çift iplikli DNA'ya bağlanma özelliğinden dolayı günümüzde RT-PCR uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda SYBR Greenin en önemli avantajı herhangi bir primer

çiftiyle çalışabilmesi ve problardaki gibi sentez ve dizayna ihtiyaç duymamasıdır. Bu özelliği ile çalışma maliyetini oldukça düşürmektedir. Ancak, PCR reaksiyonunda oluşması muhtemel olan primer dimerleri ve hedefe özgün olmayan çoğaltım ürünleri gibi istenmeyen çift iplikli yapılara enterkalatör boyaların bağlanma özelliğinin olması nedeniyle sinyallerde artış olması en önemli dezavantajı oluşturmaktadır. İyi düzenlenmiş primerler ve doğru bölgelere bağlanan proplar, primer dimerlerini ya da hedefe özgün olmayan çoğaltım ürünleri gibi istenmeyen çift iplikli yapılara enterkalatör boyaların bağlanmasını önleyerek bu dezavantajlı durumu ortadan kaldırmaktadır. Aynı şekilde bu dezavantajlı durum; her PCR ölçümü için bir veya daha fazla sayıda floresan probun sentez ve dizaynı gerektiren, floresan rezonans enerji transferi (FRET) teknolojisinin kullanıldığı farklı bir tekniği ortaya çıkarmıştır. Bu teknikte TaqMan veya hidroliz prob, moleküler beacon prob, scorpion prob ve hibridizasyon prob gibi farklı proplar kullanılmaktadır (Günel, 2009; David ve ark, 2019).

Hücrelerde mRNA düzeyleri tespit edilecek ise, ters transkriptaz PCR kullanılmaktadır. İlk olarak RNA moleküllerinden ters transkriptaz ya da bir primer yardımı ile cDNA sentezi gerçekleşmektedir. cDNA sentez reaksiyonlarında oligo (dT) primerler veya gen spesifik primerler (GSP), random-hegzamer primerler ve sentez için ters transkriptaz enzimleri kullanılmaktadır. Oluşan RNA/cDNA heterodubleksi RNAaz aktivitesi ile parçalanmakta ve cDNA tek iplikçiğe dönüşmektedir. Kullanılan primerler bağlanma sıcaklığında cDNA'daki hedef diziye bağlanır ve Taq DNA polimeraz enzimi ile uzama işlemi başlatılır. Bu siklus sonunda milyonlarca mRNA sentezlenir (McPherson ve Simon, 2006).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Araştırmada kullanılan balık materyali Aydın'ın Çine ilçesinde bulunan doğal ortamda balık yetiştiren özel alabalık üretim tesisinden temin edildi. Çalışmada farklı dönemlere ait 50-1000 gr ağırlığında 40 adet gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanıldı. Alabalıklar 10'ar örnekten oluşan 4 gruba ayrıldı (Tablo 2). Örneklerin alınması sırasında ocak döneminde su sıcaklığı 18 °C, temmuz döneminde ise 27 °C ölçüldü. Analiz sonuçlarını etkileyebilecek diurnal değişiklikleri en aza indirmek için örnekler saat 12:30'ta alındı. Balıkların kas örnekleri, dorsal yüzgeç ile yan çizgi arasında kalan kas dokusundan ortalama 1'er g'lık alındı. Karaciğer ve kas dokusu temin edildikten sonra sıvı azotta hemen dondurularak, analiz yapılncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi. Çalışmaya başlamadan önce Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik kurulundan 09/10/2014 tarih ve 2014/140 sayılı etik kurul kararı ile onay alındı.

Kuyruk venasından kan alınması sırasında balıklar, 1/20.000 konsantrasyonda quinaldine ile anestezi edildi ve anestezi sonrası ıslak bir havlu ile tespit edilen balıkların kaudal (kuyruk) venasından enjektör ile girilerek steril tüplere 2 - 2,5 ml kan alındı. Kan alma işlemi en geç 45 sn de tamamlandı. Çalışmada analizler Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan örnekler ve grupları.

1. GRUP	2. GRUP	3. GRUP	4. GRUP
Ocak Dönemi Yavru Alabalık	Ocak Dönemi Ergin Alabalık	Temmuz Dönemi Yavru Alabalık	Temmuz Dönemi Ergin Alabalık
n: 10	n: 10	n: 10	n: 10
50 - 100 gr	600 - 1000 gr	50 - 100 gr	600 - 1000 gr

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmalar sırasında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında bulunan Distile su cihazı (Millipore), Masa üstü mini santrifüj (Mini star), Santrifüj (Nüve Model:NF800R), Santrifüj (Hettich Model: Mikro 20), Manyetik karıştırıcı (Are-Velpscientifica), Vorteks (Yellowline Model: IKA-290), Scaltec elektronik analitik terazi (Model:SBC31), Etüv (Memmert Model: UM40), Otoklav (Hirayama Model:HVE50), pH metre (Hanna Model: pH211), Güç kaynağı (BioRad Model: PowerPac 300), Mikrodalga fırın (Altes), Hot block (Eppendorf Model: Thermomixer), DeepFreeze (-86) 490 Lt (Nuarie Model: NU6617W35), 4 °C buzdolabı (Indesit), Multiscango spektrofotometre (Thermoscientific–ThermoFisher), ELISA okuyucusu (Optic Ivymen System 2100-C), PCR kabini (Nüve), Applied Biosystems PCR cihazı (2720 ThermalCycler), Lightcycler Nano Real Time PCR cihazı (Roche Mini 32’li), Görüntüleme ve analiz sistemi (UVP EC3 Imaging System Chemi HR 410), Otomatik pipetler (2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, çok kanallı pipet) (Isolab&finnpipette) kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Analizler sırasında; serum glikoz tayini kolorometrik yöntem ile belirlenirken, serum büyüme hormon tayini için Büyüme Hormon (GH) ELİSA Kiti (Fish Growth Hormone ELISA Kit, Cusabio, CSB-E12121Fh, Çin), serum kortizol tayini için Kortizol (COR) Elisa Kiti (Fish Cortisol ELISA Kit, Bioassay Technology Laboratory, E0014F1, Çin), Total RNA analizi için RNA izolasyon kiti (High Pure RNA Isolation Kit, Roche, Version 09, 12 033 674 001, Almanya), cDNA sentez kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthese kit, Roche, Version 06, 04 896 866 001, Almanya), PCR kiti (Fast Start Essential DNA Green Master kit, Roche, Version 13, 04 707 516 001, Almanya) kullanıldı.

3.1.3. Primerler

Gen materyali olarak RNA, primer olarak ise fishIGF-1, fishIGF-2, fishGHR genleri ve fishBeta-actine (β -actin) spesifik primerler kullanıldı. Karaciğer ve kas dokularında balık fishIGF-1, fishIGF-2, fishGHR ve fish β -actin genleri internet ortamındaki gen bankası (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) kullanılarak seçildi. Balık fishIGF-1 geni NM_001124696 kod numaralı, fishIGF-2 geni NM_001124697 kod numaralı, fishGHR NM_001124731 kod

numaralı ve fish β -actin geni NM_001124235 kod numaralı mRNA verilerinin baz dizilimleri değerlendirmeye alındı ve oluşturulan primerlerin ilgili bölgeye spesifiklikleri (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) kontrol edilerek belirlendi. Bu çalışmada kullanılan genlere ait primerler Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 4. qRT-PCR için kullanılan primer dizileri.

GEN	Primer Sekans (Baz dizisi) (5'→3') Primer Uzunluğu (bp) (F: Forward/İleri, R: Reverse/Geri)	mRNA Baz Dizisi Uzunluğu	NCBI Referans Sekans Numarası
IGF-1	F GTGACATTGCCTGCATCTTATC R CTGGAAGAAATGACCGCTAGA	863bp	NM_001124696
IGF-2	F ACTCTTGCGCTCTCTCTTTCAT R CCGCTAAGGATCCACCTAAAT	1148bp	NM_001124697
GHR	F TTCGAGGCAGGAGAATCATCA R CCCACTAAAGAGTCCCGATTTC	2822bp	NM_001124731
β -Actin	F GATCTGGCATCACACCTTCTAC R TCTTCTCCCTGTTGGCTTTG	1958bp	NM_001124235

3.2. Yöntem

3.2.1. Glikoz Tayini

Serum glikoz seviyeleri, glikoz oksidaz enzim aktivitesinin kolorimetrik olarak ölçülmesi ile belirlendi (Tietz, 1994).

Analiz prensibi:

Glikoz oksidaz enzimi, suda erimiş moleküler oksijeni kullanarak glikozdan glukonik asit ve hidrojen peroksiti (H_2O_2) oluşturur. Oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2), fenol ve ampiron gibi maddelerle peroksidaz enzimi varlığında reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturur. Rengin şiddeti, ortamdaki glikoz miktarı ile doğru orantılıdır. Ölçüm kolorimetrik olarak yapılır.

Reaktifler:

1- Enzim Tampon Reaktifi (Glukoz oksidaz, Hidrojen peroksidaz, 4- Aminoantipyrine, pH: 6,5 fosfat tamponu, Fenol).

Analiz prosedürü:

1. Numune, standart ve kör tüplerine 1'er ml enzim-kromogen reaktifinden eklendi.
2. Reaktifler eklendikten sonra numune tüplerine serumdan 10 µl eklenerek karıştırıldı.
3. Aynı şekilde standart tüplere 10 µl hazırlanan glikoz standartlarından eklendi.
4. Blank tüpüne ise sadece 10 µl distile su eklendi.
5. Hazırlanan tüpler 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. Numune ve standartların her biri köre karşı 540 nm dalga boyunda UV spektrofotometresinde (Shimadzu UV-1601, Avustralya) okundu.

Glikoz düzeyinin belirlenmesi:

Numunenin absorbans / Standartın absorbans X Standartın konsantrasyon = Glikoz (mg/100 ml)
(Glikoz standart = 100 mg/dl)

3.2.2. Kortizol Hormon Tayini

Serum kortizol analizi, ticari ELISA kiti (Fish Cortisol ELISA Kit, Bioassay Technology Laboratory, E0014F1) kullanılarak gerçekleştirildi.

Analiz prensibi:

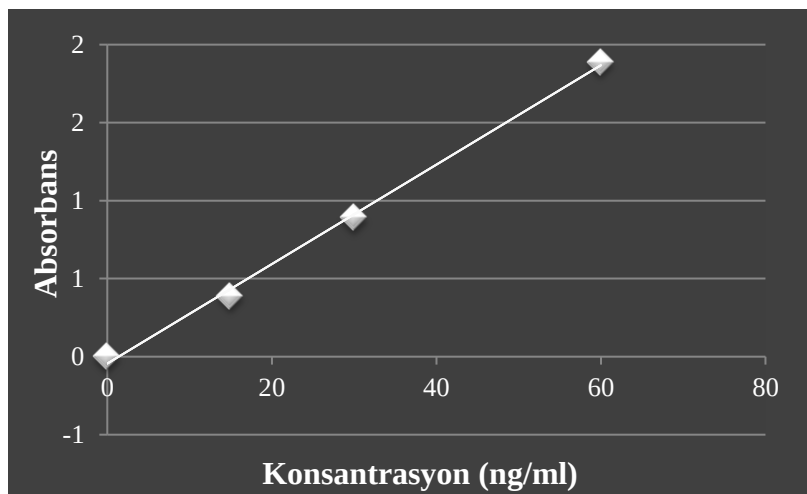
Kortizol analiz kiti, biyolojik örneklerdeki stres düzeylerinin kantitatif ölçümü için kullanılan bir biyoanaliz araçtır. Kortizol antikoruna bağlı olan kuyucuklara, numuneler, streptavidin-HRP, biyotinle işaretlenmiş anti kortizol antikorlar ve renk gelişim sürecini başlatacak olan reaksiyon başlatıcı solüsyonlar karıştırıldı. Kısa bir inkübasyondan sonra durdurma solüsyonları da eklendi ve hem örnekler hem de standartlar ELISA okuyucusunda

okundu. Bilinmeyen numunelerdeki kortizol içeriği, daha önceden belirlenmiş kortizol standart eğrisi ile karşılaştırılarak tespit edildi (Şekil 12).

Analiz prosedürü:

1. Önce seri seyreltmeler yapılarak standartlar hazırlandı.
2. ELISA plakalarındaki standart kuyucuklarına 50 µl Standart ve 50 µl Streptavidin-HRP eklendi.
3. Numune kuyucuklarına sırasıyla 40 µl serum, 10 µl COR antikoru ve 50 µl Streptavidin-HRP ilave edilerek karıştırıldıktan sonra 37 °C’de 60 dakika karanlıkta inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrası her kuyucuk hazırlanan 250 µl 1X Yıkama solüsyonu (1:30, v/v) ile 30 saniye aralıklarla 5 kez yıkandı.
5. Yıkama işlemi ardından her bir kuyucuğa sırasıyla 50 µl Solüsyon A ve 50 µl Solüsyon B eklenerek renk gelişimi için 37 °C’de 10 dakika karanlıkta inkübe edildi.
6. Daha sonra her bir kuyucuğa 50 µl Durdurma Solüsyonu eklenerek plaka karıştırıldı ve 10 dakika içinde 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda plate okunarak absorbansları belirlendi.

Kortizol hormonu standartının değişik konsantrasyonları (7,5 - 240 ng/ml) ile hazırlanan standart eğrisinden faydalanılarak kortizol seviyeleri serum için µM olarak hesaplandı. Serum kortizol değerlerine ait standart eğrisi Şekil 12’de gösterilmiştir.



Şekil 12. Serum kortizol hormon standart eğrisi ($R^2 = 0,997$, R^2 : Belirleme katsayısı).

3.2.3. Büyüme Hormon Tayini

Serumda büyüme hormon analizi, ticari ELISA kiti (Fish growth hormone ELISA Kit, Cusabio, CSB-E12121Fh) kullanılarak gerçekleştirildi.

Analiz prensibi:

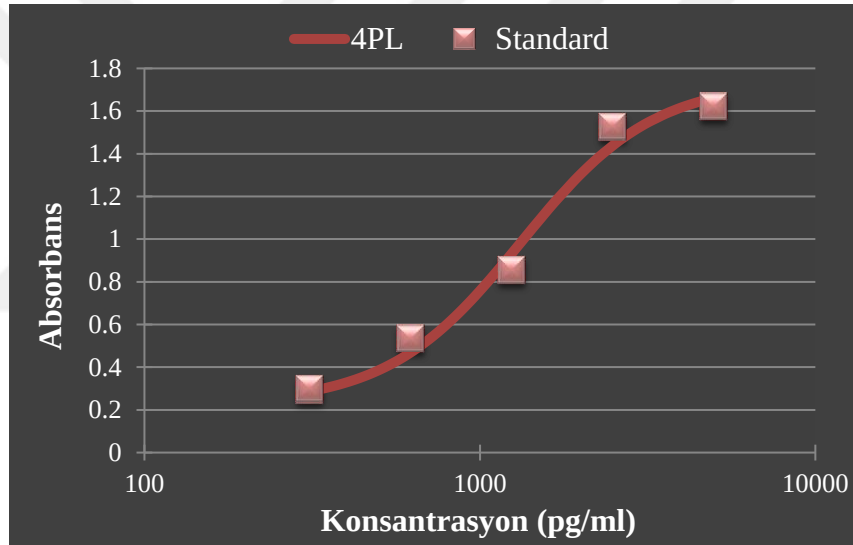
Büyüme hormonuna özgü bir antikor ile kaplı olan kuyulara standartlar ve numuneler Biotin konjuge GH ile birlikte absorbe ettirildi. Absorbsiyon sonrası numunelerde bulunan GH içerikleri ile Biotin konjuge GH içerikleri, kuyucuklarda kaplı olarak bulunan spesifik GH antikorlarına bağlanmak için rekabet ederler. Numunelerdeki GH miktarı ne kadar fazla olursa, Biotin ile konjuge edilmiş GH'lar kuyucuklarda bağlı olan spesifik antikora daha az bağlanırlar. İkincil bir antikor olan HRP ile Substrat solüsyonu kuyulara eklenir ve renk değişimi numunedeki GH miktarının tersine gelişti. Kuyucuklara durdurma solüsyonu da konularak renk gelişimi durduruldu ve rengin yoğunluğu ölçüldü. Bilinmeyen numunelerdeki GH içeriği, daha önceden belirlenmiş GH standart eğrisi ile karşılaştırılarak tespit edildi (Şekil 13).

Analiz prosedürü:

1. İlk olarak ELISA plakasında hiçbir solüsyonun olmadığı bir kör kuyucuğu belirlendi.
2. Daha sonra ELISA plakalarındaki standart kuyucuklarına 50 µl hazır standart solüsyonlarından, numune kuyucuklarına da 50 µl serum örneklerinden eklendi.
3. Kör kuyucuğu hariç her kuyucuğa 50 µl GH-Biotin konjugatı eklendi ve karıştırılarak 37 °C’de inkübe edildi.
4. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 200 µl 1X Yıkama solüsyonu (1:20, v/v) eklenecek şekilde 3 kez yıkandı ve 2 kez tekrarlandı. Her yıkamadan önce 10 saniye kuyucuklarda yıkama solüsyonu bekletildi.
5. Yıkama sonrası kör kuyusu hariç standart ve numune kuyucuklarına HRP-avidin eklenerek karıştırıldı ve 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi.
6. Yine inkübasyon sonrası her kuyucuğa 200 µl 1X Yıkama solüsyonu (1:20, v/v) eklenecek şekilde 3 kez yıkandı ve 2 kez tekrarlandı. Her yıkamadan önce 10 saniye kuyucuklarda yıkama solüsyonu bekletildi.

7. Yıkama sonrası her kuyucuğa sırasıyla 50 µl Substrat A ve 50 µl Substrat B ilave edilerek karıştırıldı ve 37 °C’de 15 dakika karanlıkta inkübe edildi.
8. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklendi ve karıştırıldı.
9. Durdurma solüsyonu ile kuyucuklarda oluşan rengin maviden sarıya dönüştüğü görüldü.
10. 10 dakika içinde 450 nm’de ELISA okuyucusunda plate okunarak absorbansları belirlendi.

Büyüme hormonu standartının değişik konsantrasyonları (312,5 - 5000 pg/ml) ile hazırlanan standart eğrisinden faydalanılarak büyüme hormon seviyeleri serum için µM olarak hesaplandı. “4 PL curve analysis” kullanılarak oluşturulan büyüme hormon standart eğrisi şekil Şekil 13’de gösterilmiştir.



Şekil 13. “4 PL curve analysis” kullanılarak oluşturulan büyüme hormon standart eğrisi ($R^2 = 0,989$, R^2 : Belirleme katsayısı).

3.2.4. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için steril şartlarda yavru ve ergin balıkların karaciğer dokuları, dorsal yüzgeç ile yan çizgi arasında kalan kısımdan da kas dokuları alındı. RNA izolasyonunda High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Version 09, 12 033 674 001) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı.

Analiz prosedürü:

1. Dokular 20 - 25 mg'lık küçük parçalara ayrılarak steril 2 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı ve daha sonra üzerine 400 µl Lysis Binding Buffer ilave edilerek pipetaj yapıldı.
2. Tüpün içerisine 5 mm'lik 2 adet çelik boncuk (QIAGEN Cat No:69989) konularak üzerine 100 µl PBS eklendi ve TissueLyser LT'de 40 Hz'de 5 dakika süreyle parçalandı.
3. İyice parçalanmış doku örneklerinin içinden çelik boncuklar çıkartılarak 13000 g'de 3 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi ve sonraki adımlar için süpernatantlar steril ependorf tüplerine aktarıldı.
4. Ependorf tüplerdeki süpernatantlar üzerine 200 µl absolute etanol ilave edildi ve 15 saniye vorteks yapıldı.
5. Vortek sonrası örnekler filtreli tüplere aktararak 13000 g'de 3 dakika santrifüj edildi ve daha sonra üzerine 90 µl DNase inkübasyon buffer + 10 µl DNase karışımı eklendikten sonra 15 dakika inkübe edildi.
6. Üzerine 500 µl 1. yıkama solüsyonu eklendi ve 8000 g'de 3 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası tüpteki sıvı atıldı ve filtreye 500 µl 2. yıkama solüsyonu eklenerek 8000 g'de 3 dakika santrifüjlendi.
8. Tekrar tüpteki sıvıyı atıldı ve filtreli tüpün üzerine tekrar 300 µl 2. yıkama solüsyonu eklendi ve 13000 g'de 3 dakika santrifüj edildi.
9. Filtreler steril ependorf tüplere alındı ve 100 µl elüsyon buffer eklenerek 8000 g'de 2 dakika santrifüjlendi.
10. Elüsyon buffer da çözünmüş RNA örnekleri - 80 °C'de saklandı.

Heterosiklik halkalara sahip olan nükleik asitler 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon göstermektedir ve nükleik asitlerin ng/µL veya µg/ml düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda 280 nm'de proteinler absorpsiyon özelliği gösterirler ve bu dalga boyunda ölçülen bir değerdeki artışın A260/A280 oranında azalmaya neden olduğu görülmektedir. Dokularda RNA düzeylerinin saflık dereceleri, 260 ve 280 nm'de yapılan ölçümlerde ortaya çıkan değerler arasındaki oran ile belirlenebilmekte ve dokulardan izole edilen total RNA örnekleri için bu oranın 1,8 - 2,00 arasında olması gerektiği bilinmektedir. Bu yüzden örneklerin RNA saflık derecesi belirlenebilmesi için UV microdrop spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında ki absorbansları ölçüldü ve bu

ölçüm için örnekler μ Drop™ Plate'te (Cat No:12391) 2 μ L yükleme yapılarak okundu. Ölçümden sonra Total RNA (ng/ μ L) 260 nm'deki absorbans x 40 x Dilüsyon Faktörü formülüne göre hesaplandı.

3.2.5. RT-PCR ile cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması

Araştırılan genler etkilerini mRNA sentezi ile ortaya çıkarırlar. RNAz enzimlerinin aktivitesi ile çok çabuk parçalandıklarından, mRNA'lar ile laboratuvar şartlarında çalışılması oldukça zordur. Bu yüzden araştırmalarda, mRNA örnekleri mRNA'nın DNA karşılığı olan cDNA'ya çevrilerek kullanılır. Numunelerden elde edilen RNA'ları kullanarak Transcriptor High Fidelity cDNA Synthese kiti (Roche, Version 06, 04 896 866 001) ile Light Cycler Nano Real Time PCR cihazında cDNA'lar elde edildi.

Analiz prosedürü:

1. Bütün kimyasallar kullanılmadan önce hafifçe santrifüj edildi.
2. 0,2 ml'lik PCR tüplerine 1 μ L Random Hekzamer Primer (600 μ M), 1 μ L Oligo (dT) 18, 2 μ L ddH₂O'li su eklendi.
3. Toplam hacmi 13 μ L'ye tamamlamak için üzerine total RNA'dan 9 μ L eklenerek 65 °C'de 10 dakika qRT-PCR cihazında inkübe edildi ve ardından 2 dakika buz üstünde bekletildi.
4. Daha sonra dNTP (10mM) 2 μ L, 5x Reaksiyon Buffer 4 μ L, Protector RNase Inhibitor (40U) 0,5 μ L, Revers Transkriptaz enzim (RT) (20U) 0,5 μ L kullanılarak bir karışım hazırlandı ve tüpte bulunan 13 μ L üzerine toplam hacim 20 μ L olacak şekilde eklendi.
5. Ardından yavaşça pipetaj yapıldı.
6. Daha sonra qRT-PCR, 25 °C'de 10 dakika, 55 °C'de 60 dakika, 85 °C'de 5 dakika olacak şekilde programlandı ve elde edilen cDNA'lar 4 °C'de saklandı.
7. Böylece cDNA kütüphanesi oluşturuldu ve örnekler çalışılncaya kadar -20 °C'de stoklandı.

3.2.6. Real Time PCR Uygulamaları

Elde edilen cDNA'lar kullanılarak, kas ve karaciğer dokularında büyüme faktör genlerinin ekspresyon düzeyindeki değişimleri LightCycler SYBR Green kiti (Roche, Cat. No. 04707516001) ile Light Cycler Nano Real Time PCR cihazında analiz edildi ve sonuçlar kantitatif olarak değerlendirildi.

H₂O, PCR Primer (100x), master mix (8x) ve cDNA karışımı hazırlandı (Tablo 4). PCR ürünleri Tablo 5'teki prosedüre uygun olarak qRT-PCR kullanılarak elde edildi. Balık fishGHR, fishIGF-1, fishIGF-2 geninin ekspresyon analizinde kantifikasyon yapabilmek için referans gen olarak fish β -actin geni seçildi.

Tablo 5. PCR karışımı.

	Konsantrasyon	Hacim
H ₂ O	-	6 µl
PCR Primer (100x)	100x	1 µl
Master Mix (2x)	2x	10 µl
cDNA	-	3 µl

Tablo 6. Real Time PCR döngü koşulları.

Sıcaklık (°C)	Ramp Oranı (°C/s)	Süre (sn)
Hold		
95	5	600
3-Adım Amplifikasyon		
95	5	5
60	4	10
72	4	15
Erim		
60	4	20
95	0,1	1

3.2.7. Gen Ekspresyonu Hesaplamaları

Genlerin mRNA seviyeleri her bir örnek için β -actin ile standartize edilerek $2^{-\Delta\Delta Ct}$ matematiksel modeline göre hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001).

$$\Delta\Delta Ct = (\text{Hedef Gen Ct} - \beta\text{-actin Ct})_{\text{Muamele}} - (\text{Hedef Gen Ct} - \beta\text{-actin Ct})_{\text{Kontrol}}$$

3.2.8. İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel analiz ve hesaplamaları için MS-Excel 2010 ve “SPSS for Windows Version 22.0” (SPSS Inc., Chicago, IL., USA) paket programları kullanıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile belirlendi. Tüm parametreler için tanımlayıcı ifadelerde ortalama ve standart hata kullanıldı.

Gruplar arasındaki istatistiki değerlendirmeler tek yön varyans analizi One-Way ANOVA uygulanarak yapıldı, post hoc test olarak Tukey testi kullanıldı. Elde edilen veriler

$p < 0.001$ (% 95) hipotezini sağlayacak şekilde test edildi. Stres parametreleri arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığına Pearson Korelasyon katsayısı ile bakıldı.



4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Analizler

Ergin ve yavru *Oncorhynchus mykiss* 'in farklı mevsim sıcaklığında kan glikoz, kortizol ve büyüme hormonu değerlerine ait veriler Tablo 6'da verildi. Bu veriler arasındaki korelasyon düzeyleri ise Tablo 7'de gösterildi.

Tablo 7. Ergin ve yavru *Oncorhynchus mykiss* 'in farklı mevsim sıcaklığında serum glikoz, kortizol ve büyüme hormon düzeyleri (X±SE).

	Ocak Dönemi Ergin Alabalık (n=10)	Ocak Dönemi Yavru Alabalık (n=10)	Temmuz Dönemi Ergin Alabalık (n=10)	Temmuz Dönemi Yavru Alabalık (n=10)
Glikoz (mg/dl)	35.8±4.6 ^{ab}	23.3±1.4 ^b	43.7±6.1 ^a	33.2±4.3 ^{ab}
Kortizol (ng/ml)	23.4±3.4	23.04±2.8	24.1±2.9	29.8±4.1
Büyüme Hormonu (pg/ml)	1086.5±54.1 ^b	1054±55.8 ^b	1465.1±151.4 ^{ab}	1629.7±281.4 ^a

a,b: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0,001).

Tablo 8. Serum glikoz, kortizol ve büyüme hormon düzeylerinin korelasyon düzeyleri.

		Kortizol Hormonu	Büyüme Hormonu	Glikoz
Kortizol Hormonu	Pearson Correlation	1	-,005	,316
	Sig. (2-tailed)		,976	,054*
	N	40	40	40
Büyüme Hormonu	Pearson Correlation	-,005	1	,212
	Sig. (2-tailed)	,976		,201
	N	40	40	40
Glikoz	Pearson Correlation	,316	,212	1
	Sig. (2-tailed)	,054*	,201	
	N	40	40	40

* Glikoz ile kortizol arasında $p=0,05$ düzeyinde pozitif korelasyon bulundu.

4.1.1. Serum Glikoz Düzeyleri

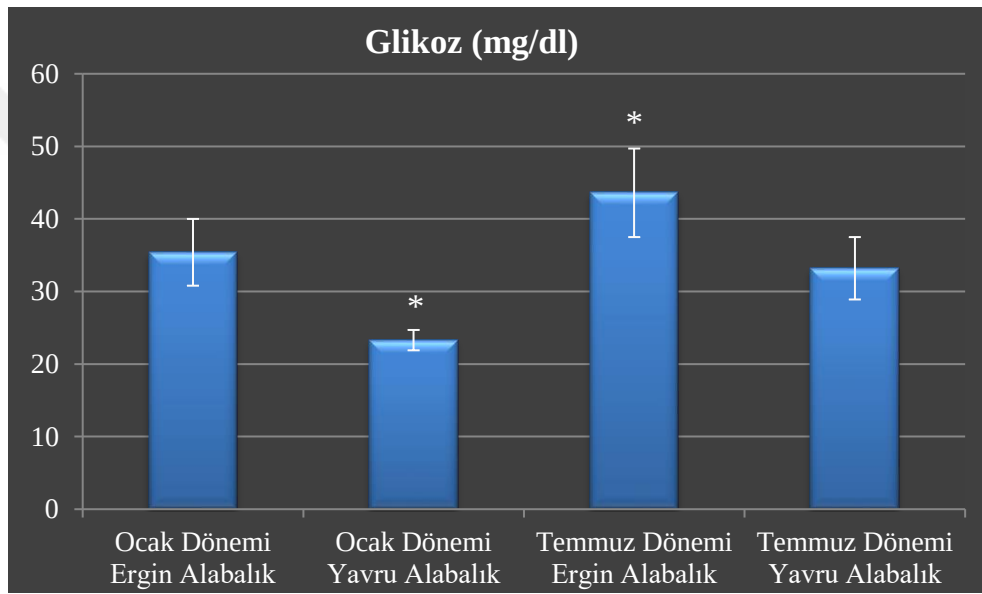
Çalışmaya dahil edilen gruplardaki alabalıklara ait serum glikoz değerleri Şekil 14’de grafiksel olarak gösterildi.

Serum glikoz düzeyleri ocak dönemi ergin alabalık grubunda $35,8 \pm 4,6$ mg/dl, ocak dönemi yavru alabalık grubunda $23,3 \pm 1,4$ mg/dl, temmuz dönemi ergin alabalık grubunda $43,7 \pm 6,1$ mg/dl, temmuz dönemi yavru alabalık grubunda $33,2 \pm 4,3$ mg/dl olarak bulundu.

En yüksek serum glikoz düzeyine sahip temmuz dönemi ergin alabalık grubu ile ocak dönemi yavru alabalık grubu serum glikoz düzeyleri arasında istatistiksel bir fark gözlemlenirken ($p < 0,001$), diğer gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

Yaşa bağılı temmuz ve ocak dönemleri ergin ve yavru alabalık grupları arasında serum glikoz düzeyleri karşılaştırıldığında, temmuz ve ocak dönemleri ergin alabalık gruplarının serum glikoz düzeylerinin yavru alabalık gruplarına göre yüksek olduğu ancak istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.

Ergin ve yavru alabalık gruplarının farklı mevsim sıcaklığına bağılı olarak temmuz ve ocak dönemlerinde serum glikoz düzeyleri karşılaştırıldığında; temmuz dönemi ergin ve yavru alabalık gruplarının serum glikoz düzeylerinin, ocak dönemi ergin ve yavru alabalık gruplarına göre yüksek olduğu ancak gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi.



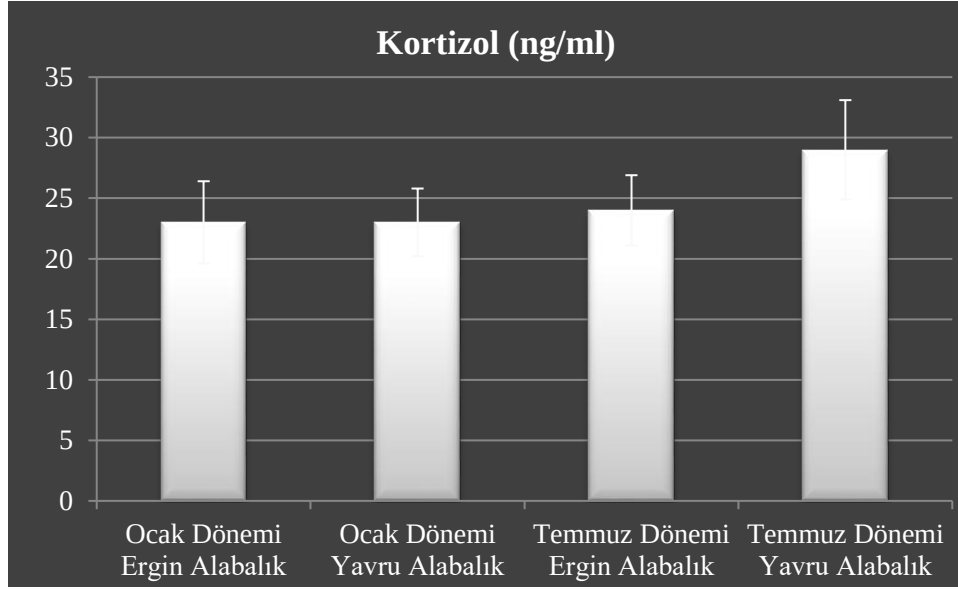
Şekil 14. Serum glikoz düzeylerine ait grafik (*p<0,001).

4.1.2. Serum Kortizol Hormon Düzeyleri

Çalışmaya dahil edilen gruplardaki alabalıklara ait serum kortizol değerleri Şekil 15’de grafiksel olarak gösterildi.

Serum kortizol düzeyleri ocak dönemi ergin alabalık grubunda $23,4 \pm 3,4$ ng/ml, ocak dönemi yavru alabalık grubunda $23,04 \pm 2,8$ ng/ml, temmuz dönemi ergin alabalık grubunda $24,1 \pm 2,9$ ng/ml, temmuz dönemi yavru alabalık grubunda $29,8 \pm 4,1$ ng/ml olarak bulundu.

Özellikle temmuz dönemi yavru alabalık grubuna ait serum kortizol düzeylerinin diğer gruplarla karşılaştırıldığında yüksek düzeyde olduğu ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.



Şekil 15. Serum kortizol hormon düzeylerine ait grafik.

4.1.3. Serum Büyüme Hormon Düzeyleri

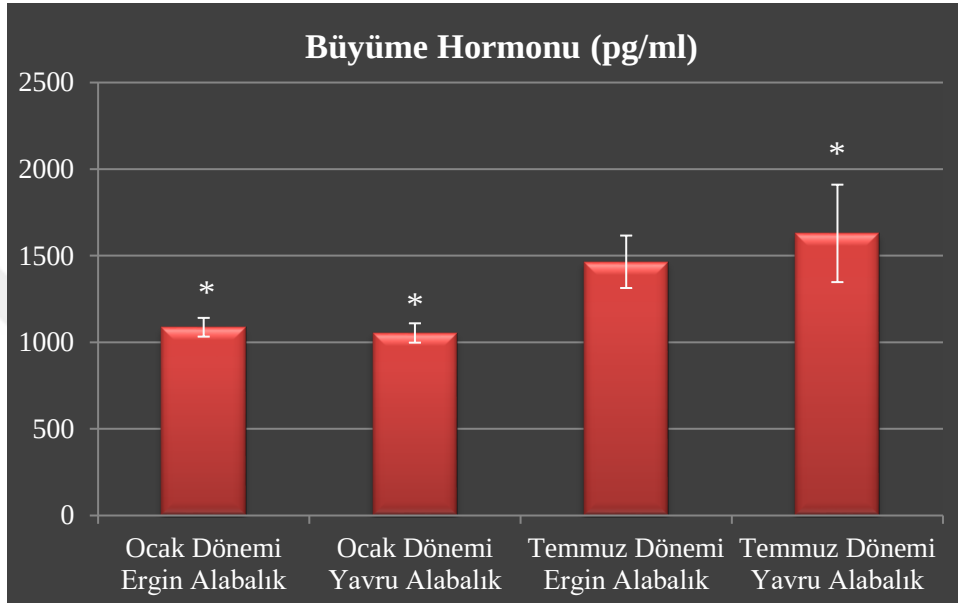
Çalışmaya dahil edilen gruptaki alabalıklara ait serum büyüme hormon değerleri Şekil 16’da grafiksel olarak gösterildi.

Serum büyüme hormon düzeyleri ocak dönemi ergin alabalık grubunda $1086,5 \pm 54,1$ pg/ml, ocak dönemi yavru alabalık grubunda $1054 \pm 55,8$ pg/ml, temmuz dönemi ergin alabalık grubunda $1465,1 \pm 151,4$ pg/ml, temmuz dönemi yavru alabalık grubunda $1629,7 \pm 281,4$ pg/ml olarak bulundu.

En yüksek serum büyüme hormon düzeylerinin, temmuz dönemi yavru ve ergin alabalık grubunda görüldüğü tespit edildi. Aynı zamanda temmuz dönemi yavru alabalık grubunun serum büyüme hormon düzeylerinin, ocak dönemi yavru alabalık ve ocak dönemi ergin alabalık gruplarına göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlendi ($p < 0,001$).

Farklı mevsim sıcaklığına bağlı olarak temmuz ve ocak dönemlerinde yavru alabalık grupları karşılaştırıldığında, temmuz dönemi yavru alabalık grubunun büyüme hormon düzeylerinin ocak dönemi yavru alabalık grubuna göre yüksek olduğu ve istatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı bir fark olduğu ($p < 0,001$) tespit edildi. Temmuz ve ocak dönemi ergin alabalık grupları karşılaştırıldığında, temmuz dönemi ergin alabalık grubunun büyüme hormon düzeylerinin ocak dönemi ergin alabalık grubuna göre yüksek olduğu ancak istatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı.

Yaşa bağı ocak dönemi ergin ve yavru alabalık grupları arasında serum büyüme hormon düzeyleri karşılaştırıldığında, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. Ergin ve yavru alabalık gruplarının temmuz dönemi serum büyüme hormon düzeyleri karşılaştırıldığında, yavru alabalık grubunun büyüme hormon düzeylerinin en yüksek düzeyde olduğu ancak ergin alabalık grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi.



Şekil 16. Serum büyüme hormon düzeylerine ait grafik (*p<0,001).

4.2. Gökkuşluğu Alabalığı Karaciğer ve Kas Dokusu GHR, IGF-1 ve IGF-2 Ekspresyon Düzeyleri

4.2.1. Karaciğer ve Kas Dokusu GHR Ekspresyon Düzeyleri

Ergin ve yavru *Oncorhynchus mykiss*'in farklı mevsim sıcaklığında karaciğer ve kas doku GHR Ct düzeyleri Tablo 8'de verildi.

Çalışmada GHR geninin mRNA ekspresyonunun kantifikasyonu Light Cycler Real Time cihazıyla yapıldı. Referans gen olan β -actin'e göre GHR geninin ekspresyonu Ct değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri hesaplandı.

Elde edilen sonuçlar gruplar arasında değerlendirildiğinde ortalamalar birbirlerine oranlanarak ekspresyon sayılarındaki fark, kat artışı olarak hesaplandı. Çalışmadaki tüm alabalık gruplarına ait GHR ekspresyon değerleri Şekil 17'de grafiksel olarak gösterildi.

Tablo 9. Ergin ve yavru *Oncorhynchus mykiss* 'in farklı mevsim sıcaklığında karaciğer ve kas dokusunda GHR ortalama Ct değerleri.

GHR Ortalama Ct değerleri				
<u>Grup</u>	<u>Karaciğer Dokusu</u> <u>(ΔCt)</u>	<u>Fold</u> <u>Regülasyon</u> <u>($2^{-\Delta\Delta Ct}$)</u>	<u>Kas Dokusu</u> <u>(ΔCt)</u>	<u>Fold</u> <u>Regülasyon</u> <u>($2^{-\Delta\Delta Ct}$)</u>
Ocak dönemi Ergin Alabalık	1,27E-02	- 1,23	2,92E-03	- 11,36 *
Ocak dönemi Yavru Alabalık	1,56E-02		3,29E-02	
Temmuz dönemi Ergin Alabalık	5,42E-03	- 4,87 *	4,95E-03	+ 1,20
Temmuz dönemi Yavru Alabalık	2,64E-02		4,11E-03	
Temmuz dönemi Yavru Alabalık	2,64E-02	+ 5,91 ^	4,11E-03	- 8,00 ^
Ocak dönemi Yavru Alabalık	1,56E-02		3,29E-02	
Temmuz dönemi Ergin Alabalık	5,42E-03	- 2,34 ^	4,95E-03	+ 5,90 ^
Ocak dönemi Ergin Alabalık	1,27E-02		2,92E-03	

Aynı sütundaki (- ve *) işaretli olan değerler ergin alabalıkların yavru alabalıklara göre down regüle miktarı.

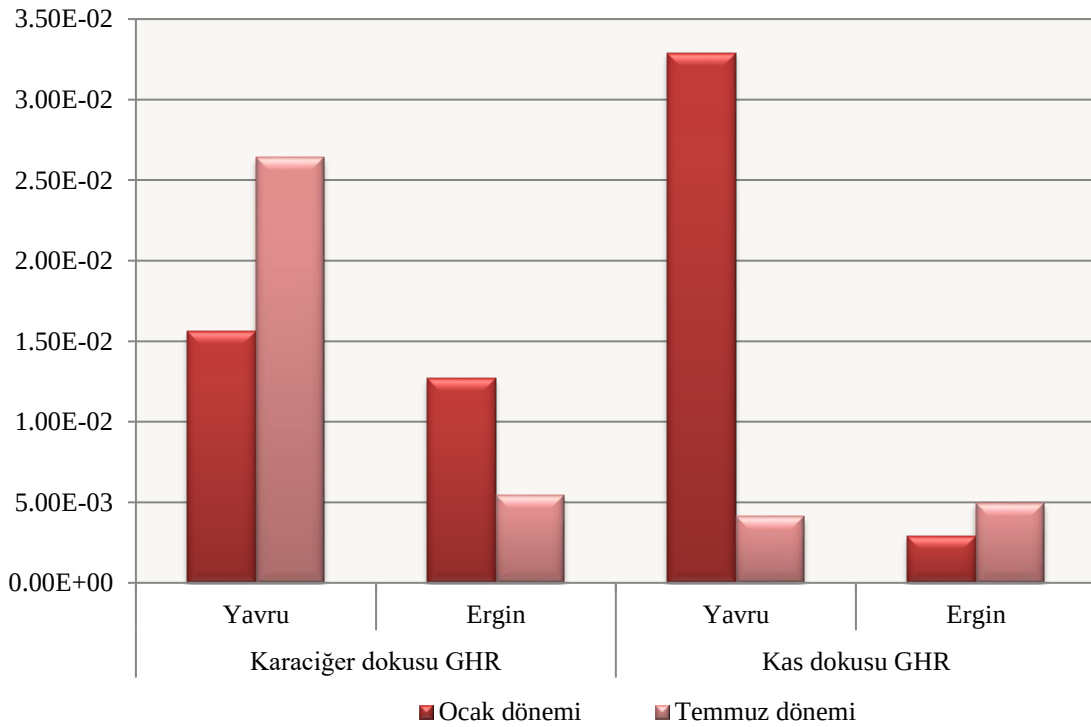
Aynı sütundaki (+ ve ^) işaretli olan değerler temmuz döneminin ocak dönemine göre up regüle miktarı.

Aynı sütundaki (- ve ^) işaretli olan değerler temmuz döneminin ocak dönemine göre down regüle miktarı.

Çalışma sonucunda; ocak dönemi karaciğer dokusunda yaşa bağlı GHR ekspresyonunun, yavru ve ergin alabalıklar arasında bir fark olmadığı; temmuz döneminde

ise, yavru alabalıklarda ergin alabalıklara göre ~ 5 kat daha fazla eksprese olduğu görüldü. Kas dokusunda ise ocak dönemi GHR ekspresyonunun, yavru alabalıklarda ergin alabalıklara göre ~ 11 kat daha fazla eksprese olduğu; temmuz döneminde ise ergin ve yavru alabalıklar arasında fark olmadığı belirlendi (Tablo 8, Şekil 17).

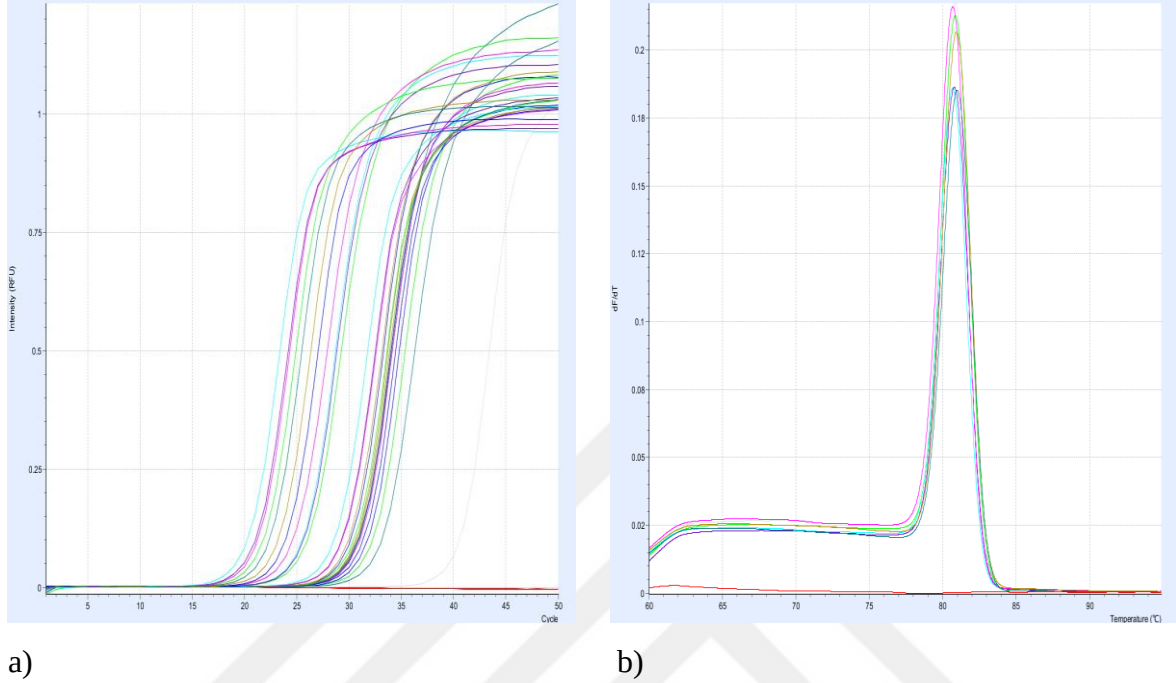
Farklı mevsim sıcaklığında yavru alabalık grupları karşılaştırıldığında, temmuz dönemi karaciğer dokusunda GHR ekspresyonunun ocak dönemine göre ~ 6 kat daha fazla olduğu, kas dokusunda ise ocak döneminde GHR ekspresyonunun temmuz dönemine göre ~ 8 kat daha fazla eksprese olduğu tespit edildi. Ergin alabalık grupları arasında ise karaciğer dokusunda ocak dönemi GHR ekspresyon düzeylerinin temmuz dönemine göre ~ 2 kat daha fazla eksprese olduğu, kas dokusunda ise temmuz dönemi GHR ekspresyon düzeylerinin ocak dönemine göre ~ 6 kat daha fazla eksprese olduğu belirlendi (Tablo 8, Şekil 17).



Şekil 17. Ergin ve yavru *Oncorhynchus mykiss*'in farklı mevsim sıcaklığında karaciğer ve kas dokusunda GHR gen ekspresyon düzeylerinin grafiksel karşılaştırılması.

Araştırma kapsamında GHR mRNA seviyesinin belirlenmesinde UVP EC3 Imaging System Chemi HR 410 görüntüleme sistemi kullanılarak amplifikasyon görüntüsü elde edildi. Oluşan piklerin treshhold çizgisini kestiği yerler ilk anlamlı artışın olduğu nokta olup, pikler demet halinde yukarı çıkıp 40. döngüden sonra paralel bir düzlemde birleştiği görüldü (Şekil 18a). Ayrıca melting point analizi ile farklı örneklerde aynı gen bölgesinin analiz edilip

edilmediği, eksprese edilen örneklerin saflıkları, girişim yapan maddelerin olup olmadığı ve primer dimeri oluşturup oluşturmadığı tespit edildi. Şekil 18b’de görüldüğü gibi piklerin aynı yerde üst üste çıkmaları örneklerde herhangi bir girişim, primer dimeri olmadığını gösterdi.



Şekil 18. Grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4’e ait GHR’nin qRT-PCR’de elde edilen amplifikasyonunun eş zamanlı ekspresyon görüntüsü (a) ve mRNA ekspresyonunun melting point (Tm) grafiği (b).

4.2.2. Karaciğer ve Kas Dokusu IGF-1 Ekspresyon Düzeyleri

Ergin ve yavru *Oncorhynchus mykiss*’in farklı mevsim sıcaklığında karaciğer ve kas doku IGF-1 Ct düzeyleri Tablo 9’da verildi.

Çalışmada IGF-1 geninin mRNA ekspresyonunun kantifikasyonu Light Cycler Real Time cihazıyla yapıldı. Referans gen olan β -actin’e göre IGF-1 geninin ekspresyonu Ct değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri hesaplandı.

Elde edilen sonuçlar gruplar arasında değerlendirildiğinde ortalamalar birbirlerine oranlanarak ekspresyon sayılarındaki fark, kat artışı olarak hesaplandı. Çalışmadaki tüm alabalık gruplarına ait IGF-1 ekspresyon değerleri Şekil 19’da grafiksek olarak gösterildi.

Tablo 10. Ergin ve yavru *Oncorhynchus mykiss* 'in farklı mevsim sıcaklığında karaciğer ve kas dokusunda IGF-1 ortalama Ct değerleri.

IGF-1 Ortalama Ct değerleri				
<u>Grup</u>	<u>Karaciğer Dokusu</u> <u>(ΔCt)</u>	<u>Fold</u> <u>Regülasyon</u> <u>($2^{-\Delta\Delta Ct}$)</u>	<u>Kas Dokusu</u> <u>(ΔCt)</u>	<u>Fold</u> <u>Regülasyon</u> <u>($2^{-\Delta\Delta Ct}$)</u>
Ocak dönemi Ergin Alabalık	3,39E-03	- 16,94 *	5,27E-02	- 2,14 *
Ocak dönemi Yavru Alabalık	5,69E-02		1,13E-01	
Temmuz dönemi Ergin Alabalık	5,69E-02	- 3,23 *	1,13E-01	+ 2,32 *
Temmuz dönemi Yavru Alabalık	3,84E-02		8,13E-02	
Temmuz dönemi Yavru Alabalık	3,84E-02	- 1,48	8,13E-02	- 1,39
Ocak dönemi Yavru Alabalık	1,19E-02		1,89E-01	
Temmuz dönemi Ergin Alabalık	1,19E-02	+ 2,85 ^	1,89E-01	+ 2,80 ^
Ocak dönemi Ergin Alabalık	3,39E-03		5,27E-02	

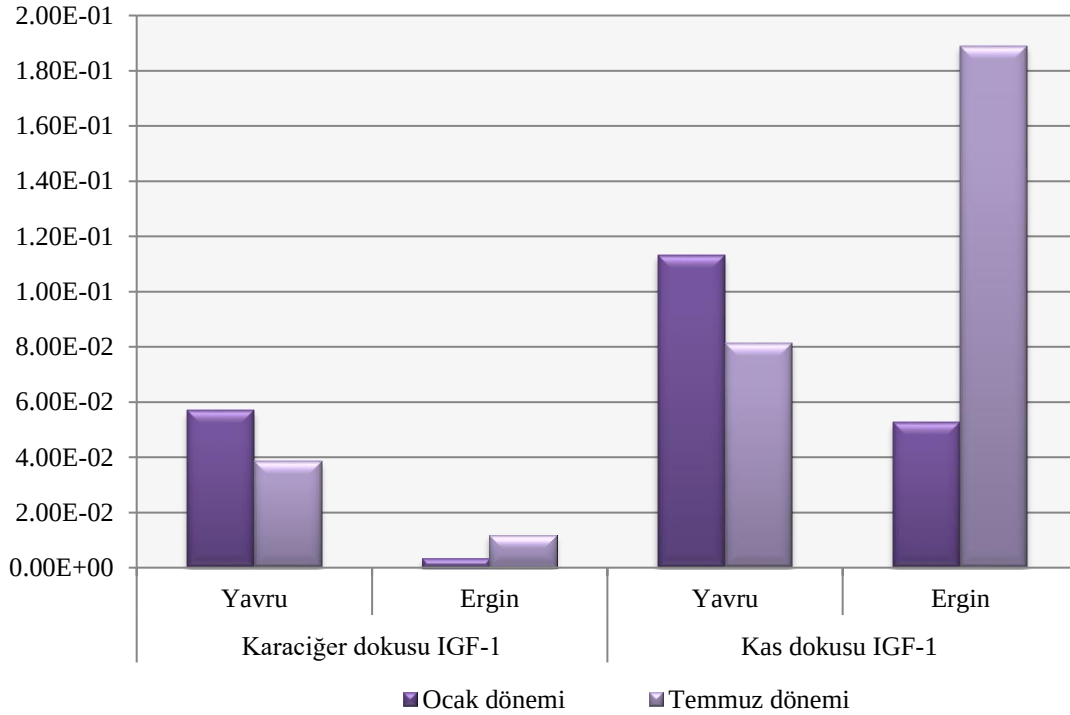
Aynı sütundaki (- ve *) işaretli olan değerler ergin alabalıkların yavru alabalıklara göre down regüle miktarı.

Aynı sütundaki (+ ve *) işaretli olan değerler ergin alabalıkların yavru alabalıklara göre up regüle miktarı.

Aynı sütundaki (+ ve ^) işaretli olan değerler temmuz döneminin ocak dönemine göre up regüle miktarı.

Çalışma sonucunda; ocak dönemi karaciğer dokusunda yaşa bağlı IGF-1 ekspresyonunun, yavru alabalıklarda ergin alabalıklara göre ~ 17 kat; temmuz döneminde ise ~ 3 kat daha fazla eksprese olduğu görüldü. Kas dokusunda ise ocak dönemi yavru alabalıklarda IGF-1 ekspresyonunun ergin balıklara göre ~ 2 kat daha fazla eksprese olduğu, temmuz döneminde ise ergin alabalıklarda yavru alabalıklara göre ~ 2 kat daha fazla eksprese olduğu belirlendi (Tablo 9, Şekil 19).

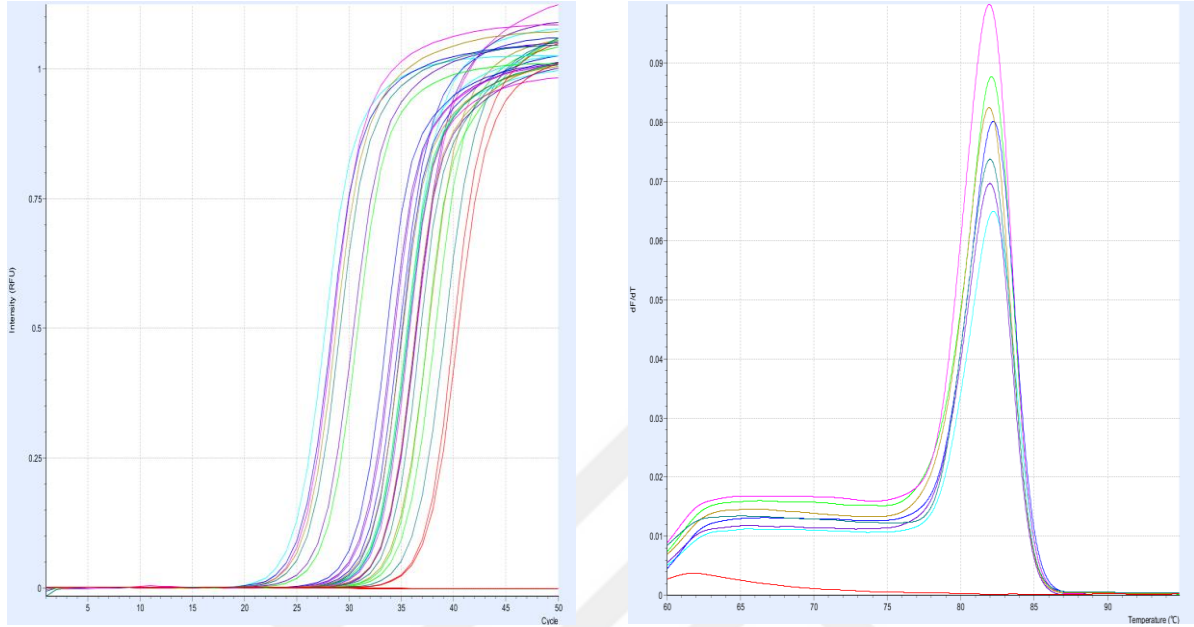
Temmuz ve ocak dönemi yavru alabalık grupları karşılaştırıldığında IGF-1 ekspresyonunun, hem karaciğer hem de kas dokusunda bir fark göstermediği; ergin alabalık grupları arasında ise temmuz dönemi IGF-1 ekspresyon düzeylerinin hem karaciğer hem de kas dokusunda ocak dönemine göre ~ 3 kat daha fazla eksprese olduğu tespit edildi (Tablo 9, Şekil 19).



Şekil 19. Ergin ve yavru *Oncorhynchus mykiss* 'in farklı mevsim sıcaklığında karaciğer ve kas dokusunda IGF-1 gen ekspresyon düzeylerinin grafiksel karşılaştırılması.

Araştırma kapsamında IGF-1 mRNA seviyesinin belirlenmesinde UVP EC3 Imaging System Chemi HR 410 görüntüleme sistemi kullanılarak amplifikasyon görüntüsü elde edildi. Oluşan piklerin treshhold çizgisini kestiği yerler ilk anlamlı artışın olduğu nokta olup, pikler demet halinde yukarı çıkıp 45. döngüden sonra paralel bir düzlemde birleşti (Şekil 20a). Ayrıca melting point analizi ile farklı örneklerde aynı gen bölgesinin analiz edilip edilmediği,

eksprese edilen örneklerin saflıkları, girişim yapan maddelerin olup olmadığı ve primer dimeri oluşturup oluşturmadığı tespit edildi. Şekil 20b’de görüldüğü gibi piklerin aynı yerde üst üste çıkmaları örneklerde herhangi bir girişim, primer dimeri olmadığını göstermektedir.



a)

b)

Şekil 20. Gruplara ait IGF-1’in qRT-PCR’de elde edilen amplifikasyonunun eş zamanlı ekspresyon görüntüsü (a) ve mRNA ekspresyonunun melting point (Tm) grafiği (b).

4.2.3. Karaciğer ve Kas dokusu IGF-2 Ekspresyon Düzeyleri

Ergin ve yavru *Oncorhynchus mykiss*’in farklı mevsim sıcaklığında karaciğer ve kas doku IGF-2 Ct düzeyleri Tablo 10’da verildi.

Çalışmada IGF-2 geninin mRNA ekspresyonunun kantifikasyonu Light Cycler Real Time cihazıyla yapıldı. Referans gen olan β -actin’e göre IGF-2 geninin ekspresyonu Ct değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değeri hesaplandı.

Elde edilen sonuçlar gruplar arasında değerlendirildiğinde ortalamalar birbirlerine oranlanarak ekspresyon sayılarındaki fark, kat artışı olarak hesaplandı. Çalışmadaki tüm alabalık gruplarına ait IGF-2 ekspresyon değerleri Şekil 21’de grafiksel olarak gösterildi.

Tablo 11. Ergin ve yavru *Oncorhynchus mykiss*’in farklı mevsim sıcaklığında karaciğer ve kas dokusunda IGF-2 ortalama Ct değerleri.

IGF-2 Ortalama Ct değerleri				
<u>Grup</u>	<u>Karaciğer Dokusu</u> <u>(ΔCt)</u>	<u>Fold</u> <u>Regülasyon</u> <u>($2^{-\Delta\Delta$Ct)</u>	<u>Kas Dokusu</u> <u>(ΔCt)</u>	<u>Fold</u> <u>Regülasyon</u> <u>($2^{-\Delta\Delta$Ct)</u>
Ocak dönemi Ergin Alabalık	6,03E-03	- 8,13 *	5,32E-04	- 10,98 *
Ocak dönemi Yavru Alabalık	4,90E-02		5,79E-03	
Temmuz dönemi Ergin Alabalık	2,87E-03	- 7,63 *	2,35E-03	+ 1,26
Temmuz dönemi Yavru Alabalık	2,18E-02		1,87E-03	
Temmuz dönemi Yavru Alabalık	2,18E-02	- 2,25 ^	1,87E-03	- 3,10 ^
Ocak dönemi Yavru Alabalık	4,90E-02		5,79E-03	
Temmuz dönemi Ergin Alabalık	2,87E-03	- 2,10 ^	2,35E-03	+ 2,26 ^
Ocak dönemi Ergin Alabalık	6,03E-03		5,32E-04	

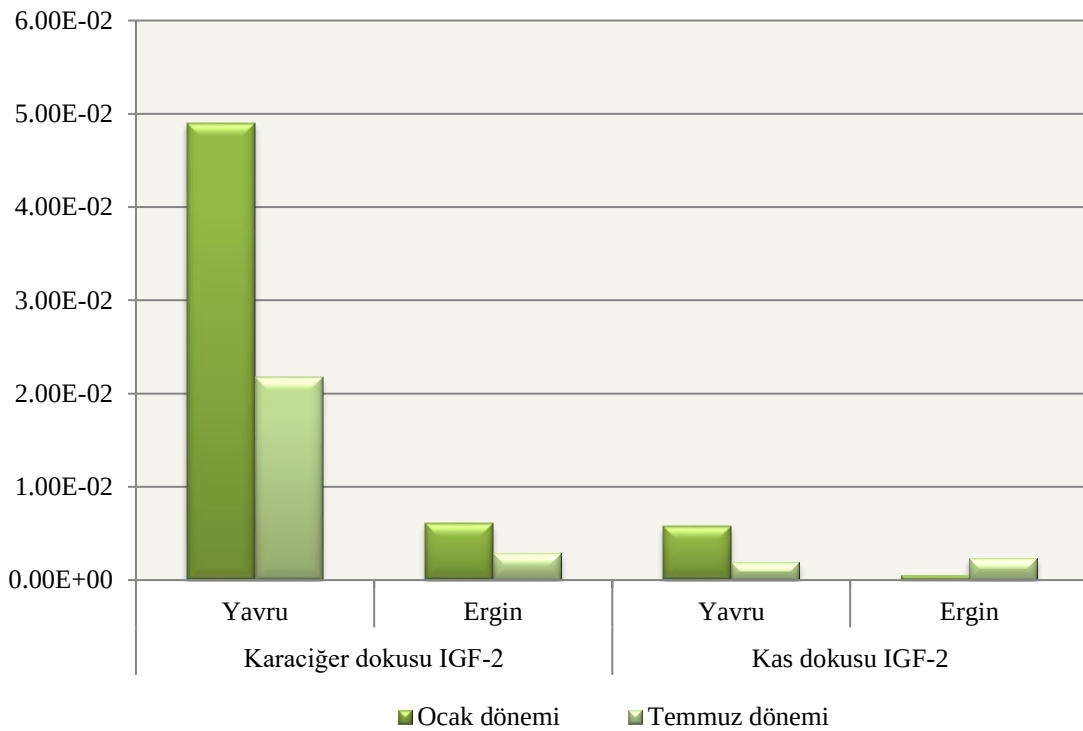
Aynı sütundaki (- ve *) işaretli olan değerler ergin alabalıkların yavru alabalıklara göre down regüle miktarı.

Aynı sütundaki (- ve ^) işaretli olan değerler temmuz döneminin ocak dönemine göre down regüle miktarı.

Aynı sütundaki (+ ve ^) işaretli olan değerler temmuz döneminin ocak dönemine göre up regüle miktarı.

Çalışma sonucunda; ocak dönemi karaciğer dokusunda yaşa bağlı IGF-2 ekspresyonunun, yavru alabalıklarda ergin alabalıklara göre ~ 8 kat; temmuz döneminde ise ~ 8 kat daha fazla eksprese olduğu tespit edildi. Kas dokusunda ise ocak dönemi IGF-2 ekspresyonunun, yavru alabalıklarda ergin alabalıklara göre ~ 11 kat daha fazla eksprese olduğu; temmuz döneminde ise, ergin ve yavru alabalıklar arasında fark olmadığı belirlendi (Tablo 10, Şekil 21).

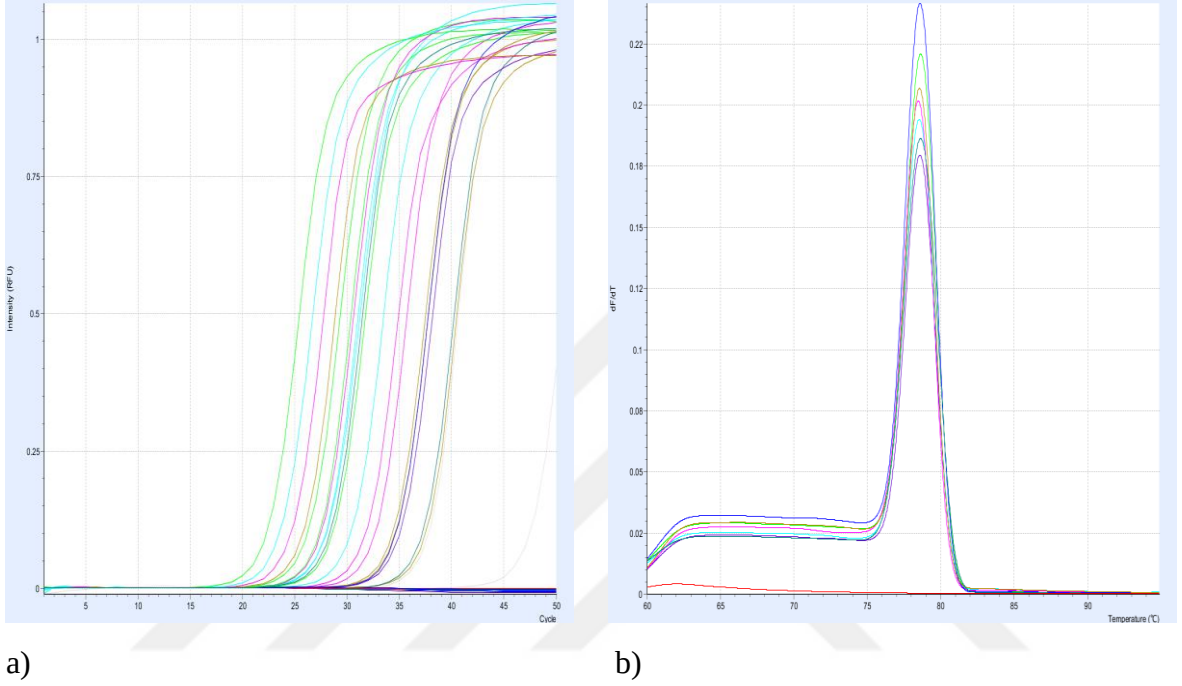
Farklı mevsim sıcaklığında yavru alabalık grupları karşılaştırıldığında, ocak dönemi karaciğer ve kas dokusunda IGF-2 ekspresyonunun temmuz dönemine göre ~ 3 kat daha fazla olduğu görüldü. Ergin alabalık grupları arasında ise karaciğer dokusunda ocak dönemi IGF-2 ekspresyon düzeylerinin temmuz dönemine göre ~ 2 kat daha fazla eksprese olduğu, kas dokusunda ise temmuz dönemi IGF-2 ekspresyon düzeylerinin ocak dönemine göre ~ 2 kat daha fazla eksprese olduğu belirlendi (Tablo 10, Şekil 21).



Şekil 21. Ergin ve yavru *Oncorhynchus mykiss*'in farklı mevsim sıcaklığında karaciğer ve kas dokusunda IGF-2 gen ekspresyon düzeylerinin grafiksel karşılaştırılması.

Araştırma kapsamında IGF-2 mRNA seviyesinin belirlenmesinde UVP EC3 Imaging System Chemi HR 410 görüntüleme sistemi kullanılarak amplifikasyon görüntüsü elde edildi. Oluşan piklerin threshold çizgisini kestiği yerler ilk anlamlı artışın olduğu nokta olup, pikler demet halinde yukarı çıkıp 45. döngüden sonra paralel bir düzlemde birleştiği gözlemlendi (Şekil

22a). Ayrıca melting point analizi ile farklı örneklerde aynı gen bölgesinin analiz edilip edilmediği, eksprese edilen örneklerin saflıkları, girişim yapan maddelerin olup olmadığı ve primer dimeri oluşturup oluşturmadığı tespit edildi. Şekil 22b’de görüldüğü gibi piklerin aynı yerde üst üste çıkmaları örneklerde herhangi bir girişim, primer dimeri olmadığını göstermektedir.



Şekil 22. Grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4’e ait IGF-2’nin qRT-PCR’de elde edilen amplifikasyonunun eş zamanlı ekspresyon görüntüsü (a) ve mRNA ekspresyonunun melting point (Tm) grafiği (b).

5. TARTIŞMA

Balıklar, vücut ısılarını ortamdaki su sıcaklığına göre ayarlayan ektotermik omurgalılarıdır. Ortamın sıcaklığı değişince vücut ısıları sıklıkla değişime uğramaktadır ve sıcaklık dalgalanmalarıyla başa çıkabilmek için kendilerine özgü davranışsal ve fizyolojik adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir (Akhtar ve ark, 2013). Larval dönemden ergin döneme kadar yaşamsal birçok süreç su sıcaklığın etkisi altında gerçekleşmektedir (Pankhurst ve King, 2010).

Ektotermik canlıların yaşadığı çevresel sıcaklık aralığı, hayatta kalma, büyüme ve üreme üzerinde büyük bir etkiye sahipken, optimum sıcaklık aralığında yetiştirilen balık türlerinin çoğunda biyokimyasal reaksiyon hızları, sıcaklıktaki her 10 °C'lik artışta artmaktadır. Sıcaklıktaki küçük bir artışın büyüme ve gelişmeyi olumlu etkilediği (Wootton, 2011) ve bu etkinin mitokondrinin moleküler yapısının sıcaklık değişimlerine verdiği tepkiden kaynaklandığı öne sürülmektedir (O'Brien, 2011). Sıcaklığın mitokondriyal aktiviteyi düzenleyerek metabolik hızı artırdığı ve daha hızlı büyüme oranına neden olduğu, bunu da sitokrom-c oksidaz ve sitrat sentetaz enzimlerinin aktivitelerini düzenleyerek gerçekleştirdiği belirtilmiştir (O'Brien, 2011). Artan sıcaklıkların, substrat oksidasyonu ve ADP fosforilasyonu için mitokondriyal kapasiteyi artırarak balık gibi ektotermik canlıları etkilediği ve yüksek sıcaklıkların mitokondriyal aktiviteyi artırırken, düşük sıcaklıkların ise azalttığı görülmüştür. Artan sıcaklıklarla birlikte mitokondriyal aktivitenin artmasının organizmanın metabolik aktivitelerini hızlandırdığı belirtilmiştir (Portner, 2001).

Sıcaklık, metabolizmayı etkileyerek balıklarının büyüme oranını ve yem dönüşümünü etkilemektedir. Büyüme, gıda alımı, besin kullanılabilirliği ve migrasyon gibi yaşamsal faaliyetler optimum sıcaklıklarda gerçekleşirken, büyüme hızı, metabolizma ve sağ kalım ile optimum sıcaklık arasında yakın bir ilişki olduğu görülmüştür (Wootton, 2011). Optimum aralıktaki su sıcaklığındaki artışlar, metabolik aktiviteyi artırarak balıklarda büyüme oranlarını yükseltirken, düşük sıcaklıklar genellikle performansı azaltmaktadır. Gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) yapılan çalışmalarda, yaz mevsiminde artan sıcaklıkla birlikte büyüme oranlarının arttığı gözlenirken, farklı yetiştirme sıcaklıklarına maruz bırakılmış gökkuşığı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) düşük sıcaklığın büyüme oranlarını düşürdüğü bildirilmiştir (Taylor ve ark, 2008).

Büyüme hızı ve sıcaklık ilişkisinin altında yatan düzenleyici mekanizmaların metabolik işlemlerin enzimatik modülasyonu ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Wootton, 2011).

Yüksek su sıcaklığında glikolitik, glukoneojenik ve lipojenik aktivitelerin değiştiği ve 25 °C'de glikolitik aktivitenin, yem etkinliğinin ve protein verimliliğinin 18 °C'de yetiştirilen balıklara göre daha yüksek olduğu ifade edilmiştir (Enes ve ark, 2008; 2016). Ergin gökkuşağı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) yavru alabalıklara kıyasla yüksek sıcaklıklardan daha çok etkilendiği ve sıcaklıktaki artışın sudaki oksijen çözünürlüğü azaltarak büyüme oranlarını azalttığı görülmüştür (Rodnick ve ark, 2004). Yetiştirme sıcaklığındaki artışın ergin mersin balıklarında (*Huso huso*) kırmızı kan hücresi (Zarejabad ve ark, 2010) ve hemoglobin düzeyi gibi bazı hematolojik parametreleri artırdığı gösterilmiştir (Carvalho ve Fernandes, 2006). Hatta son yıllarda yapılan araştırmalarda, sıcaklığın dokuların kimyasal bileşimini (Barbosa ve ark, 2017), antioksidan durumunu (Mauvault ve ark, 2017) ve gonadal gelişimini de (Arfuso ve ark, 2017) etkilediği rapor edilmiştir.

Termal toleransın üstünde veya altındaki sıcaklıklara maruz kalmak, fizyolojik süreci tehlikeye atabilecek bir stres etkisi yaratır. Mevsimsel değişiklikler, su sıcaklığı ve gün içinde değişen ani sıcaklıklar, balıklarda potansiyel bir stres oluşturmaktadır. Metabolizmadaki anabolik reaksiyonların ve stres ile ilgili artan enerji taleplerinin üstesinden gelebilmek için enerji substratları kullanılmaktadır. Bu yüzden, en uygun sıcaklıklara uyum sağlayabilmek ve metabolizma için gerekli olan enerji ihtiyacını karşılayabilmek için davranışsal ve metabolik tepkiler ortaya çıkmaktadır (Lazaro-Côté ve ark, 2018).

Glikoz, hücre metabolizması için temel enerji kaynağıdır. Balıklarda, glikozun yumurta döllenmesinden sonra glikojen rezervlerinden üretilerek hücre bölünmesi için katabolize edilen ilk besin maddesi olduğu bilinmektedir. Glikoz, enerji substratı olarak özellikle yavru balıklarda metabolik yolların ve metabolik fonksiyonların aktivasyonunu artırmaktadır (Fang ve ark, 2014). Metabolik olarak glikoz homeostazı, birden fazla hormon tarafından düzenlenir. Organizmada beslenmeden birkaç saat sonra serum glikoz düzeyleri artmakta ve glikojen depoları için pankreastan insülin hormonu salgılanmaktadır. Buna karşılık, serum glikoz düzeyleri azaldığında pankreastan glukagon hormonu salgılanarak glikojen depoları yıkıma uğramakta ve glikozlar hücrelerde serbest hale geçmektedir (Pierce ve ark, 2010). Sıcaklığın pankreas hormonları üzerindeki etkisinin beslenme ve metabolik durum ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) beslenme sonrası 8 °C'deki plazma insülin seviyelerinin 18 °C'dekine göre düşük olduğu ve bunun sebebinin düşük sıcaklıkta düşük gıda alımı ve düşük insülin sekresyonunun uyarılması ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (Capilla ve ark, 2003). Serum glikoz seviyelerinin 36 °C'de 21 °C'de ki gruba göre yüksek olduğu ve buna paralel olarak karaciğer ve kas dokularındaki glikojen depolarının önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Yüksek sıcaklıklarda artan enerji

ihtiyacını karşılayabilmek için kas ve karaciğer dokularındaki glikojen depolarının yıkıldığı ve serbest hale geçen glikozların dolaşımdaki düzeylerinin arttığı görülmüştür (Rishikesh ve ark, 2017).

Mevsimsel sıcaklık ve su sıcaklığı, yüksek gıda alımı ile birlikte balıklarda metabolik aktiviteyi düzenlemektedir. Ergin iskorpit balıklarında (*Scorpaena porcus*) kış döneminde glikoz düzeylerinin yaz dönemine göre düşük olduğu ve kış döneminde serum glikoz düzeylerinde görülen azalmanın, düşük sıcaklıkta metabolizmanın yavaşlamasına neden olduğu belirtilmiştir (Çelik, 2005). 26 °C'de yetiştirilen dil balıklarında (*Solea senegalensis*) serum glikoz düzeylerinin 19 °C'de yetiştirilenlere göre 2 kat yüksek olduğu ve yüksek sıcaklıklarda artan gıda alımı ile birlikte büyüme oranlarının düşük sıcaklıktakilere göre anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir (Costas ve ark, 2012). Su sıcaklığının arttığı ağustos döneminde serum glikoz düzeylerinin maksimum seviyeye ulaştığı ve en düşük düzeylerin ocak döneminde olduğu gösterilmiştir. Su sıcaklığındaki artışın, özellikle kirli olan bölgelerde balık için stres yaratabilecek olumsuz şartları daha da arttırarak kas aktivitesinin artmasına neden olduğu ve glikojen kullanımına bağlı olarak serum glikoz düzeylerini arttırdığı belirtilmiştir (Cengizler ve Şahan, 2000). Aynı zamanda serum glikoz düzeylerinin yaşa göre değişkenlik gösterdiği görülmektedir. Farklı mevsim sıcaklığına bağlı olarak ergin balıklarda serum glikoz düzeylerinin yaz döneminde kış dönemine göre yüksek olduğu; yavru balıklarda ise yaz ve kış dönemlerinde serum glikoz düzeyleri arasında bir fark gözlenmediği bildirilmiştir (Breau ve ark, 2011). Araştırmacılar hem yaz hem de kış dönemlerinde ergin balıklarda serum glikoz düzeylerinin yavru balıklara göre daha yüksek olduğunu; sıcaklık artışı ile birlikte vücut ağırlığına bağlı olarak besin alımının arttığı, bunun da metabolik aktiviteyi etkileyerek metabolizma hızının artışına ve serum glikoz düzeylerinin yükselmesine neden olduğu rapor edilmiştir.

Yapılan çalışmada hem ergin hem de yavru gökkuşağı alabalıklarında ocak ve temmuz dönemleri arasında serum glikoz düzeylerinde farklılık tespit edildi. En yüksek serum glikoz düzeyine sahip temmuz dönemi ergin alabalık grubu glikoz düzeyleri ile ocak dönemi yavru alabalık grubu glikoz düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p<0.001$). Temmuz döneminde yüksek sıcaklığa maruz kalan gökkuşağı alabalıklarında serum glikoz seviyelerinin düşük sıcaklıktakilere göre artışının; yüksek sıcaklıkta oluşan stresle mücadelede enerji ihtiyacının artması sonucunda karaciğer ve kas dokularındaki glikojen depolarının glikozları serbest hale getirmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Mevsim değişikliğine bağlı sıcaklık artışının, ergin alabalıklarda besin ihtiyacını arttırabileceği ve böylece karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasında rol oynayan enzim

aktivitelerini değiştirebileceği öngörülmektedir (Enes ve ark, 2008). Özellikle sıcaklık artışının metabolik hızı arttırarak glukoneojenik ve glikolitik enzimlerin aktivitelerini düzenlediği ve mevcut enerji ihtiyacını karşılayabilmek için dolaşımda glikoz seviyelerini arttırdığı tahmin edilmektedir (Vargas ve ark, 2009a). Aynı zamanda yaşa bağlı olarak ergin gökkuşağı alabalık gruplarında serum glikoz düzeylerinin hem temmuz hem ocak dönemlerinde yavru alabalık gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yüksek olduğu görülmüşken, sıcaklık artışı ile serum glikoz düzeylerinin arttığını gösteren çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir (Fiess ve ark, 2007; Vargas ve ark, 2009a; Breau ve ark, 2011; Costas ve ark, 2012; Enes ve ark, 2016). Bu çalışmanın glikoz bulguları temmuz dönemi serum glikoz düzeylerinin alabalıklarda sıcaklığın etkisiyle yükseldiğini ve balıkların sıcaklıklardaki değişime bağlı farklı enerji kullanım davranışı gösterebileceğini göstermektedir.

Balıkların stres faktörüne karşı tepkisi, hücresel, bireysel ve popölasyon yapılarına kadar tüm organizasyon seviyelerini etkilemektedir. Balıkların stres tepkisi öncelikle nöroendokrin tepki ile birlikte katekolaminler ve kortizol gibi stres hormonlarının dolaşıma girmesiyle devam etmektedir (Iwama ve ark, 2004). Bu hormon metabolik olarak hipotalamo-hipofiz-interrenal (HPI) eksenin uyarılması ile salgılanmaktadır (Scott ve Ellis, 2007). Stres faktörlerinden büyük ölçüde etkilenen organizmanın biyokimyası ve fizyolojisinde bazı değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişiklikler metabolizmayı, solunumu, asit-baz durumunu, bağışıklığı etkilerken, hematolojik değişikliklerde görülmektedir. Bu süreçte büyüme ve üreme gibi temel yaşam süreçleri için gerekli olan enerji ihtiyacı da artmaktadır (Barton ve ark, 2002; Iwama ve ark, 2004).

Kortizol hormonu organizmada stres olgusuna karşı verilen fizyolojik yanıtın önemli bir göstergesi olarak bilinen ve hemato-immünolojik parametre olan serum glikoz düzeylerini ayarlayan etkenlerden biridir (Vijayan ve ark, 2010). Bu nedenle çalışmamızda olduğu gibi yapılan birçok çalışmada serum kortizol hormonu ve glikoz düzeyleri balıklarda stres indikatörü olarak araştırılmıştır (Wagner ve Congleton, 2004; David ve ark, 2005; Sheriff ve ark, 2011; Shahjahan ve ark, 2017).

Glukokortikoidler enerjinin mobilizasyonunu ve yeniden dağılımını düzenlediğinden, kronik stresin balık gelişimi üzerindeki etkileri genellikle kortizol hormonun etkisine bağlanmışır. Stres sırasında enerji mobilizasyonunun düzenlemesi konusunda kortizol hormonunun rolü, karbonhidratların ve lipidlerin katabolizmasını arttırmaktır. Aynı zamanda kortizol düzeylerinin yükselmesi besin alımını, büyüme hızını ve besin kullanımını olumsuz yönde etkilerken, metabolik süreçlerde karaciğerde glukoneogenezi, glikolizisi ve proteolizisi

arttırmaktır. Bu artışlar büyüme ve gelişim için gerekli olan anabolik yollarda kullanılacak enerjinin, stres koşullarında hücrelerdeki enerji ihtiyacını karşılayabilmek için başka yöne kaymasına neden olmaktadır (Vijayan ve ark, 2010). Kortizolün glukoneojenik kapasiteyi arttırdığı ve akut kortizol uygulamasının plazma glikoz düzeylerinde artışlara neden olduğu gösterilmiştir (Aluru ve Vijayan, 2007). Kortizol, lipaz enzimlerinin aktivitesini artırarak, gliserol kullanımını ve karaciğerin lipojenik potansiyelini azaltarak balıklarda lipit reverzlerini tüketmektedir (Vijayan ve ark, 2010). Sadece karaciğer dokusunda değil aynı zamanda kas dokusunda da kortizol enjeksiyon uygulamasının lipit depolarında azalmaya neden olduğu ve kronik stresli balıklarda lipolitik kapasitenin arttığı gösterilmiştir (Barcellos ve ark, 2012).

Farklı stres faktörlerine (örneğin taşıma, hapsedilme, düşük su kalitesi ve toksik maddeler) tepki olarak plazma kortizol düzeylerinde artış meydana gelir. Bir stres faktörüne maruz kalınması durumunda serum kortizol düzeylerinin 1 saatte en yüksek konsantrasyonlara ulaştığı ve 6 saat sonra bazal seviyelere düştüğü ifade edilmiştir (Davis ve Peterson, 2006). Balıklarda düşük dozda kortizole maruz kalmanın gıda alımını uyardığı, yüksek miktarda kortizole maruz kalmanın sürdürülmesi durumunda ise gıda alımının azaldığı görülmüştür (Peterson ve Small, 2004). Son yıllarda plazma kortizol hormonu ile ilgili üzerinde durulan diğer bir konu da, kan ve ortam suyu arasındaki konsantrasyon farkının bir sonucu olarak ortaya çıkan solungaçlardan steroid çıkışıdır. Organizmada salgılanan kortizol hormonunun hedef dokulara ulaştıktan sonra solungaçlardan ortam suyuna salındığı ve bu yüzden plazma kortizol hormon düzeylerinin azaldığı ileri sürülmüştür (Aerts ve ark, 2015).

Kortizol hormonunun sentezi ve salınımı; yaş, boyut ve ağırlık gibi endojen faktörler ile sıcaklık, beslenme durumu, çözünmüş oksijen miktarı, toksisite ve fotoperiyot gibi eksojen faktörler tarafından düzenlenmektedir (Martinez ve ark, 2009; Myers ve ark, 2010; Barcellos ve ark, 2012; Koakoski ve ark, 2012; Fürtbauer ve Heistermann, 2016). Sıcaklık değişiminin etkileri fizyolojik ve davranışsal değişimlerden balık ölümlerine kadar gidebilmektedir (Tanck ve ark, 2000). Örneğin, balıklar düşük sıcaklıklara uyum sağladığında kalp atış hızları, oksijen tüketimleri ve bazal kortizol konsantrasyonları düşmektedir (Madaro ve ark, 2018). Buna karşılık, optimum aralığın üstündeki sıcaklık değişimlerine maruz kalan balıklarda kortizol konsantrasyonlarının yükselmesiyle stres tepkisi ortaya çıkmaktadır (Jaxion-Harm ve Ladich, 2014). Pasifik somon balıklarının (*Oncorhynchus spp.*), sıcaklık streslerine yanıt olarak daha yüksek serum kortizol düzeylerine sahip olduğu ancak termal tolerans aralığının aşıldığı yüksek sıcaklıklarda yüksek ölüm oranının ortaya çıktığı bildirilmiştir (Donaldson ve ark, 2014). Soğuk mevsimlere göre sıcak mevsimlerde gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*)

serum kortizol düzeylerinde farklılıklar olduğu (Koldkjær ve ark, 2004), ısı şoku uygulanarak akut sıcaklık stresine maruz kalmış gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) serum kortizol düzeylerinde artış olduğu rapor edilmiştir (Le Blanc ve ark, 2012). Gökkuşağı alabalıklarının yüksek sıcak su ortamından etkilendiği ve plazma kortizol, laktat ve glikoz düzeylerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Yavru sazanlarda (*Cyprinus carpio*) 20 °C’de serum kortizol düzeylerinin 14 °C’de yetiştirilenlere göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Jaxion-Harm ve Ladich, 2014). Düşük sıcaklıklar, strese cevap olarak aktive edilen hipotalamus-hipofiz-interrenal (HPI) ekseninde rol oynayan enzimleri ve reseptör bağlama aktivitelerini inhibe edebilmektedir. Metabolik yolun düşük sıcaklıklarda engellenmesi kortizol hormonu salgısının azalmasına neden olmaktadır (Trenzado ve ark, 2003).

Buna karşın Simontacchi ve ark (2008), stres etkenine karşı kortizolün tek başına stres göstergesi olarak kabul edilemeyeceğini; Pankhurst ve King (2010) yüksek su sıcaklığının gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) serum kortizol düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmadığını sadece üremeyi olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir. Aynı şekilde Zarejabad ve ark (2010), yavru mersin balıklarında (*Huso huso*) 21 gün süren çalışmada (*Huso huso*) üç farklı sıcaklık ortamında (9 - 14 °C, 15 - 20 °C ve 21 - 26 °C) plazma kortizol düzeylerini araştırmışlar ve çalışma sonunda plazma kortizol düzeylerinin 15 - 20 °C’de yetiştirilen balıklarda en yüksek düzeyde olduğunu ancak gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını rapor ederlerken, 21 °C’nin üzerindeki sıcaklıkların mersin balığı (*Huso huso*) için ölümcül bir stres indeksi olduğunu bildirmişlerdir. Yukarıdaki literatürlere benzer şekilde araştırmamızda düşük ve yüksek sıcaklığa maruz kalan gökkuşağı alabalıklarının serum kortizol düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi.

Myers ve ark (2010), yaş ve mevsimsel sıcaklığına bağlı ayı balıklarında (*Eumetopias jubatus*) serum kortizol düzeylerini araştırmışlardır. Analiz sonucunda yaşa bağlı temmuz dönemi yavru balıklarda ergin balıklara göre yüksek kortizol düzeyleri tespit ederken, ocak döneminde yavru ve ergin balıklar arasında bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Mevsimsel sıcaklığa bağlı temmuz döneminde yavru balıklarda ocak dönemine göre istatistiksel olarak yüksek serum kortizol düzeyleri görülürken, ergin balıklarda farklı mevsim sıcaklığında düzeylerin değişmediği rapor edilmiştir. Genel olarak mevsim ve yaş arasındaki etkileşimin, özellikle temmuz döneminde yetiştirilen yavru balıkları etkilediğini görmüşlerdir. Ayrıca düşük ve yüksek sıcaklıkların ergin balıklarda strese neden olmadığı, ancak yavru balıkların ergin balıklara göre yüksek sıcaklığa karşı daha duyarlı olduğu ve metabolizmada stres faktörü olan kortizol hormon düzeylerini arttırdığı ileri sürülmüştür. Bununla birlikte farklı

uyaranlarla oluşturulan stres faktörlerine karşı ölçülen serum glukokortikoidlerde oldukça değişken sonuçlar görülmektedir. Koakoski ve ark (2012), akut strese maruz kaldıktan sonra balıkların farklı gelişim evrelerinde kortizol yanıtlarındaki farklılıkları araştırmışlar ve çalışmada 60 günlük yavru ve 360 günlük ergin kedi balığı (*Channel catfish*) kullanmışlardır. Çalışma sonunda akut strese maruz kalan yavru balık grubundaki plazma kortizol düzeylerinin ergin balık grubundakilerle benzer düzeyde yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Bununla birlikte, yavru kedi balıklarının stres etkenine maruz kaldıktan 5 ila 30 dakika sonra kortizol hormon düzeylerinin pik yaptığını, ergin kedi balıklarında ise 60 dakika sonra tepe konsantrasyonuna ulaştığını ve farklı gelişim aşamalarındaki balıkların, stres etkisine maruz kaldıktan sonra farklı zaman aralıklarında kortizolemik tepkiler gösterdiğini, büyüklükten ziyade yaşın balıklarda kortizol tepkisini etkilediğini ifade etmişlerdir. Koakoski ve ark (2012), farklı yaşlarda ve gelişim sürecindeki balıkların kortizol konsantrasyonlarındaki farkı açıklamak için iki hipotez öne sürmüşlerdir. İlk hipotez, HPI ekseninin olgunlaşma sürecindeki değişikliklerden dolayı strese farklı tepki verdiğini, ikinci hipotez ise farklı yaştaki balıkların aynı stres faktörünü farklı şekilde algılayarak tepki oluşturduğunu öne sürmüşlerdir. Barcellos ve ark (2012), aynı yaşta fakat farklı büyüklükteki balıklarda benzer bir stres yanıtının ortaya çıktığını, ancak farklı yaşta ve aynı büyüklükteki balıklar arasında farklı stres yanıtları gözlemlemişlerdir. Her iki çalışmadaki araştırmacılar yaşın HPI ekseninin işleyişi ile bağlantılı olduğunu ve olgunlaşma aşaması ile plazma kortizol düzeylerinin değişkenlik göstereceğini rapor etmişlerdir. Buna karşın Stephen ve ark (2007), kış aylarında yavru ve ergin somon balıklarında (*Oncorhynchus tshawytscha*) plazma kortizol düzeylerinin farklılık göstermediğini saptamışlardır. İlkbaharda plazma kortizol düzeylerinin yavru somon balıklarında düşük olduğu, erginlerde ise sıcaklık ve fotoperiyot sürelerinin etkisiyle artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca ilkbaharda kortizol reseptörlerinin sayısının arttığını, ancak reseptör bolluğu veya afinitesinde yavru ve ergin somon balıkları arasında çok az fark bulunduğunu belirtmişlerdir. Pierce ve ark (2005), kış ve ilkbahar aylarında yavru ve ergin alabalıklar (*Oncorhynchus mykiss*) arasında plazma kortizol hormon düzeylerinin farklılık göstermediğini rapor etmişlerdir. Her ne kadar yukarıdaki araştırmalarda kedi balığı ve somon balıklarında stres ve yaşın plazma kortizol düzeyini etkilediği bildirilse de sunduğumuz çalışmada Pierce ve ark'nın (2005) sonuçlarına benzer, yaşa ve vücut büyüklüğüne bağlı olarak yavru ve ergin gökkuşağı alabalıklarının sıcaklıktaki değişime duyarsız olduğu ve stres faktörü olan serum kortizol düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görüldü.

Glikoz konsantrasyonundaki artışın, stresli durumlarla başa çıkabilmek için enerjinin serbest bırakıldığı, kortizol hormonlarının regülasyonu altında gerçekleşen bir refleksin göstergesi olduğu bildirilmiştir. Farklı sıcaklıklarda yetiştirilen yavru mahşer balıklarında (*Tor putitora*) 32 °C'lik sıcaklıkta serum glikoz düzeylerinin, 20 °C'de yetiştirilen balıklara göre yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu ve yüksek sıcaklıklarda görülen bu artışın kortizol ve katekolaminlerin sentezine bağlı olduğu rapor edilmiştir (Akhtar ve ark, 2013). Yavru deniz levreklerinde 25 °C'de serum kortizol hormonu ve serum glikoz düzeylerinin en yüksek düzeyde olduğu ve sıcaklık düşüşü ile birlikte 15 °C'lik sıcaklıkta iki parametrede de anlamlı derecede azalma olduğu belirtilmiştir (Samarasa ve ark, 2018). Araştırmacılar yüksek sıcaklıkların yüksek enerji talebi oluşturduğunu ve bu nedenle kortizol sekresyonunun strese karşı metabolik ihtiyaçları karşılayabilmek için artabileceğini rapor etmişlerdir. Buna karşın Gerber ve ark (2010), serum glikoz ve kortizol düzeylerinin vücut kütlesi ile korelasyon göstermediğini, 11 °C sıcaklıkta serum glikoz düzeylerinin düşük, 22 °C'de ise yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar glikoz seviyelerinin su sıcaklığı ile pozitif korelasyon gösterdiğini, ancak glikoz düzeylerindeki artışın strese karşı yanıtta kaynaklanmadığı ve yılın farklı zamanlarındaki metabolik süreçlerin balıkların enerji kullanımını değiştirmesinin bu duruma neden olabileceğini ifade etmişlerdir. Çalışmamızda hem temmuz hem de ocak dönemlerinde yaşa bağlı olarak ergin alabalıklarda yavru alabalıklara göre sayısal olarak yüksek olan serum glikoz düzeylerinin kortizol hormonu ile paralellik göstermediği tespit edildi. Ancak tüm örneklerin plazma glikoz ve kortizol düzeyleri arasında $p=0,05$ düzeyinde zayıf bir pozitif korelasyon bulundu.

Balıklarda büyüme ve gelişim, organizma yapısını oluşturan genetik kodun nöroendokrin yanıtı ile düzenlenmektedir. Somatotropik eksen, kas hipertrofisi ve hiperplazisi üzerindeki etkilerinden dolayı balıklarda büyümenin başlıca uyarıcısıdır (Cerdá-Reverter ve Canosa, 2009). Uyarıcı sinyal, hipofiz adenilat siklaz aktivatör polipeptidinin (PACAP) ve GHRH'nin üretildiği hipotalamusta başlatılır. Bu aktivatör ön hipofiz bezinde büyüme hormonu (GH) üretimini salgılatarak karaciğer ve kas gibi dokularda IGF'leri içeren sinyal yollarını oluşturur (Chang ve Wong, 2009). Aynı zamanda GH, GHBP'ler tarafından dolaşım sırasında düzenlenir. GHBP'ler, GHR'nin bölünmesiyle oluşur ve GH'ye bağlanma yeteneğini korurlar (Herington ve Brooks, 2004).

Büyüme hormonu kemikli balıklarda tek zincirli bir polipeptit proteini olarak sınıflandırılan sitokin ailesinden bir hormondur. Birçok balık türünde metabolizma ve somatik büyümenin önemli bir düzenleyicisi olarak işlev görür (Canosa ve Chang, 2007). Balıklarda GH'nin hem somatik hem de linear büyümeyi (Sloat ve Reeves, 2014), yaşa bağlı

olgunlaşmayı, gametogenez ve steroidogenezi (Reindl ve Sheridan, 2012) düzenlediği görülmektedir. Büyüme hormonu enjeksiyon uygulamasının, balık büyümesinin uyarılmasında güçlü etki gösterdiği, GH yetersizliğinde daha düşük büyüme oranlarının görüldüğü ve büyümede endojen GH'ye ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (Le Bail, 1993).

Mevsimlere bağlı sıcaklık değişimlerinin balık biyolojisinde belirleyici bir etken olduğu ve GH'nin farklı su sıcaklıklarında büyüme oranında değişikliklere neden olduğu görülmektedir. Deane ve Woo (2009), artan sıcaklıkların kemikli balıklarda serum GH artışına neden olduğunu; Figueroa ve ark (2009) sazanlarda (*Cyprinus carpio*) su sıcaklığının yüksek olduğu ilkbahar ve yaz aylarında serum GH düzeylerinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Yavru gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) GH etkisi üzerine sıcaklığın rolünü belirlemek amacıyla benzer yem miktarı ve büyüme hızlarına sahip olan alabalıklar, farklı yetiştirme sıcaklıklarına maruz bırakılmış ve düşük sıcaklığın plazma GH'sini düşürdüğü ve büyüme üzerindeki herhangi bir etkiden bağımsız olarak dolaşımdaki GH düzeylerini etkilediği görülmüştür (Gabillard ve ark, 2003b). Benzer şekilde Saera ve ark (2007), yavru çipura balıklarında (*Sparus aurata*) temmuz döneminde serum GH düzeylerinin ekim dönemine göre anlamlı derecede yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Ergin somon balıkları (*Salmo salar*) 8 12 ve 18 °C'lik farklı sıcaklıklara maruz bırakılmış ve 18 °C'de tutulan balıkların daha yüksek büyüme hormonu düzeylerine sahip olduğu ve plazma GH ile büyüme oranları arasında pozitif bir korelasyon görüldüğü rapor edilmiştir (Kullgren ve ark, 2013). Panicz ve ark (2015), 10 15 ve 20 °C'lik sıcaklıklarda ergin kadiye balıklarının (*Tinca tinca*) plazma GH düzeylerini araştırmış ve en yüksek plazma GH düzeylerinin 20 °C'de gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Araştırmacıların çalışmalarına benzer şekilde yaptığımız çalışmada mevsimsel sıcaklığa bağlı yavru ve ergin yaştaki alabalıkların serum büyüme hormon düzeylerinin temmuz döneminde ocak dönemine göre oldukça yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.001$).

Atlantik yavru somon balıklarının gelişim sürecinde dolaşımdaki GH seviyelerinde artışlar olduğu, yavru balık gelişimi sırasında hipofiz sekresyonundaki artışın dolaşımdaki GH sentezini ve sekresyonunu artırabileceği görülmektedir (Ágústsson ve ark, 2001). Yapılan diğer bir çalışmada Saera ve ark (2007), yaş farkına bağlı olarak yavru çipura balıklarında (*Sparus aurata*) serum GH düzeylerinin ergin balıklara göre anlamlı derecede yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Ancak Shrimpton ve ark (2000), yavru somon balıklarının ilkbaharda ergin alabalıklara göre çok düşük plazma GH seviyelerine sahip olduğunu ve bir sonraki bahar döneminde, gelişim ve büyüme ile ergin hale gelen somon balıklarında plazma GH'de büyük bir artış olduğunu belirtmişlerdir. Yukarıdaki çalışmaların aksine yapılan

çalışmada yavru ve ergin gökkuşağı alabalıklarının büyüme hormonu düzeyleri arasında bir fark gözlenmedi. Bununla birlikte temmuz dönemi serum glikoz düzeylerindeki yükselişin, aynı dönemde artan GH düzeylerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Çalışma sonuçlarına benzer şekilde Jorgensen ve Krag (2014), GH'nin insülin direnci, hiperglisemi, artmış hepatik glukoneojenez ve glikojenolizise neden olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda glikoz düzeylerini ayarlayan insülin hormonunun, GH'ye karşı hepatosit duyarlılığını arttırdığı rapor edilmiştir (Reinecke, 2005).

Salmonidlerde, akut stres etkeni ya plazmada etki göstermez ya da plazma GH seviyelerini düşürürken, kronik stres etkeni dolaşımdaki GH seviyelerini artırmıştır (Wilkinson ve ark, 2006). Gökkuşağı alabalıklarında kronik kortizolün hipofiz GH transkripsiyonunu uyarabildiğini ancak plazma GH düzeylerinin hem maruz kalma süresine hem de doza bağlı olduğu görülmüştür (Madison ve ark, 2015). Kortizol enjeksiyon uygulaması yapılan in vivo çalışmalarda, tilapia balıklarında hipofiz GH içeriğinde ve mRNA ekspresyonunda herhangi bir değişiklik olmamakla birlikte (Kajimura ve ark, 2003); kanal yayın balıklarında hipofiz GH seviyesinde artış (Peterson ve Small, 2004), sıçanlarda GH üretiminde azalma görüldüğü (Lam ve ark, 1996) ve kortizol-GH etkileşiminin yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar sergilediği görülmüştür. Çalışmamızda sıcaklık ve yaşa bağlı yavru ve ergin gökkuşağı alabalıklarında kortizol hormon düzeylerinin büyüme hormon düzeyleri ile paralellik göstermediği belirlendi.

Büyüme hormonunun endokrin aktivitesinin iki yolu vardır; ya GHR'ye bağlanarak direkt etki gösterir ya da IGF sekresyonunu indükleyerek indirekt etki yolu ile biyolojik aktiviteleri gerçekleştirir (Canosa ve ark, 2007). Büyüme hormonu, hedef hücrelerin plazma zarı üzerinde bulunan büyüme hormonu reseptörlerine (GHR) bağlanarak etkilerini başlatırken, dokuya özgü GHR ekspresyonu GH'nin farklı hücrelerde metabolik etkilerini ortaya çıkarmaktadır. Reseptörlerine bağlanan GH, karaciğer dokusunda IGF-1'i sentezlemek ve dolaşımda serbest bırakmak için uyarılmaktadır. Karaciğer dokusundaki reseptörlerin bolluğu ve karaciğerin direkt etki ile organizmanın büyümesine aracılık etmekteki rolü göz önüne alındığında plazma GHR ve doku mRNA düzeyleri önem taşımaktadır (Wood ve ark, 2005). Yapılan bir çalışmada tilapia balıklarının karaciğer dokusunda yüksek GHR ekspresyonu görüldüğü ve karaciğer dokusunun GH için önemli bir hedef doku olduğu belirtilmiştir (Tse ve ark, 2003). GH'nin gelişim sürecinde GHR aracılığıyla kas dokusunda da rolü olduğu ve farklılaşma, hipertrofi ve kas metabolizmasını kontrol etmede önemli bir rol oynadığı görülmektedir (Hevrøy, 2013; 2015). GHR'lerin yüksek oranda bulunduğu karaciğer

ve kas dışında dalak, pankreas, kalp, solungaç, gonad, adipoz ve böbrek gibi dokularda da eksprese olduğu gösterilmiştir (Reindl ve Sheridan, 2012).

Mevsimsel sıcaklığın GHR mRNA düzeylerini etkilediği görülmektedir. Düşük sıcaklık seviyelerinde karaciğer dokusunda GHR ekspresyon düzeylerinin düşük olduğu ve sıcaklık artışı ile ekspresyon düzeylerinin yükseldiği belirtilmiştir (Fukada ve ark, 2004). 8 °C'de yetiştirilen gökkuşağı alabalıklarında, GHR ekspresyon seviyelerinin 6 °C'de yetiştirilenlere göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Li ve ark, 2006). Benzer şekilde 16 °C su sıcaklığında tutulanlara kıyasla, 8 °C'de tutulan gökkuşağı alabalıklarının karaciğer ve kas dokusunda yüksek GHR mRNA ekspresyon seviyesi gösterilmiştir (Gabillard ve ark, 2006).

Büyüme hormonunun büyüme üzerindeki etkilerinin büyük bölümü IGF-1'in hedef hücrelerdeki etkisinden kaynaklanmaktadır (Chauvigné ve ark, 2003d; Hevrøy ve ark, 2015). Ekstrahepatik bölgelerdeki IGF-1 sentezinin GH kontrolünde olduğu ve parakrin/otokrin etki ile sentezinin gerçekleştiği düşünülmektedir. Böylece IGF-1 hem endokrin yol ile direkt karaciğerde sentezlenmekte, hem de otokrin/parakrin yolu ile lokal olarak etki göstermektedir (Debnath, 2010; Kuradomi ve ark, 2011; Pierce ve ark, 2011; Valdes ve ark, 2012a; Bodart, 2017). IGF-1, negatif geri bildirim ile hipofizde GHRH hormonun etkisini bloke ederek, GH'nin salınımını inhibe etmektedir. IGF-1'ler etkilerini birçok dokunun hücre zarlarında bulunan IGF-1R'ne bağlanarak göstermektedir (Hagemeister ve Sheridan, 2008). Diğer bir büyüme faktör geni olan IGF-2'de GH'nin büyüme üzerine olan etkilerine aracılık etmektedir. Karaciğer ve kas IGF-2 genleri GH tarafından uyarılır ve metabolik durumun düzenlenmesine neden olur. IGF-2, dokularda büyüme üzerine olan etkilerini IGF-2R bağlanarak göstermektedir (Reinecke ve ark, 2005). Yüksek omurgalılarda ve balıklarda GH/IGF aksının etkisinin benzer olduğu, IGF-1 ve IGF-2 hormonları, IGFBP ve onların spesifik proteazları, IGF-1 reseptör (IGF-1R) ve IGF-2 reseptör (IGF-2R) gibi bileşenler yoluyla fizyolojik etkilerini düzenlendiği görülmektedir (Reinecke ve ark, 2005).

Büyüme hormonu ve IGF aktivitelerini kontrol eden GH/IGF aksı, ektotermik canlılarda büyüme performansının ve çevresel faktörlerin etkisinin belirlenebilmesi için büyüme indeksi olarak kullanılmaktadır (Picha ve ark, 2008). Somatomedin hipoteziyle uyumlu olarak GH'nin, dolaşımdaki IGF-1'in ana kaynağı olan balık karaciğer dokusunda IGF-1 gen ekspresyonunu uyardığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda karaciğer ve kas dokularında IGF-1 geninin eksprese olduğu ve somatik büyümenin ana uyarıcılarından biri olduğu bildirilmiştir (Vong ve ark, 2003; Fox ve ark, 2009; Hevrøy ve ark, 2013; Jiménez-Amilburu ve ark, 2013; Huang ve ark, 2015). Hipofiz bezi geliştiğinde ve karaciğer fonksiyonel olduğunda, GH/IGF aksı dolaşımdaki GH ve IGF-1'in birincil kaynağı olmasına rağmen; bu

hormonları kodlayan genler, balık karaciğer ve kas dokusu dışında beyin, kalp, gastrointestinal sistem, pankreas, böbrek, dalak, gonadlar, solungaçlar, kıkırdak ve kemik gibi diğer dokularında da lokal olarak sentezlenmektedir. IGF-1'e benzer şekilde IGF-2'nin de, otokrin/parakrin etki ile sazan (Vong ve ark, 2003), levrek (Caelers ve ark, 2004), çipura (Saera-Vila ve ark, 2009b) ve somon balıkları (Hevrøy ve ark, 2013) dahil olmak üzere birçok balık türünün karaciğer ve ekstrahepatik dokularında eksprese olduğu görülmektedir. Hızlı büyüyen yavru yayın balıklarında (*Ictalurus punctatus*), karaciğer ve kas dokusunda IGF-2'nin yüksek oranda eksprese olduğu ve beslenme süresince hızlı büyüme oranlarının daha çok IGF-2'nin kaslardaki ekspresyonuna bağlı olabileceği rapor edilmiştir (Peterson ve ark, 2004). Caelers ve ark (2003), tatlı su çipuralarının beyin dokusundaki sayısız nöronda IGF-2 geninin varlığını ortaya koyarken; Perrot ve ark (2000) balık yumurtalığının parankimal hücrelerinde IGF-2 ekspresyonunu rapor etmişlerdir. Bununla birlikte IGF-2 embriyogenez sırasında yüksek oranda eksprese edilir ve embriyonik dokulardaki büyümeyi uyarırken, IGF-1 ekspresyonu embriyogenez sırasında düşüktür ve postnatal GH'ye bağlı büyümenin başlamasıyla artar (Reinecke ve ark, 2005; Wood ve ark, 2005). Bu yüzden IGF-1 ekspresyonunun, memelilerde maksimum büyüme sağlamak için ana faktör olduğu, ancak IGF-2'nin erken gelişmeyi düzenleyen birincil büyüme faktörü olduğu düşünülmektedir. Ancak son yıllarda IGF-2'nin sadece embriyogenez sırasında değil, postnatal dönemde de büyüme ve gelişmede önemli rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Eppler ve ark, 2010; Hevrøy ve ark, 2013). GH enjeksiyon uygulaması ile karaciğer dokusunda hem IGF-1 hem de IGF-2 mRNA ekspresyonlarının artış gösterdiğini rapor ederken (Pierce ve ark, 2011), diğer bir çalışmada karaciğerde endokrin IGF-2'nin, GH'nin tilapia balıklarındaki büyümeyi teşvik edici etkilerine aracılık etmede endokrin IGF-1'den daha önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Eppler ve ark, 2010).

Memeliler dışında IGF sistemi üzerine yapılan araştırmaların büyük çoğunluğu balıklarda yapılmıştır ve değişen çevresel koşullara yanıt olarak plazma düzeyleri, doku ekspresyon düzeyleri ve büyüme oranlarının belirlenmesine odaklanılmıştır. Mevsimsel sıcaklık değişimleri; plazma GH seviyeleri ile doku IGF-1 ve IGF-2 gen ekspresyon düzeylerini etkileyerek, GH/IGF aksının büyüme ve gelişimi üzerindeki etkilerine aracılık etmektedir. Yapılan bir çalışmada farklı sıcaklık ortamında 10 haftalık süre boyunca ad libitum ile beslenmiş yavru gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*), sıcaklık artışına paralel olarak serum GH seviyelerinin arttığı ve karaciğerden salınan IGF-1 seviyelerinin artarak büyüme üzerinde önemli etkisi olduğu bildirilmiştir (Gabillard ve ark, 2003a). Araştırmacılar çevresel sıcaklığın plazma IGF-1 seviyesini direkt olarak etkilemediğini,

ancak GH stimölasyonundan sonra karaciğerden salınımı artan IGF-1'ler aracılığıyla büyümeyi teşvik ettiğini rapor etmişlerdir. Aynı zamanda yüksek sıcaklıkta beslenen yavru balıkların karaciğer dokusunda IGF-1 mRNA düzeylerinin arttığı, IGF-2 mRNA düzeylerinin ise azaldığı rapor edilirken, karaciğer IGF-1 mRNA artışının sıcaklığın GH sekresyonu üzerindeki doğrudan etkisi ile gerçekleştiği ileri sürülmüştür. Sıcaklığın otokrin/parakrin etki yoluyla kas dokusunda IGF-1 ve IGF-2 mRNA düzeylerini etkilemediği belirtilmiştir. Bununla birlikte IGF-2'ye kıyasla IGF-1 mRNA ekspresyon düzeylerinin sıcaklık ile pozitif korelasyon gösterdiği ve büyüme düzenleyicisi olarak rol oynadığı rapor edilmiştir (Gabillard ve ark, 2003a). Diğer bir çalışmada Sirkecioğlu (2011), 10 ve 16 °C'lik sıcaklıkta farklı lipit kaynağı ile beslenmiş yavru gökkuşığı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) kas ve karaciğer dokularında IGF-1 ve IGF-2 mRNA düzeylerini araştırmıştır. Her iki dokuda da 16 °C su sıcaklığında 10 °C'ye göre daha yüksek oranda IGF-1 ve IGF-2 ekspresyon düzeyleri tespit etmiştir. Ayrıca IGF-1 ekspresyonunu en yüksek karaciğer dokusunda, IGF-2 mRNA seviyelerinin ise kas dokusunda belirlemiştir. Farklı dozda lipit besinleri ile beslenen yavru balıkların sıcaklık ile birlikte büyüme hormon faktör genlerinin ekspresyonunu değiştirebileceğini bildirmiştir. Saera ve ark (2007), mevsimsel sıcaklığa bağlı olarak temmuz ve ocak aylarında yavru çipura balıklarının (*Sparus aurata*) karaciğer ve kas dokusunda GHR, IGF-1 ve IGF-2 mRNA düzeylerini araştırmışlardır. Araştırma sonunda yavru çipura balıklarının karaciğer dokusunda GHR mRNA düzeylerinin temmuz ayında maksimuma ulaştığı, buna karşılık kas dokusunda ocak ayında en yüksek düzeylerde olduğu bildirilmiştir. Kas dokusunda IGF-1 mRNA düzeylerinin temmuz ve ocak ayları arasında farklı olmadığı belirtilirken, karaciğer dokusunda IGF-1 mRNA düzeylerinin en yüksek temmuz ayında görüldüğü; IGF-2'nin ise hem kas hem de karaciğer dokusunda ocak ayında en yüksek düzeylere ulaştığı rapor edilmiştir.

Yukarıdaki literatürlere benzer şekilde yapılan çalışmada mevsimsel sıcaklık farkına bağlı olarak temmuz ve ocak dönemleri arasında yavru gökkuşığı alabalıklarının karaciğer ve kas dokularında GHR, IGF-1 ve IGF-2 mRNA düzeyleri incelendi. Çalışma sonucunda artan sıcaklıklara ve yüksek serum GH düzeylerine paralel olarak yavru gökkuşığı alabalıkların karaciğer dokusunda GHR mRNA düzeylerinin temmuz döneminde ocak dönemine göre 6 kat yüksek olduğu, kas dokusunda ise ocak döneminde temmuz dönemine göre 8 kat yüksek olduğu tespit edildi. Buna karşın yavru gökkuşığı alabalıkların hem karaciğer hem de kas dokularında IGF-1 mRNA düzeylerinin temmuz ve ocak dönemleri arasında farklı olmadığı, IGF-2 mRNA düzeylerinin ise her iki dokuda da ocak döneminde temmuz dönemine göre yaklaşık 3 kat yüksek olduğu belirlendi. Araştırmamızda temmuz döneminde yavru gökkuşığı

alabalıkların karaciğer dokusunda artan GHR mRNA düzeylerine rağmen değişmeyen karaciğer IGF-1 mRNA düzeylerinin, JAK-STAT sinyalinde bir bozulmadan kaynaklandığını düşündürmektedir. Çünkü GH'nin IGF-1 üzerindeki etkilerine JAK-STAT sinyali yoluyla aracılık ettiği bilinmektedir (Valdes ve ark, 2012a). Çalışmamızda karaciğer IGF-1 ekspresyonunun baskılanması yapılan farklı çalışmalarda da gösterilmiştir. Yüksek GH plazma seviyelerine rağmen IGF-1 ekspresyon eksikliğinin, IGF-1 sentezinin birincil kusurlarından kaynaklanabileceği ya da IGF-1R ve IGF bağlayıcı proteinlerin sinyal yollarında oluşan IGF-1 direncinden dolayı ortaya çıktığı belirtilmiştir (Rosenfeld, 2003). Bununla birlikte GH ve IGF'lerin, hepatik IGF transkriptlerinde ve dolaşımdaki protein seviyelerinde değişiklikler arasında bir gecikme süresi olduğu gösterilmiştir (Wilkinson ve ark, 2006; Saera ve ark, 2009b). Aynı zamanda büyüme faktör genlerini inhibe edici etkisi olan somatostatinin plazma IGF-1 ve IGF-1 mRNA düzeylerini azalttığı (Very ve ark, 2008) ve GHR'ye bağlanarak karaciğerde IGF-1 üretimini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Fukada ve ark, 2004). Yapılan bir çalışmada GH direnci veya duyarsızlığının, yüksek GH ve düşük IGF-1 mRNA düzeyleri ile karaciğerin GH etkisine azalmış yanıtı olan artan katabolizma/anabolizma dengesizliği sonucunda çeşitli metabolik bozukluklarda ortaya çıktığı belirtilmiştir (Beckman ve ark, 2004). GHBP'nin, hem GH'nin yarı ömrünü uzatarak eylemini arttırdığı hem de membrana bağlı GHR'lerle bağlanmasını önleyerek GH sinyalini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Katsumata, 2010). Aynı zamanda glukokortikoidlerin, GHR sentezini azaltması yoluyla doğrudan GH kaynaklı IGF-1 gen ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Leung ve ark, 2008). Sunduğumuz çalışmada sıcaklık artışına bağlı yavru gökkuşağı alabalıklarında karaciğer ve kas IGF-1 mRNA düzeyleri değişmezken, karaciğer ve kas IGF-2 mRNA düzeylerinin ocak döneminde temmuz dönemine 3 kat artış gösterdiği tespit edildi. Shamblott ve ark (1995), IGF-1 ve IGF-2'nin serum IGF-bağlayıcı proteinleri için rekabet ettiğini ve bir büyüme faktöründeki artışın diğerinin reseptörden ayrılmasına ve etkisini gösterememe durumuna neden olduğunu bildirdikleri çalışma sonuçları karaciğer ve kas IGF-1 ve IGF-2 mRNA bulgularımızı destekler niteliktedir. Benzer şekilde Gabillard ve ark (2003a), yavru gökkuşağı alabalıklarında artan sıcaklığın otokrin/parakrin etki yoluyla kas dokusunda IGF-1 düzeylerini değiştirmediğini ve büyüme uyarımında önemli bir düzenleyici olmadığını ileri sürmüşlerdir. Araştırmamızda yavru gökkuşağı alabalıkların düşük sıcaklığa karşı oluşturduğu uyumun bir sonucu olarak artmış ocak dönemi kas GHR mRNA düzeylerinin; karaciğer IGF-1'inin otokrin/parakrin yolundan bağımsız olarak, ocak döneminde kas IGF-2 mRNA düzeylerini artırdığı ve yavru gökkuşağı alabalıkların kas gelişimini düzenleyebileceği düşünüldü. Benzer şekilde Kuradomi ve ark (2011), zebra balığı

(*Danio rerio*) kas dokusunda GH mRNA ekspresyonundan kaynaklanan kas hipertrofisinin, karaciğer IGF-1 ekspresyonundan bağımsız olarak gerçekleştiğini rapor ederken, Benedito-Palos ve ark (2007), çoğu balık türünün karaciğer dışındaki dokularında IGF-2 mRNA düzeylerinin yüksek olduğunu ve artan miktarlarda diyetle beslendiklerinde, yavru balıklarının kas dokularında hızlı bir büyüme ve gelişime neden olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacıların diğer bir çalışmasında yavru balıkların karaciğer dokularında IGF-1R geninin yaz ve kış dönemleri arasında farklı olmadığı, kas dokusunda ise IGF-2R geninin anlamlı derecede kış döneminde yazıya göre yüksek olduğu gösterilmiştir (Benedito-Palos ve ark, 2015). IGF-1'in, memelilerde büyümeyi sağlamak için ana faktör olmasına rağmen, IGF-2'nin erken gelişmeyi düzenleyen birincil büyüme faktörü olduğu iddia edilmiştir (Dai ve ark, 2015). Ayrıca yavru çipura balıklarında (*Sparus aurata*) azalmış karaciğer IGF-1 üretiminin büyüme üzerindeki azalmış etkisinin, kas IGF-2 ekspresyonunun artan ifadesiyle doku seviyesinde (iskelet kası) telafi edilebileceği gösterilmiştir (Benedito-Palos ve ark, 2007; Saera-Vila ve ark, 2007). Yaptığımız çalışma sonucunda mevsimsel sıcaklık artışının yavru gökkuşuğu alabalıklarında IGF-1 ve IGF-2 gen ekspresyonunu arttırmadığı ve artan sıcaklıkların büyüme ve gelişimi desteklemediği tespit edilirken; Benedito-Palos ve ark (2007), Saera-Vila ve ark (2007) ve Kuradomi ve ark (2011) çalışmalarında bildirdiği gibi ocak döneminde temmuz dönemine göre yavru gökkuşuğu alabalıklarının kas dokusunda IGF-2'nin büyüme ve gelişimi düzenleyebileceği düşünülmektedir.

Panicz ve ark (2015), 10 15 ve 20 °C'lik sıcaklıklarda ergin kadiye balıklarının (*Tinca tinca*) karaciğer dokusunda IGF-1 gen ekspresyonu, hipofiz, kas ve karaciğer dokusunda GH gen ekspresyon düzeylerini araştırmışlardır. Çalışmalarında 20 °C'de balıkların plazma IGF-1 seviyeleri ile karaciğer IGF-1 mRNA düzeylerinin arttığını ve IGF-1'in, sıcaklığın büyüme ve gelişimi üzerindeki etkilerine aracılık ettiğini rapor etmişlerdir. Benzer şekilde ergin atlantik somon (*Atlantik salmon*) balıklarında yapılan bir çalışmada 13 15 17 ve 19 °C'lik deniz suyu sıcaklığında balıkların büyüme oranları incelenmiş ve çalışma sonunda GHR mRNA düzeylerinin karaciğer dokusunda en yüksek 15 °C'de, kas dokusunda ise 19 °C'de olduğu gösterilmiştir. Kas dokusunda IGF-1 mRNA düzeylerinin, artan sıcaklıklarla birlikte azaldığı, karaciğer IGF-1 mRNA düzeylerinde ise herhangi bir değişiklik olmadığı belirtilmiştir. Büyük kas kütlesine sahip ergin atlantik somon balıklarının uzun süreli sıcaklığa maruz kalmasının IGF-2 mRNA düzeylerini düşürdüğü ve 13 °C'nin üzerindeki deniz suyu sıcaklıklarının ergin somon balıklarının büyümesini olumsuz yönde etkilediği rapor edilmiştir (Hevrøy ve ark, 2013). Bildik ve ark (2018), ergin çipura balıklarında (*Sparus aurata*) mevsimsel sıcaklığın IGF-1 gen ekspresyonu üzerindeki etkisini araştırmış ve yaptıkları

Çalışma sonucunda karaciğer ve kas doku örneklerinin alındığı temmuz döneminde su sıcaklığının 27  C, ocak döneminde ise 18  C olduğunu ve temmuz döneminde sıcaklık artışına rağmen hem kas hem de karaciğer dokularında IGF-1 mRNA ekspresyon düzeylerinin anlamlı derecede değişmediğini tespit etmişlerdir.

Sunduğumuz çalışmada aynı yaştaki ergin gökkuşağı alabalıklarının karaciğer ve kas dokularında GHR, IGF-1 ve IGF-2 genlerinin temmuz ve ocak dönemleri arasında mevsimsel sıcaklık farklarıyla olan ilişkisi araştırıldı. Ergin gökkuşağı alabalıklarının karaciğer GHR ve IGF-2 mRNA düzeylerinin ocak döneminde temmuz dönemine göre 2 kat daha yüksek olduğu, karaciğer IGF-1 mRNA düzeylerinin ise temmuz döneminde ocak dönemine göre 3 kat yüksek olduğu belirlendi. Ergin gökkuşağı alabalıklarının kas dokusunda GHR mRNA düzeylerinin temmuz döneminde ocak dönemine göre 6 kat yüksek, kas IGF-1 mRNA ve IGF-2 mRNA düzeylerinin temmuz döneminde ocak dönemine göre yaklaşık 3 kat yüksek olduğu tespit edildi. Temmuz dönemi ergin gökkuşağı alabalık grubunda ocak dönemine göre görülen yüksek GH düzeylerine rağmen karaciğer GHR mRNA düzeylerinin temmuz dönemine göre ocak döneminde yüksek görülmesi, Frank'ın (2002) alışmasında rapor ettiği gibi hücre içi inhibitörlerin indüklenmesi sonucu reseptör aktivasyonunun inhibe edilmesinden ya da reseptör aktivasyonunun yüksek GH düzeyleri tarafından engellenmesinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Çalışmamızda temmuz döneminde sıcaklık artışı ile birlikte ergin gökkuşağı alabalıklarının karaciğer dokusunda artan IGF-1 mRNA düzeylerinin hem direkt etki göstererek hem de otokrin/paraktin etki yoluyla kas IGF-1 mRNA düzeylerini artırdığı görülmektedir. Aynı zamanda artan sıcaklıkta yükselmiş kas GHR mRNA düzeylerine paralel olarak IGF-1 ve IGF-2 mRNA seviyelerinin artışının dokuya özgü bir kas tepkisini ortaya çıkardığı görülmüştür. Bulgularımıza benzer şekilde; Mingarro ve ark (2002), ipura balıklarında (*Sparus aurata*) karaciğer IGF-1 mRNA ekspresyon düzeylerinin sıcaklık ve vücut büyüme oranı ile pozitif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Biga ve ark (2004a), kas dokusunda GH'nin IGF-1 mRNA ekspresyonu üzerinde güçlü bir indükleyici etkisinin olduğunu ve GH enjeksiyon uygulaması sonrasında gökkuşağı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) kas dokularında IGF-1 mRNA düzeylerini arttırdığını rapor etmişlerdir. Ayrıca IGF-1'in etkilerine aracılık eden IGF-1R'nin, ergin balıkların karaciğer ve kas dokusunda eksprese olduğu gösterilmiştir (Wenger ve ark, 2014; Alzaid, 2016). Araştırmamızda temmuz döneminde ocak dönemine göre artan kas IGF-2 mRNA düzeylerinin ergin alabalıkların kas dokusunda büyüme ve gelişimi düzenleyebileceği tahmin edilmektedir. Benzer şekilde Fuentes ve ark (2013) IGF-2'nin, kas büyümesi, protein sentezi ve myoblast proliferasyonu üzerinde olumlu etkilere sahip olduğunu rapor etmiştir.

Yapılan çalışmalarda Caelers ve ark (2004) ve Eppler ve ark (2010), tilipia balıklarının (*Oreochromis niloticus*) ergin döneminde IGF-2'nin kas dokusunda eksprese edildiğini göstermişlerdir. Yaptığımız çalışmada mevsimsel sıcaklık artışı ile birlikte ergin gökkuşağı alabalıklarının karaciğer ve kas dokusunda büyüme faktör genlerinin daha yüksek düzeyde eksprese olduğu görüldü. Aynı zamanda artan sıcaklığın büyüme üzerindeki etkisi ile ilişkili olarak, ergin gökkuşağı alabalıklarında GH/IGF aksının artan sıcaklıktan olumlu yönde etkilendiği ve mevsimsel sıcaklık artışı ile birlikte temmuz döneminde ocak dönemine göre sistemik olarak üretilen karaciğer IGF-1 geninin karbonhidrat ve yağ metabolizmasını düzenleyebileceği, lokal olarak üretilen kas IGF-1 ve IGF-2 genlerinin ise kas dokusunda büyümeyi teşvik edebileceği düşünüldü.

Balıklarda büyüme ekseninin aktivasyonu göz önüne alındığında sıcaklıkla değişen beslenme durumları ile birlikte fotoperiyot, sudaki oksijen seviyeleri, toksisite ve tuzluluk gibi faktörlerinde dikkate alınması gerektiği görülmektedir. Sindirim sistemi yoluyla gıdalardan elde edilen enerji; metabolik olaylarda, büyümede ve üremenin devam edebilmesi için kullanılmaktadır (Hevrøy ve ark, 2012). Balıklar sıcaklık stresi ile başa çıkabilmek için daha fazla yem tüketerek metabolizma ve büyüme için daha fazla enerjiye ihtiyaç duymaktadır (Tort, 2011). Yapılan bir çalışmada yüksek ortam sıcaklığının yavru kedi balıklarında (*Clarias Batrachus*) GHR ekspresyonunu uyardığı ve yüksek plazma GH'nin reseptöre daha fazla bağlanmasına neden olduğu, böylece plazma IGF-1 düzeylerini arttırdığı görülmüştür. Aynı zamanda ocak ayında vücutta veya gonadal büyümede herhangi bir değişiklik göstermedeki etkisizliğin, düşük sıcaklık nedeniyle azalan gıda alımına bağlı olduğu öne sürülmüştür (Singh ve Lal, 2008). Aynı şekilde artan sıcaklık, daha yüksek bir gıda alımına paralel olarak daha hızlı bir balık büyüme oranına neden olmaktadır (Hevrøy ve ark, 2012). Diğer bir faktör fotoperiyotun mevsim döngüsünde değiştiği ve ilkbahar/yaz aylarında en uzun olduğu göz önüne alındığında, GH sentezi üzerinde olumlu etkileri olduğu görülmektedir (Imsland ve ark, 2008). Aynı zamanda GH'nin, balıkların tatlı sulardan tuzlu sulara geçişlerde adaptasyonlarına yardımcı olduğu yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (Árnason ve ark, 2013). Bu yüzden sıcaklığın GH aktivitesini üzerindeki spesifik rolünü aydınlatmak için sıcaklık ile birlikte farklı faktörlerin de hesaba katılması gerektiği araştırmacılar tarafından öne sürülmektedir (Imsland ve ark, 2008; Singh ve Lal, 2008; Hevrøy ve ark, 2012; Árnason ve ark, 2013).

Tüm omurgalılar arasında olgunlaşma, belirli bir yaşa ve boyuta ulaştığında görülür (Silverstein ve ark, 1999). Lineer büyüme, somatik büyümeden farklı bir fizyolojik süreçtir ve somatik büyümede kas büyümesi, karaciğer büyümesi, visseral büyüme, gonad büyümesi ve lipogenez süreçleri sonucunda değişimler ortaya çıkar. Olgunlaşma sürecinde kas kütlesindeki artış birçok balık türünde hem hiperplazi hem de hipertrofi ile oluşmaktadır (Biga ve ark, 2004a). GH ve IGF genlerinin yüksek ekspresyonu, kas mitogenezini arttırarak balıklarda metabolik hızı ve oksijen tüketimini yükseltmektedir. Yüksek oksijen tüketiminin beslenmenin bir sonucu olarak arttığı ve iskelet kasındaki hiperplazi ve hücrel değişikliklerin bu duruma neden olduğu bildirilmiştir (Li ve ark, 2014). Aynı zamanda lipid/enerji rezervlerinin somatik ve lineer büyümede belirleyici bir indeks olduğu ve olgunlaşma üzerinde önemli rol oynadığı görülmüştür (Hopkins ve ark, 1997). Belirli aylarda sınırlı miktarda yem alımı büyümeyi yavaşlatırken, enerji depoları boşalmakta ve bunun sonucunda olgunlaşma oranının azalmasına neden olmaktadır (Silverstein ve ark, 1999). Balıklarda olgunlaşma için en yaygın kabul edilen hipotez, cinsel gelişimin devam etmesi için kritik dönemlerde büyüklük, büyüme hızı ve enerji depolanması için bir miktar eşiğin aşılması gerektiğidir. Bu nedenle, büyüme ve enerji metabolizmasının kontrolünde yer alan hormonların, olgunlaşma süreçlerinde kilit rol oynaması muhtemeldir (Bromage ve ark, 2001). Kaslarda olduğu gibi lipid mobilizasyonunda da GH'nin rol oynadığı görülmektedir. Besin eksikliğinde büyüme faaliyetleri lipid kullanımı yoluyla karşılanmakta ve olumsuz beslenme koşullarında karaciğer dokularında GH'ye olan duyarlılık GHR transkript düzeylerinin düşmesi ile azalmaktadır. Bununla birlikte, yağ dokusunda GH'ye olan duyarlılık, lipid depolarının kullanılması yoluyla artmaktadır (Bergan ve ark, 2018).

İnsülin benzeri büyüme hormonları balıkların bütün yaşam evrelerinde görülmektedir. Yapılan bir çalışmada aynı yaşta ve üç farklı boyutta (küçük, orta ve büyük) yetiştirilen yavru japon yılan balıklarında (*Anguilla japonica*), büyük boyuttaki balıkların karaciğer IGF-1 mRNA seviyelerinin küçük boyutlu balıklara göre yüksek olduğu görülürken (Moriyama ve ark, 2006), diğer bir çalışmada yavru balıkların tüm dokularında IGF-1 mRNA ekspresyonu rapor edilmiştir (Biga ve ark, 2004b). Yom Din ve ark (2008), sırasıyla bir ve beş yaşında olan yavru ve ergin mersin balıklarında (*Acipenser gueldenstaedtii*) yaptıkları çalışmada hipofiz GH mRNA düzeyleri ile hipofiz, karaciğer, böbrek, bağırsak ve kas dokularında IGF-1 mRNA düzeylerini incelemişler ve ergin ve yavru balıkların hipofiz GH mRNA düzeylerinde bir farklılık olmadığını, ergin mersin balıklarında en yüksek IGF-1 mRNA ekspresyonunun böbrek ve hipofiz dokusunda, en düşük düzeylerin ise kas dokusunda görüldüğünü bildirmişlerdir. Araştırmacılar yavru mersin balıklarında ise en yüksek IGF-1

mRNA ekspresyonunu karaciğer ve böbrek dokusunda tespit etmişlerdir. Li ve ark (2006), IGF-1 ve IGF-2'yi kodlayan mRNA kopya sayılarının döllenmeden sonraki ilk 24 saat boyunca değişmediğini, inkübasyon sıcaklığında yetiştirilen embriyolarda ise her iki gen için transkript sayısında önemli bir artış olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca çalışmada erken gelişim periyodu esnasında IGF-2 ekspresyonunun, IGF-I ekspresyonuna göre daha fazla olduğu ve embriyonik gelişim döneminde IGF-2'nin baskın olduğu bildirilmiştir.

Araştırmamızda ocak dönemi gökkuşağı alabalıklarında yaş farkının büyüme faktör genleri üzerine olan etkisini incelendi. Ocak döneminde, yavru ve ergin gökkuşağı alabalıkları arasında karaciğer GHR mRNA düzeylerinin benzer olduğu görülürken, karaciğer IGF-1 mRNA düzeylerinin yavru gökkuşağı alabalıklarında ergin gökkuşağı alabalıklarına göre 17 kat, karaciğer IGF-2 mRNA düzeylerinin ise benzer şekilde 8 kat yüksek olduğu belirlendi. Ocak döneminde yavru gökkuşağı alabalıklarının kas dokusunda GHR, IGF-1 ve IGF-2 mRNA düzeylerinin ergin alabalıklara kıyasla sırasıyla 11, 2 ve 11 kat yüksek olduğu gözlemlendi. Çalışmamızda ocak döneminde serum GH düzeylerinin yaşa bağlı gökkuşağı alabalıklarında farklı olmadığı ve karaciğer GHR ekspresyon düzeyleri ile pozitif korelasyon gösterdiği görüldü. Karaciğer dokusunda artan IGF-1 ekspresyonunun negatif feed back mekanizması ile plazma GH düzeylerini ve karaciğer GHR ekspresyonunu düşürdüğü rapor edilmiştir (Canosa ve ark, 2007; Reindl ve Sheridan, 2012). Yapılan çalışmalara benzer şekilde ocak dönemi yavru gökkuşağı alabalıklarında düşük olan serum GH düzeylerinin ve artmayan karaciğer GHR ekspresyon düzeylerinin, yavrularda artan karaciğer IGF-1 ekspresyonu tarafından negatif feed back mekanizması ile baskılandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte Mingarro ve ark (2002), sonbaharda ergin çipura balıklarında (*Sparus aurata*) GH salınımını inhibe eden plazma somatolaktin düzeylerinde artış rapor etmişlerdir. Aynı zamanda yaz döneminde artan sıcaklıklar ve uzun fotoperiyot sürelerinin GH'nin yükselmesine neden olduğunu ve lipid ve protein depolarını arttırdığını, balıklar ergin boyuta ulaştığında, soğuk mevsimin başlangıcında somatolaktinin yükselmesi ile açlık ve hatta üreme işlemleri için yaz döneminde depolanan enerji rezervlerinin tüketildiği ileri sürülmüştür. Buna karşılık, araştırmacılar yavru çipura balıklarında sonbahar döneminde düşük somatolaktin düzeyleri ile hipertrigliseridemi ve insülin direnci durumlarını ortaya çıkaran yüksek hepatosomatik indeksin soğuk dönemlerde yavru balıkların büyüme oranlarını arttırdığını göstermişlerdir. Benzer şekilde Luckenback ve ark (2007), 23 °C'de yetiştirilen yavru pisi balıklarında (*Paralichthys lethostigma*) 28 °C'dekilere göre daha büyük karaciğer ağırlığının, hepatosomatik indeksin (HSI) ve somatik büyüme oranlarının (SGR) görüldüğünü ve bunun da artan karaciğer IGF-1 ve kas IGF-1 mRNA düzeylerine bağlı olduğunu belirtmişlerdir.

Çalışmamızda ocak döneminde karaciğer IGF-1 mRNA düzeylerinin yavru gökkuşağı alabalıklarında ergin alabalıklara göre yüksek olması; yukarıdaki literatürlerde belirtildiği gibi, yavru balıklarda sonbahar döneminde görülen düşük somatolaktin düzeyleri ile büyük karaciğer ağırlığına ve yüksek HSI düzeylerine bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Kas dokusunda ise GHR, IGF-1 ve IGF-2 mRNA düzeylerinin ocak döneminde yavru balıklarda erginlere göre yüksek olduğu, bununla birlikte karaciğer ve kas dokusunda IGF-1 ve IGF-2 etkilerinin yavru gökkuşağı alabalıklarında benzerlik gösterdiği görülmektedir. Erken gelişim evrelerinde IGF-1 ve IGF-2 ekspresyonu yavru balıklarda kas gelişiminde ana faktörlerdir (Reinceke ve ark, 2005). Gökkuşağı alabalıklarında, IGF-1 geni kas hücrelerine glikoz ve amino asit alımını uyararak doğrudan kas büyümesini sağlamaktadır. Aynı zamanda IGF'ler; artan amino asit alımı, protein sentezi, hücre proliferasyonu ve mitogenez aktivasyonu ile protein degradasyon oranının azaltılması da dahil olmak üzere, kas dokusunda birçok anabolik süreç için güçlü bir uyarıcı olarak çalışmaktadır (Montserrat ve ark, 2012). Araştırma sonuçlarımıza göre düşük sıcaklıkta yavru gökkuşağı alabalıklarının büyüme ve gelişimi ergin gökkuşağı alabalıklarından daha iyi yönettiği görülmektedir. Ergin gökkuşağı alabalıklarının ocak döneminde lipid, protein ve karbonhidrat depolarını tüketebileceği, yavru gökkuşağı alabalıklarının ise IGF-1 ve IGF-2 genlerinin aktivitesi ile büyüme ve gelişimi düzenleyebileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda çalışma sonuçlarımız düşük sıcaklıkta endokrin IGF-2'nin, yavru gökkuşağı alabalıklarında IGF-1 etkisi gösterdiğine kanıt sağlamaktadır.

Yavru dönemden ergin döneme geçişlerde IGF genlerinin eksprese olduğu ve salmonidlerin cinsel olgunlaşması sırasında GH/IGF aksının rol oynadığı görülmektedir (Kamangar ve ark, 2007; Saera ve ark, 2009b; Wenger ve ark, 2014). GH ve IGF-1 reseptörleri ovaryumlarda yüksek oranda eksprese edilerek olgunlaşma sırasında karaciğerde üretilen IGF-1'lerin mRNA ekspresyonunu up ve down regüle edebilmektedir (Gutiérrez ve ark, 2006; Fuentes ve ark, 2008). Radaelli ve ark (2003) çipura balıklarında, embriyonik gelişimin erken evrelerinden yetişkin evreye kadar yüksek düzeylerde IGF-2 geninin eksprese edildiğini belirtmişlerdir. Çalışmamıza benzer şekilde Saera ve ark (2007), temmuz döneminde yavru ve ergin çipura balıklarının (*Sparus aurata*) karaciğer ve kas dokularında GHR, IGF-1 ve IGF-2 ekspresyonlarını incelemişler ve araştırma sonunda yaşa bağlı karaciğer GHR, IGF-1 ve IGF-2 mRNA düzeylerinin yavru balıklarda erginlere göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca kas dokusunda GHR ve IGF-2 mRNA düzeylerinin yaş grupları arasında değişmediğini, kas IGF-1 mRNA düzeylerinin ise ergin balıklarda yavru balıklara göre daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada farklı yaşlarda olan gökkuşağı alabalıklarının temmuz dönemi karaciğer ve kas dokularında GHR, IGF-1 ve IGF-2 gen düzeylerini inceledik. Temmuz döneminde yavru gökkuşağı alabalıklarının karaciğer dokusunda GHR, IGF-1 ve IGF-2 mRNA düzeylerinin ergin gökkuşağı alabalıklarına göre sırasıyla 5 3 ve 8 kat yüksek olduğu gözlemlendi. Kas dokusunda GHR ve IGF-2 mRNA düzeylerinin yaş grupları arasında değişmediği, kas IGF-1 mRNA düzeylerinin ise ergin gökkuşağı alabalıklarında yavrulara göre 2 kat yüksek olduğu tespit edildi. Çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da temmuz döneminde ergin gökkuşağı alabalıklarına göre yavru gökkuşağı alabalıklarında yüksek olan serum GH düzeylerinin, yavru gökkuşağı alabalıklarının karaciğer GHR, IGF-1 ve IGF-2 mRNA düzeylerini eş zamanlı değişikliklerle arttırdığı görülmektedir. Çalışmamızda Saera ve ark'nın (2007) rapor ettiği gibi, GHR'nin hepatik transkripsiyonel aktivasyonunun karaciğer IGF-1 ve IGF-2 mRNA düzeylerinde artışlara neden olarak direkt etki yoluyla yavru gökkuşağı alabalıklarının gelişimini düzenleyebileceği düşünülmektedir. Benzer şekilde Davis ve Peterson (2006) yavru tatlı su levreklerinde (*sunshine bass*), Vera ve Brown (2009) yavru nil tilapia balıklarında (*Oreochromis niloticus*) ve Huang ve ark (2015) yavru sazan balıklarının (*Cyprinus carpio*) karaciğer dokularında yüksek sıcaklık ile IGF-1 mRNA düzeylerinin paralellik gösterdiğini ve yavru balıkların metabolik aktivitelerini, IGF-1 ile düzenlediğini rapor etmişlerdir. Aynı zamanda IGF-1'in büyüme sürecinde, bütün dokular üzerinde etkili olduğu bilinmekle beraber, son yıllarda GH'den bağımsız şekilde kas hücre aktivasyonunu artırdığı ve böylece kas hipertrofisine neden olduğu görüşü kabul görmektedir (Harbili, 2008). Çalışmamızda ergin gökkuşağı alabalıklarının kas GHR mRNA düzeylerinin yaşlanmaya bağlı olarak değişmediği, kas IGF-1 ve IGF-2 ekspresyonunun yaşa bağlı azalmaya aracılık etmediği gözlemlendi. Ayrıca artmış kas IGF-1 mRNA düzeylerinin ergin alabalıkların kas dokusunda hiperplazi ve hipertrofiye neden olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda; Li ve ark (2014) ve Fuentes ve ark (2013), artmış IGF-1 ekspresyonunun transgenik balıklarda belirgin şekilde artmış kas hipertrofisine ve hiperplazisine neden olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde ergin tilapia balıklarının (*Oreochromis niloticus*) kas dokusunda IGF-1 ve GHR ekspresyon düzeylerinin yavru balıklardakine göre daha yüksek düzeyde eksprese edildiği, bununda vücut ağırlığı ve yüksek büyüme oranlarına bağlı olabileceği rapor edilmiştir (Huang ve ark, 2012). Kas hücresi artışının, sıçanlarda GHR'lerin gelişmiş ekspresyonuyla ilişkili olduğunu ancak bu kas artışının direkt IGF-1 ve IGF-1R sinyalini gerektirdiği belirtilmiştir (Kim ve ark, 2005). Sunduğumuz çalışmada büyüme faktör genlerinin temmuz döneminde yavru gökkuşağı alabalıklarında ergin gökkuşağı alabalıklarına göre daha yüksek düzeyde eksprese edildiğini

gözlemledik. Bununla birlikte kas IGF-2 ekspresyon düzeylerinin yüksek sıcaklıkta yaş farkına bağlı olarak değişmediği, yavru gökkuşuğu alabalıklarında karaciğer IGF-2 ekspresyonunun ve karaciğer IGF-1'in otokrin/parakrin yoluyla büyüme ve gelişimi düzenlediği tahmin edilmektedir. Aynı zamanda ergin gökkuşuğu alabalıklarının yüksek sıcaklıkta kas IGF-1 ekspresyonu artışı ile büyüme faaliyetlerini devam ettirebileceği düşünülmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Büyüme hormonu ve IGF'ler, ektotermik canlılarda büyüme performansının ve çevresel faktörlerin etkisinin belirlenmesinde büyüme indeksi olarak kabul edilmektedir ve bu konuda son yıllarda farklı değişkenler incelenerek çok sayıda araştırma yapılmıştır. Balıklar su sıcaklığı ve mevsimsel sıcaklık gibi çevresel stres faktörlerinden etkilenir ve olgunlaşma süreci boyunca sıcaklık değişimlerine karşı hormonal bir yanıt oluşturur. Bu yüzden sıcaklık değişim etkilerinin hem kısa hem de uzun zaman ölçeklerinde incelenmesinin uygun bir model olduğu düşünüldü. Çalışmada farklı mevsim sıcaklığında ve yaş aralığındaki gökkuşağı alabalıklarının karaciğer ve kas dokularında, büyümenin biyolojik belirteçleri olan GHR, IGF-1 ve IGF-2 genleri ve stres parametrelerinden serum kortizol ve glikoz düzeyleri değerlendirildi.

Yapılan çalışmada en yüksek serum glikoz düzeyine sahip temmuz dönemi ergin alabalık grubu glikoz düzeyleri ile ocak dönemi yavru alabalık grubu glikoz düzeyleri arasında istatistiksel bir fark tespit edilmiştir ($p<0.001$). Bu artışın yüksek sıcaklıkta enerji ihtiyacının artması sonucunda karaciğer ve kas dokularındaki glikojen depolarının glikozları serbest hale getirmesinden kaynaklandığı kanısına varılmıştır. Bununla birlikte yaşa bağlı ergin gökkuşağı alabalık gruplarında serum glikoz düzeylerinin temmuz ve ocak dönemlerinde yavru alabalık gruplarına kıyasla yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmanın glikoz bulgularının temmuz dönemi alabalıklarda sıcaklığın etkisiyle yükseldiğini ve balıkların sıcaklıklardaki değişime bağlı farklı enerji kullanım davranışı gösterdiğini düşündürmektedir.

Stres parametrelerinden kortizol hormon düzeyleri değerlendirildiğinde, düşük ve yüksek sıcaklığa maruz kalan gökkuşağı alabalıklarının gruplar arasında farklılık göstermediği belirlendi. Benzer şekilde yaşa ve vücut büyüklüğüne bağlı olarak yavru ve ergin gökkuşağı alabalıklarının sıcaklıktaki değişime duyarsız olduğu ve stres faktörü olan serum kortizol düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü.

Balıklarda büyüme ve gelişimi kontrol eden GH'nin, mevsimsel sıcaklığa bağlı yavru ve ergin yaştaki alabalıklarda temmuz döneminde ocak dönemine göre oldukça yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.001$). Aynı zamanda temmuz dönemi serum glikoz düzeylerindeki yükselişin, aynı dönemde artan GH düzeylerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Yaşa bağlı yavru ve ergin gökkuşağı alabalıklarının GH düzeyleri değerlendirildiğinde

istatistiksel olarak bir fark görülmedi. Ayrıca gruplar arasında kortizol hormon düzeylerinin GH düzeyleri ile paralellik göstermediği belirlendi.

Real-Time PCR uygulaması sonrasında büyüme faktör genlerine ait ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde,

- ✓ Mevsimsel sıcaklık artışının aynı yaştaki yavru alabalıkların karaciğer ve kas dokularında IGF-1 ve IGF-2 gen ekspresyonunu etkilemediği ve ocak döneminde temmuz dönemine göre yavru alabalıkların karaciğer ve kas dokusunda IGF-2'nin büyüme ve gelişimi düzenlediği görüldü.
- ✓ Mevsimsel sıcaklık artışına karşı yavru alabalıklarda GH, IGF-1 ve IGF-2 genleri arasında meydana gelen farklılıkların nedeni olarak; gen faktörlerinin birbirleriyle ilişki içerisinde olmasının yanı sıra farklı işlev ve zamanlarda görev almasının etkili olduğu görüşü ağır basmaktadır.
- ✓ Aynı yaştaki ergin alabalık grubunda temmuz döneminde ocak dönemine göre görülen yüksek GH'nin indirekt etki yolu ile karaciğer dokusunda IGF-1 gen ekspresyonunu artırdığı ve karaciğer dokusunda artan IGF-1 geninin otokrin/parakrin etki yoluyla kas IGF-1 gen ekspresyonunu düzenlediği anlaşıldı.
- ✓ Ayrıca artan sıcaklıkta yükselmiş kas GHR gen ekspresyonunun artan GH düzeylerine cevap verdiği ve IGF-1 ve IGF-2 gen düzeylerinde dokuya özgü bir kas tepkisini ortaya çıkardığı görülürken, mevsimsel sıcaklık artışı ile birlikte ergin alabalıklarda IGF-1 ve IGF-2 genlerinin büyümeyi teşvik edebileceği sonucuna ulaşıldı.
- ✓ Yaş farkına bağlı olarak, ocak döneminde yavru alabalıkların karaciğer ve kas dokusunda GHR, IGF-1 ve IGF-2 gen ekspresyonlarının ergin alabalıklara göre daha yüksek olduğu tespit edildi.
- ✓ Düşük sıcaklıkta yavru alabalıkların, büyüme ve gelişimi ergin alabalıklardan daha iyi yönettiği görüldü. Buna bağlı olarak ergin alabalıklarının ocak döneminde lipit, protein ve karbonhidrat depolarını tüketebileceği düşünülmektedir.
- ✓ Aynı zamanda çalışma bulguları düşük sıcaklıkta endokrin IGF-2'nin, yavru alabalıklarda IGF-1 etkisi gösterdiği sonucuna varıldı.
- ✓ Yaş farkına bağlı büyüme faktör genlerinin temmuz döneminde yavru alabalıklarda ergin gökkuşağı alabalıklarına göre daha yüksek düzeyde eksprese edildiği belirlendi.

Sonuç olarak farklı mevsim sıcaklığı ve yaştaki alabalıklarda stres parametreleri ile karaciğer ve kas dokusunda GHR, IGF-1 ve IGF-2 gen ekspresyonlarının incelendiği bu çalışmanın daha sonra yapılacak çalışmalar için referans olabileceği öngörülmektedir.



KAYNAKLAR

- Aerts J, Metz JR, Ampe B, Decostere A, Flik G, De Saeger S.** Scales tell a story on the stress history of fish. *Plos One*, 2015, 1-17.
- Ágústsson T, Sundell K, Sakamoto T, Johansson V, Ando M and Björnsson TH.** Growth hormone endocrinology of Atlantic salmon (*Salmo salar*): Pituitary gene expression, hormone storage, secretion and plasma levels during parr smolt transformation. *Journal of Endocrinology* 2001, 170, 227-234.
- Akbulut S, Keten A.** Düzce yöresindeki alabalık yetiştiriciliği üzerine bir çalışma. *Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi* 2001, 2, 49-60.
- Akhtar MS, Pal AK, Sahu NP, Ciji A, Mahanta PC.** Thermal tolerance, oxygen consumption and haemato biochemical variables of ‘*Tor putitora*’ juveniles acclimated to five temperatures. *Fish Physiology and Biochemistry* 2013, 39, 1387-1398.
- Aksakal-İçoğlu İ.** Farklı Yağ Kaynağı İçeren Diyetlerin Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Bazı Büyüme (GH-I), (IGF-I), (IGF-II) ve İmmün Sistem (Tgf- β) Genleri Ekspresyonu Üzerine Etkileri, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum 2013, 61.
- Aluru N, Vijayan MM.** Hepatic transcriptome response to glucocorticoid receptor activation in Rainbow trout. *Physiological Genomics* 2007, 31, 483-491.
- Alzaid A.** The complete salmonid IGF-IR gene repertoire and its transcriptional response to disease. *Scientific Reports* 2016, 6, 1-10.
- Arfuso F, Guerrera MC, Fortino G, Fazio F, Santulli A, Piccione G.** Water temperature influences growth and gonad differentiation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758). *Theriology* 2017, 88, 145-151.
- Árnason T, Magnadóttir B, Björnsson B, Steinarsson A, Björnsson BJ.** Effects of salinity and temperature on growth, plasma ions, cortisol and immune parameters of juvenile Atlantic Cod (*Gadus Morhua*). *Aquaculture* 2013, 380-383, 70-79.
- Avkhimovich D.** Effect of Water Quality on Rainbow trout Performance Water Oxygen Level in Commercial trout Farm “Kala ja marjapojat”, Bachelor’s Thesis, Mikkeli University of Applied Sciences Environmental Engineering, Finlandiya 2013, 77.

Barbosa V, Maulvault AL, Alves RN, Anaciato P, Pousao-Ferreira P, Carvalho ML, Nunes ML, Rosa R, Marques, A. Will seabass quality change in a warmer ocean? *Food Research International* 2017, 97, 27-36.

Barcellos LJG, Kreutz LC, Koakoski G, Oliveira TA, Santos da Rosa JG, Fagundes M. Fish age instead of weight and size as a determining factor for time course differences in cortisol response to stress. *Physiology and Behavior* 2012, 107, 397-400.

Barton BA. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrated and Comparative Biology* 2002, 42, 517-525.

Beckman BR. Perspectives on concordant and discordant relations between insulin like growth factor 1 (IGF-1) and growth in fishes. *General and Comparative Endocrinology* 2001, 170(2), 233-252.

Beckman BR, Dickhoff WW. Plasticity of smolting in spring chinook salmon: Relation to growth and insulinlike growth factor-I. *Journal of Fish Biology* 1998, 53, 808-826.

Beckman BR, Shimizu M, Gadberry BA, Parkins PJ, Cooper KA. The effect of temperature change on the relations among plasma IGF-I, 41 kDa IGFBP and growth rate in postsmolt Coho Salmon. *Aquaculture* 2004, 241, 601-619.

Behnke RJ. Trout and salmon of North America. In: First edition. The Free Press, Simon and Schuster Inc., New York, NY, 2002, 67-135.

Benedito-Palos L, Saera-Vila A, Calduch-Giner JA, Kaushik S, Pérez-Sánchez J. Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): Networking of systemic and local components of GH/IGF axis. *Aquaculture* 2007, 267, 199-212.

Benedito-Palos L, Ballester-Lozano GF, Simó P, Karalazos V, Ortiz Á, Calduch-Giner J. Lasting effects of butyrate and low FM/FO diets on growth performance, blood haematology/biochemistry and molecular growth-related markers in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 2016, 454, 8-18.

Bergan-Roller HE, Sheridan MA. The growth hormone signaling system: Insights into coordinating the anabolic and catabolic actions of growth hormone. *General and Comparative Endocrinology* 2018, 258, 119-133.

Biga PR, Cain KD, Hardy RW, Schelling GT, Overturf K, Roberts SB, Goetz FW, Ott TL. Growth hormone differentially regulates muscle myostatin 1 and 2 and increases

circulating cortisol in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 2004, 138, 32-41.

Biga PR, Schelling GT, Hardy RW, Cain KD, Overturf K, Ott TL. The effects of recombinant bovine somatotropin (rbST) on tissue IGF-I, IGF-I receptor and GH mRNA levels in Rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*. 2004b, 135, 324-333.

Bildik A, Asıcı Ekren GS, Akdeniz G, Kırıl F. Effect of enviromental temperature on heat shock proteins (HSP30, HSP70, HSP90) and IGF-I mRNA expression in *Sparus aurata*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 2018, 116979, 1-11.

Bodart G. Reassessment of the impact of the GHRH/GH/IGF-1 somatotrope axis on developmental and functional immunology, Dr thesis, University of Liege Faculty of Medicine, Belçika 2017, 137.

Breau C, Cunjak RA, Peake SJ. Behaviour during elevated water temperatures: Can physiology explain movement of juvenile Atlantic salmon to cool water? *Journal of Animal Ecology* 2011, 80, 844-853.

Bromage NR, Porter MJR, Randall CF. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* 2001, 197, 63-98.

Butler AA, Le Roith D. Control of growth by the somatropic axis: growth hormone and the insulin like growth factors have related and independent roles. *Annual Review of Physiology* 2001, 63, 141.

Butler ST, Marr AL, Pelton SH, Radcliff RP, Lucy MC, Butler WR. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: Effects on expression of IGF-I and GH receptor. *Journal of Endocrinology* 2003, 176, 205-217.

Caelers A, Schmid AC, Hrusovsky A, Reinecke M. Insulin like growth factor II mRNA is expressed in neurones of the brain of the bony fish *Oreochromis mossambicus*, the tilapia. *European Journal of Neuroscience* 2003, 18, 355-363.

Caelers A, Berishvili G, Meli ML, Eppler E, Reinecke M. Establishment of a RT-PCR for the determination of absolute amounts of IGF-I and IGF-II gene expression in liver and extrahepatic sites of the tilapia. *General and Comparative Endocrinology* 2004, 137, 196-204.

- Canosa LF, Unniappan S, Peter RE.** Periprandial changes in growth hormone release in goldfish: Role of somatostatin, ghrelin, and gastrin-releasing peptide. *American Journal of Physiology Regular Integrative Comparative Physiology* 2005, 289, 125-133.
- Canosa LF, Chang JP.** Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *General and Comparative Endocrinology* 2007, 151, 1-26.
- Canosa LF, Stacey N, Peter RE.** Changes in brain mRNA levels of gonadotropin-releasing hormone, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and somatostatin during ovulatory luteinizing hormone and growth hormone surges in goldfish. *American Journal Physiology Regular Integrative Comparative Physiology* 2008, 295, 1815-1821.
- Cao MX, Chen J, Peng W, Wang YP, Liao LJ, Li YM, Trudeau VL, Zhu ZY, Hu W.** Effects of growth hormone over expression on reproduction in the common carp *Cyprinus carpio* L. *General and Comparative Endocrinology* 2014, 195, 47-57.
- Capilla E, Médale F, Navarro I, Panserat S, Vachot C, Kaushik S, Gutiérrez J.** Muscle insulin binding and plasma levels in relation to liver glucokinase activity, glucose metabolism and dietary carbohydrates in Rainbow trout. *Regulatory Peptides* 2003, 110(2), 123-132.
- Carvalho CS, Fernandes MN.** Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish (*Prochilodus scrofa*) at low and high pH. *Aquaculture* 2006, 251, 109-117.
- Castillo J, Codina M, Martínez ML, Navarro I, Gutiérrez J.** Metabolic and mitogenic effects of IGF-I and insulin on muscle cells of Rainbow trout. *American Journal Physiology Regular Integrative Comparative Physiology* 2004, 286(5), 935-41.
- Cengizler İ, Şahan A.** Determination of some blood parameters in Mirror Carps (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758), living in Seyhan Dam Lake and Seyhan River in Turkish. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2000, 24, 205-215.
- Cerdá-Reverter JM, Canosa LF.** Neuroendocrine Systems of the Fish Brain. In: Bernier NJ, Kraak GV, Farrell AP, Brauner CJ (eds), *Fish Neuroendocrinology, Fish Physiology Series*. Elsevier 28, Amsterdam, 2009, s 3-74.
- Chang JP, Wong AOL.** Growth hormone regulation in fish: a multifactorial model with hypothalamic, peripheral and local autocrine/paracrine signals. In: Bernier NJ, Kraak GV, Farrell AP, Brauner CJ (eds.), *Fish Neuroendocrinology, Fish Physiology Series*. Elsevier 28, Amsterdam, 2009, s 151-196.

- Chauvigné F, Gabillard JC, Weil C, Rescan PY.** Effect of refeeding on IGF-I, IGF-II, IGF-R, FGF-2, FGF-6 and myostatin mRNA expression in Rainbow trout myotomal muscle. *General and Comparative Endocrinology* 2003, 132, 209-215.
- Clayton PE, Banerjee I, Murray PG, Renehan AG.** Growth hormone, the insulin like growth factor axis, insulin and cancer risk. *Nature Reviews Endocrinology* 2011, 7, 11-24.
- Codina M, García D, Joan SG, Núria Montserrat, Chistyakova O, Navarro I, Gutiérrez J.** Metabolic and mitogenic effects of IGF-II in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) myocytes in culture and the role of IGF-II in the PI3K/Akt and MAPK signalling pathways. *General and Comparative Endocrinology* 2008, 157, 116-124.
- Costas B, Aragao C, Ruiz-Jarabo I, Vargas-Chacoff L, Arjona FJ, Mancera JM, Dinis MT, Conceic LEC.** Different environmental temperatures affect amino acid metabolism in the eurytherm teleost Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) as indicated by changes in plasma metabolites. *Amino Acids* 2012, 43, 327-335.
- Cowan M, Azpeleta C, López-Olmeda JF.** Rhythms in the endocrine system of fish: A review. *Journal of Comparative Physiology* 2017, 187(8), 1057-1089.
- Çelik EŞ.** Çanakkale Boğazı'ndan avlanan İskorpit Balığı (*Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758)'nın kan glikoz düzeyindeki aylık değişimler. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 2005, 22(1-2), 115.
- Dai XY, Zhang W, Zhuo ZJ, He JY, Yin Z.** Neuroendocrine regulation of somatic growth in fishes. *Science China Life Science* 2015, 58, 137-147.
- David PC, Nanette J, Pazdernik MR, Gehee M.** Polymerase Chain Reaction. In: *Molecular Biology* (Third Edition). Elsevier 6, İngiltere, 2018, s 168-198.
- David M, Shivakumar R, Mushigeri SB, Kuri RC.** Blood glucose and glycogen levels as indicators of stress in the freshwater fish, *Labeo rohita* under fenvalerate intoxication. *Journal of Ecotoxicology and Environmental Monitoring* 2005, 15, 1-5.
- Davis KB, Peterson BC.** The effect of temperature, stress, and cortisol on plasma IGF-I and IGFBPs in sunshine bass. *General and Comparative Endocrinology* 2006, 149, 219-225.
- De Jesus EG, Hirano T.** Changes in whole body concentrations of cortisol, thyroid hormones and sex steroid during early development of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *General and Comparative Endocrinology* 1992, 85, 55-61.

De Marinis L, Mancini A, Giampietro A, Gentilella R, Bianchi A, Perrelli M, Vezzosi C, Milardi D, Fusco A, Valle D. GH deficiency syndrome in elderly patients. *Journal of Endocrinological Investigation* 2002, 25, 40-41.

Deane EE, Woo NY. Modulation of fish growth hormone levels by salinity, temperature, pollutants and aquaculture related stress: A review. *Fish Biology and Fisheries* 2009, 19, 97-120.

Debnath S. On the physiology of Insulin like Growth Factor-I (IGF-I) peptide in bony fishes and its phylogenetic correlation in 30 different taxa of 14 families of teleosts. *Advances in Environmental Biology* 2010, 5(1), 31-52.

Dehkhoda F, Lee CMM, Medina J, Brooks AJ. The growth hormone receptor: Mechanism of receptor activation, cell signaling and physiological aspects. *Frontiers in Endocrinology* 2018, 9, 35.

Donaldson MR, Hinch SG, Jeffries KM, Patterson DA, Cooke SJ, Farrell AP, Miller KM. Species and sex specific responses and recovery of wild, mature pacific salmon to an exhaustive exercise and air exposure stressor. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2014, 173, 7-16.

Duan C. The insulin like growth factor system and its biological actions in fish. *American Zoologist* 1997, 37, 491-503.

Duan CM, Plisetskaya EM, Dickhoff WW. Expression of insulin-like growth factor I in normally and abnormally developing coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Endocrinology* 1995, 136, 446-452.

Edwards K, Saunders N. Real-Time PCR. In: Logan J, Edwards K, Saunders N (eds), *Current Technology and Applications*. Caister Academic Press, Londra, 2009, s 1-19.

Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A. Hepatic glucokinase and glucose-6 phosphatase responses to dietary glucose and starch in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles reared at two temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2008, 149, 80-86.

Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A. Rapid metabolic adaptation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles fed different carbohydrate sources after heat shock stress. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2016, 145, 73-81.

Eppler E, Berishvili G, Mazel P, Caelers A, Hwang G, Maclean N, Reinecke M. Distinct organ-specific up and down regulation of IGF-I and IGF-II mRNA in various organs of GH overexpressing transgenic Nile tilapia. *Transgenic Research* 2010, 19, 231-240.

Esmer A, Akbayır Ö. Kortizol. In: Uzmanlık Bitirme Sınavı ve TUS için Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi Kitabı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2012, s 9-10.

Fang L, Liang XF, Zhou Y. Programming effects of high-carbohydrate feeding of larvae on adult glucose metabolism in zebrafish, *Danio rerio*. *British Journal of Nutrition* 2014, 111, 808-818.

Fiess JC, Kunkel-Patterson A, Mathias L, Riley LG, Yancey PH, Hirano T, Grau EG Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 2007, 146, 252-264.

Figueroa J, Martín RS, Flores C, Grothusen H, Kausel G. Seasonal modulation of growth hormone mRNA and protein levels in carp pituitary: Evidence for two expressed genes. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 2005, 175, 185-192.

Fox BK, Breves JP, Hirano T, Grau EG. Effects of short and long term fasting factor I axis in the tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Domestic Animal Endocrinology* 2009, 37, 1-11.

Frank SJ. Receptor dimerization in GH and erythropoietin action-it takes two to tango, but how? *Endocrinology* 2002, 143(1), 2-10.

Fuentes E, Poblete E, Reyes AE, Vera MI, Alvarez M, Molina A. Dynamic expression pattern of the growth hormone receptor during early development the Chilean flounder. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2008, 150, 93-102.

Fuentes EN, Valdés JA, Molina A, Björnsson BT. Regulation of skeletal muscle growth in fish by the growth hormone Insulin like growth factor system. *General and Comparative Endocrinology* 2013, 192, 136-148.

Fukada H, Ozaki Y, Pierce AL, Adachi S, Yamauchi K, Hara A, Swanson P, Dickhoff WW. Salmon growth hormone receptor: Molecular cloning, ligand specificity and response to fasting. *General and Comparative Endocrinology* 2004, 139, 61-71.

Fürtbauer I, Heistermann M. Cortisol coregulation in fish. *Scientific Reports* 2016, 6, 1-7.

- Gabillard JC, Weil C, Rescan PY, Navarro I, Gutiérrez J, Le Bail PY.** Effects of environmental temperature on IGF1, IGF2, and IGF type I receptor expression in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 2003a, 133, 233-242.
- Gabillard JC, Weil C, Rescan PY, Navarro I, Gutiérrez J, Le Bail PY.** Environmental temperature increases plasma GH levels independently of nutritional status in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 2003b, 133, 17-26.
- Gabillard JC, Weil C, Rescan PY, Navarro I, Gutierrez J, Le Bail PY.** Does the GH/IGF system mediate the effect of water temperature on fish growth? *Cybiu* 2005, 29(2), 107-117.
- Gabillard JC, Yao K, Vandeputta M, Gutierrez J, Le Bail PY.** Differential expression of two GH Receptor mRNA following temperature change in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Endocrinology* 2006, 190, 29-37.
- Gatti R, De Palo EF, Antonelli G, Spinella P.** IGF-I/IGFBP system: Metabolism outline and physical exercise. *Journal of Endocrinology Investigation* 2012, 35, 699-707.
- Gerber R.J.L.** Physiological Response of Tigerfish and Smallmouth Yellowfish to Angling: Impact of Angling Duration, Fish Size, Fish Age, Sexual Maturity, Body Conditions and Temperature, MSc Thesis, *University of Johannesburg, South Africa* 2010, 80.
- Girod JP, Brotman DJ.** Does altered glucocorticoid homeostasis increase cardiovascular risk? *Cardiovascular Research*. 2004, 64, 217-226.
- Greenspan FS, Gardner DG.** Cortisole binding protein. In: *Basic and Clinical Endocrinology*. China, Lange Medical Books, 2004, s 559-565.
- Gutiérrez J, Navarro I, Planas JV, Montserrat N, Rojas RC, Chystiakova OV, Gabillard JC, Smith A, Chan SJ, Leibush NB.** Insulin and IGF receptors in fish. In: Reinecke M, Zaccone G, Kapoor BG (eds), *Fish Endocrinology*. Enfield, NH: Science Publishers, 2006, s 131–165.
- Guyton G, Hall I.** Tıbbi Fizyoloji Kitabı. In: *Nobel Tıp Kitapevleri*. 11. Basım, İstanbul, 2006, s 94.
- Günel T, Aydın K.** Real-Time PCR ve uygulama alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2009, 2(2), 43-45.

Hagemeister AL, Sheridan MA. Somatostatin inhibits hepatic growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I mRNA expression by activating the ERK and PI3K signaling pathways. *American Journal Physiology Regular Integrative Comparative Physiology* 2008, 295(2), 1-8.

Harbili S. İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF): Egzersiz metabolizması ve kas dokusu üzerine etkileri. *Genel Tıp Dergisi* 2008, 18(4), 177-184.

Herington AC, Brooks AJ. Growth hormone binding proteins. *Encyclopedia of Endocrine Diseases* 2004, 390-395.

Hevrøy EM, Waagbø R, Torstensen BE, Takle H, Stubhaug I, Jørgensen SM, Torgersen T, Tvenning L, Susort S, Breck O, Hansen T. Ghrelin is involved in voluntary anorexia in Atlantic salmon raised at elevated sea temperatures. *General and Comparative Endocrinology* 2012, 175, 118-134.

Hevrøy EM, Christine H, Gelder S, Shimizu M, Waagbø R, Breck O, Takle H, Sussort S, Hansen T. GH-IGF system regulation of attenuated muscle growth and lipolysis in Atlantic salmon reared at elevated sea temperatures. *Journal of Comparative Physiology* 2013, 183, 243-259.

Hevrøy EM, Christian K, Remø SC, Hansen T, Fukuda M, Thomas T, Vikeså V, Olsvik PA, Waagbø R, Shimizu M. Role of the GH-IGF-1 system in Atlantic salmon and Rainbow trout postsmolts at elevated water temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2015, Part A, 127-138.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio-Technology* 1992, 10(4), 413-417.

Hill JA, Kiessling A, Devlin RH. Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) transgenic for a growth hormone gene construct exhibit increased rates of hyperplasia and detectable levels of differential gene expression. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 2000, 57, 939-950.

Holly J, Perks C. Insulin-like growth factor physiology: What we have learned from human studies. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2012, 41, 249-63.

Hopkins CL, Unwin MJ. The effect of restricted springtime feeding on growth and maturation of freshwater reared chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). *Aquaculture Research* 1997, 28, 545-549.

Huang CW, Li YH, Hu SY, Chi JR, Lin GH, Lin CC, Gong HY, Chen JY, Chen RH, Chang SJ, Liu FG, Wu JL. Differential expression patterns of growth related microRNAs in the skeletal muscle of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Animal Science* 2012, 90, 4266-4279.

Huang JF, Xu QY, Chang YM. Effects of temperature and dietary protein on the growth performance and IGF-I mRNA expression of juvenile mirror carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Nutrition* 2015.

Imslund AK, Foss A, Roth B, Stefansson SO, Vikingstad E, Pedersen S, Sandvik T, Norberg B. Plasma insulin-like growth factor-I concentrations and growth in juvenile halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): Effects of photoperiods and feeding regimes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2018, 151, 66-70.

Iwama GK, Afonso L, Vijayan MM. ‘Stress in fish; Aqanet workshop on fish welfare’, Netherland, 2004, s 5.

Jaxion-Harm J, Ladich F. Effects of temperature change on cortisol release by common carp *Cyprinus carpio*. *Journal of Fish Biology* 2014, 84, 1221-1227.

Jiménez-Amilburu V, Salmerón C, Codina M, Navarro I, Capilla E, Gutiérrez J. Insulin like growth factors effects on the expression of myogenic regulatory factors in gilthead sea bream muscle cells. *General and Comparative Endocrinology* 2013, 188, 151-158.

Jorgensen JO, Krag M. Growth hormone and glucose homeostasis. *Hormone Research* 2014, 62(3), 51-55.

Kajimura S, Hirano T, Visitacion N, Moriyama S, Aida K, Grau EG. Dual mode of cortisol action on GH/IGF-I/IGFBP in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Endocrinology* 2003, 178, 91-99.

Kamangar BB, Rasaee MJ, Amiri BM. Correlations between circulating insulin like growth factor-I and thyroxine and cortisol hormone levels, and some biometrical traits in female brood stocks during the late stages of sex maturation and in juvenile Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 2007, 33, 249-257.

Karadağ C. Migren Hastalarında Borun Kalsiyum, Magnezyum, Adrenokortikotropik Hormon, Kortizol ve Siklik Adenozin Monofosfat ile İlişkisi, Uzmanlık tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2010, 77.

Katsumata N. Growth hormone binding protein (GHBP). *Journal of Japan Surgical Association* 2010, 68(7), 200-202.

Kim H, Barton E, Muja N, Yakar S, Pennisi P, LeRoith D. Intact insulin and insulin like growth factor-I receptor signaling is required for growth hormone effects on skeletal muscle growth and function in vivo. *Endocrinology* 2005, 146, 1772-1779.

Klement RJ, Fink MK. Dietary and pharmacological modification of the insulin IGF-1 system: Exploiting the full repertoire against cancer. *Oncogenesis* 2016, 5(2), 1-15.

Kling P, Jönsson E, Nilsen TO, Einarsdottir IE, Rønnestad I, Stefansson SO, Björnsson BT. The role of growth hormone in growth, lipid homeostasis, energy utilization and partitioning in Rainbow trout: Interactions with leptin, ghrelin and insulin like growth factor-I. *General and Comparative Endocrinology* 2012, 175(1), 153-162.

Koakoski G, Oliveira TA, Rosa JGS, Fagundes M, Kreutz LC, Barcellos LJG. Divergent time course of cortisol response to stress in fish of different ages. *Physiology and Behavior* 2012, 106, 129-32.

Koldkjær P, Pottinger TG, Perry SF, Cossins AR. Seasonality of the red blood cell stress response in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* 2004, 207, 357-367.

Kulkarni J, Gavriliadis E, Worsley R. Hormones and schizophrenia. *Handbook of Behavioral Neuroscience* 2016, 23, 463-480.

Kullgren A, Jutfelt F, Fontanillas R. The impact of temperature on the metabolome and endocrine metabolic signals in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 2013, 164, 44-53.

Kuradomi RY, Figueiredo MA, Lanes CFC, Rosa CE, Almeida DV, Maggioni R, Silva MDP, Marins LF. GH overexpression causes muscle hypertrophy independent from local IGF-I in a zebrafish transgenic model. *Transgenic Research* 2011, 20, 513-521.

Lam KS, Lee MF, Tam SP. Srivastava G. Gene expression of the receptor for growth hormone-releasing hormone is physiologically regulated by glucocorticoids and estrogen. *Neuroendocrinology* 1996, 63, 475-480.

Lazaro-Côté A, Sadoul B, Jackson LJ, Vijayan MM. Acute stress response of fathead minnows caged downstream of municipal wastewater treatment plants in the Bow River, Calgary. *Plos One* 2018, 13(6), 1-15.

Le Bail PY, Perez-Sanchez J, Yao H, Maisse G. Effect of GH treatment on salmonid growth: study of the variability of response. In: American Geophysical Union (ed), Aquaculture: fundamental and applied research. American Geophysical Union, Washington DC, 1993, s 173-197.

Le Blanc S, Höglund E, Gilmour KM, Currie S. Hormonal modulation of the heat shock response: Insights from fish. *The American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2012, 302, 184-192.

Leung LY, Kwong AK, Man AK, Woo NY. Direct actions of cortisol, thyroxine and growth hormone on IGF-I mRNA expression in sea bream hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2008, 151, 705-710.

Li D, Lou Q, Zhai G, Peng X, Cheng X, Dai X, Zhuo Z, Shang G, Jin X, Chen X, Han D, He J, Yin Z. Hyperplasia and cellularity changes in IGF-1 overexpressing skeletal muscle of crucian carp. *Endocrinology* 2014, 155, 2199-2212.

Li M, Greenaway J, Raine J, Petrik J, Hahnel A, Leatherland J. Growth hormone and insulin like growth factor gene expression prior to the development of the pituitary gland in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos reared at two temperatures. *Comparative Biochemistry Physiology Part A Molecular Integrative Physiology* 2006, 143, 514-522.

Li M, Leatherland J. Temperature and ration effects on components of the IGF system and growth performance of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) during the transition from late stage embryos to early stage juveniles. *General and Comparative Endocrinology* 2008, 155, 668-679.

Livak K, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001, 25(4), s 402-408.

Lowe CJ, Davison W. Plasma osmolarity, glucose concentration and erythrocyte responses of two Antarctic nototheniid fishes to acute and chronic thermal change. *Journal of Fish Biology* 2005, 67, 752-766.

Luckenbach JA, Murashigea R, Danielsa HV, Godwina J, Borski RJ. Temperature affects insulin-like growth factor I and growth of juvenile southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Comparative Biochemistry Physiology*, 2007, 146, 95-104.

Machluf Y, Gutnick A, Levkowitz G. Development of the zebrafish hypothalamus. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2011, 1220, 93-105.

- Madaro A, Folkedal O, Maiolo S, Alvanopoulou M, Olsen RE.** Effects of acclimation temperature on cortisol and oxygen consumption in Atlantic salmon (*Salmo salar*) post smolt exposed to acute stress. *Aquaculture* 2018, 497, 331-335.
- Madison BN, Tavakoli S, Kramer S, Bernier NJ.** Chronic cortisol and the regulation of food intake and the endocrine growth axis in Rainbow trout. *Journal of Endocrinology* 2015, 226, 103-119.
- Marco AL, Cindy MR, Alfredo M.** Somatic growth effects of intramuscular injection of growth hormone in androgen treated juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Perciformes: Cichlidae). *Revista de Biologia Tropical* 2013, 61(1), 203-212.
- Mark A, Sheridan Alison LH.** Somatostatin and somatostatin receptors in fish growth. *General and Comparative Endocrinology* 2010, 167(3), 360-365.
- Mark E, Bernard PS.** Introduction to endocrinology: The Hypothalamic-Pituitary axis. In: Goodman & Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics (13e). Section 5, Chapter 42, United States, McGraw-Hill Education, 2018.
- Martínez-Porchas M, Martínez-Córdova LR, Enriquez RR.** Cortisol and glucose: Reliable indicators of fish stress? *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 2009, 4(2), 158-178.
- Maugars G.** Endocrine Regulation of Early Sexual Maturation in Male Atlantic Salmon Parr, Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences Umeå, Swedish 2007, 48.
- Mauvault AL, Barbosa V, Alves R, Custodio A, Anacleto P, Repolho T, Ferreira PP, Rosa R, Marques A, Diniz M.** Water temperature modifies the acute stress response of European sea bass. *Journal of Terman Biology* 2017, 586, 551-558.
- McCormick SD.** Smolt physiology and endocrinology. *Euryhaline Fishes* 2012, 199-251.
- McPherson MJ, Moller SG.** PCR. In: PCR Second Edition. MPG Books Limited, United Kingdom, 2006, s 1-300.
- Mert M.** Cushing Sendromu Tanısında Yeni Bir Tanı Yöntemi Olarak Tükürük Kortizolü, Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2009, 73.
- Mingarro M, Vega-Rubin DC, Astola A, Pendon C, Valdivia MM, Pérez-Sánchez J.** Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): The growth hormone and somatolactin paradigm. *General and Comparative Endocrinology* 128, 102-111.

- Montserrat N, Capilla E, Navarro I, Gutiérrez J.** Metabolic effects of insulin and IGFs on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) muscle cells. *Frontiers in Endocrinology* 2012, 3, 55.
- Moriyama S, Ayson FG, Kawauchi H.** Growth regulation by Insulin like growth factor-I in fish. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2000, 64(8), 1553-1562.
- Moriyama S, Yamaguchi K, Takasawa T, Chiba H, Kawauchi H.** Insulin like growth factor-I of Japanese eel, *Anguilla japonica*: cDNA cloning, tissue distribution and expression after treatment with growth hormone and seawater acclimation. *Fish Physiology and Biochemistry* 2006, 32, 189-201.
- Myers MJ, Litz B, Shannon A.** The effects of age, sex, season and geographic region on circulating serum cortisol concentrations in threatened and endangered Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). *General and Comparative Endocrinology* 2010, 165, 72-77.
- Narum SR, Campbell NR, Kozfkay CC, Meyer KA.** Adaptation of redband trout in desert and montane environments. *Molecular Ecology Research* 2010, 19, 4622-4637.
- O'Brien KM.** Mitochondrial biogenesis in cold bodied fishes. *Journal of Experimental Biology* 214, 275-285.
- Onat T, Emerk K, Sözmen EY.** İnsan Biyokimyası. In: Palme yayıncılık, Ankara, 2006, s 813.
- Öğüt H.** Balıklarda Stres. In: Karataş M (eds), Balık biyolojisi araştırma yöntemleri, Nobel Yayıncılık, Ankara, 2005, s 498.
- Panicz R, Sadowski J, Schütze H, Bergmann SM.** Temperature influence on key players of the somatotropic axis of tench, *Tinca tinca* (actinopterygii: cypriniformes: cyprinidae). *Acta Ichthyologica Et Piscatoria* 2015, 45(4), 335-342.
- Pankhurst NW, King HR.** Temperature and salmonid reproduction: Implications for aquaculture. *Journal of Fish Biology* 2010, 76, 69-85.
- Pe'rez-Sa'nchez J, Smal J, Le Bail PY.** Location and characterization of growth hormone binding sites in the central nervous system of a teleost fish (*Oncorhynchus mykiss*). *Growth Regulation* 1991, 1, 145-152.
- Pérez-Sánchez J, Marti Palanca HP, Le Bail Y.** Seasonal changes in circulating growth hormone (GH), hepatic GH binding protein and plasma insülin like growth factor-I

immunoreactivity in a fish, gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Fish Physiology and Biochemistry* 1994, 13, 199-208.

Perrot V, Moiseeva EB, Gozes Y, Chan SJ, Funkenstein B. Insulin like growth factor receptors and their ligands in gonads of a hermaphroditic species, the gilthead seabream (*Sparus aurata*): Expression and cellular localization. *Biology of Reproduction* 2000, 63, 229-241.

Peterson BC, Small BC. Effects of fasting on circulating IGF-binding proteins, glucose and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Domestic Animal Endocrinology* 2004, 26(3), 231-240.

Peterson BC, Waldbieser GC, Bilodeau L. IGF-I and IGF-II mRNA expression in slow and fast growing families of USDA103 channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 2004, 139, 317-323.

Pickford GE, Atz JW. Physiology of the Pituitary Gland of Fishes. In: New York Zoological Society. New York, 1957.

Picha ME, Turano MJ, Beckman BR, Borski RJ. Endocrine biomarkers of growth and applications to aquaculture: A minireview of growth hormone, insulin like growth factor-I (IGF-1) and IGFBP as potential growth indicators in fish. *North American Journal of Aquaculture* 2008, 70, 196-211.

Picha ME, Strom CN, Riley LG, Walker AA, Won ET, Johnstone WM, Borski RJ. Plasma ghrelin and growth hormone regulation in response to metabolic state in hybrid striped bass: Effects of feeding, ghrelin and insulin like growth factor-I on in vivo and in vitro GH secretion. *General and Comparative Endocrinology* 2009, 161(3), 365-72.

Pierce AL, Dickey JT, Felli L, Swanson P, Dickhoff WW. Metabolic hormones regulate basal and growth hormone-dependent igf-2 mRNA level in primary cultured coho salmon hepatocytes: Effects of insulin, glucagon, dexamethasone and triiodothyronine. *Journal of Endocrinology* 2010, 204, 331-339.

Pierce AL, Fukada H, Dickhoff WW. Metabolic hormones modulate the effect of growth hormone (GH) on insulin like growth factor-I (IGF-I) mRNA level in primary culture of salmon hepatocytes. *Journal of Endocrinology* 2005, 184, 341-349.

- Pierce AL, Breves JP, Moriyama S, Hirano T, Grau EG.** Differential regulation of Igf-1 and Igf-2 mRNA levels in tilapia hepatocytes: Effects of insulin and cortisol on GH sensitivity. *Journal of Endocrinology* 2011, 211, 201-210.
- Poppinga J, Kittilson J, Mc Cormick SD, Sher M.** Effects of somatostatin on the growth hormone insulin like growth factor axis and seawater adaptation of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 2007, 273, 312-319.
- Portner HO.** Cellular Energy Utilization: Environmental influences on metabolism. In: Farrell AP (ed), *Encyclopedia Of Fish Physiology: From Genome To Environment*. Academic Press, Canada, 2001, s 1645-1651.
- Pottinger TG, Rand-Weaver M, Sumpter JP.** Overwinter fasting and re-feeding in Rainbow trout: Plasma growth hormone and cortisol levels in relation to energy mobilization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 2003, 136, 403-417.
- Radaelli G, Patruno M, Maccatrozzo L, Funkenstein B.** Expression and cellular localization of insulin like growth factor-II protein and mRNA in *Sparus aurata* during development. *Journal of Endocrinology* 2003, 178, 285-299.
- Reindl K, Sheridan MA.** Peripheral regulation of the growth hormone insulin like growth factor system in fish and other vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2012, 163(3-4), 231-245.
- Reinecke, M.** Influences of the environment on the endocrine and paracrine fish growth hormone insulin like growth factor-I system. *Journal of Fish Biology* 2010 76, 1233–1254.
- Reinecke M, Björnsson BT, Walton W, Dickho V, Agustsson SD, Navarro I, Power DB, Gutiérrez J.** Growth hormone and insulin like growth factors in fish: Where we are and where to go. *General and Comparative Endocrinology* 2005, 142, 20-24.
- Ricordel MJ, Smal J, Le Bail PY.** Application of a recombinant cichlid growth hormone radioimmunoassay to measure native GH in tilapia *Oreochromis niloticus* bred at different temperatures. *Aquatic Living Resources* 1995, 8, 153-160.
- Rishikesh SD, Tilak D, Debnatha D, Yengkokpama S, Pala AK.** Metabolic and cellular stress responses of catfish, *Horabagrus brachysoma* (Günther) acclimated to increasing temperatures. *Journal of Thermal Biology* 2017, 65, 32-40.

Rius-Francino M, Acerete L, Jiménez-Amilburu V, Capilla E, Navarro I, Gutiérrez J. Differential effects on proliferation of GH and IGFs in sea bream (*Sparus aurata*) cultured myocytes. *General and Comparative Endocrinology* 2011, 172(1), 44-49.

Rodnick KJ, Gamperl AK, Lizars KR, Bennett MT, Rausch RN, Keeley ER. Thermal tolerance and metabolic physiology among redband trout populations in South eastern Oregon. *Journal of Fish Biology*, 2004, 64, 310-335.

Rosenfeld RG. Insulin like growth factors and the basis of growth. *The New England Journal of Medicine* 2003, 349(23), 2184-6.

Rotllant J, Balm PHM, Wendelaar-Bonga SE, Pe´rez-Sa´nchez J, Tort L. A drop in ambient temperature results in a transient reduction of interrenal ACTH responsiveness in the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 2000, 23, 265-273.

Rottmann RW, Francis-Floyd R, Durborow R. The role of stress in fish disease. In: SRAC. Southern Regional Aquaculture Center Publication, United States, 1992, s 1-4.

Saera-Vila A, Calduch-Giner JA, Pe´rez-Sa´nchez J. Co-expression of IGFs and GH receptors (GHRs) in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): Sequence analysis of the GHR flanking region. *Journal of Endocrinology* 2007, 194, 361-372.

Saera-Vila A, Calduch-Giner JA, Prunet P, Pérez-Sánchez J. Dynamics of liver GH/IGF axis and selected stress markers in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to acute confinement: Differential stress response of growth hormone receptors. *Comparative and Biochemistry Physiology A Molecular Integrative Physiology* 2009b. 54(2), 197-203.

Samarasa A, Papandroulakisb N, Likaa K, Pavlidisa M. Water temperature modifies the acute stress response of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. (1758). *Journal of Thermal Biology* 2018, 78, 84-91.

Schultz I. Therapeutic systems for Insulin-like growth factor-I, Doctorial Thesis, Universität Würzburg, Germany 2015, s 175.

Scott AP, Ellis T. Measurement of fish steroids in water. *General and Comparative Endocrinology* 2007, 153, 392-400.

Shahjahan MD, Kitahashi T, Ando H. Temperature affects sexual maturation through the control of kisspeptin, kisspeptin receptor, GnRH and GTH subunit gene expression in the grass puffer during the spawning season. *General and Comparative Endocrinology* 2017, 243, 138-145.

- Shamblott MJ, Cheng CM, Bolt D, Chen TT.** Appearance of insulin like growth factor mRNA in the liver and pyloric ceca of a teleost in response to exogenous growth hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, 92, 6943-6946.
- Sheridan MA, Hagemeister AL.** Somatostatin and somatostatin receptors in fish growth. *General and Comparative Endocrinology* 2009, 167, 360-365.
- Sheriff MJ, Dantzer B, Delehanty B, Palme R, Boonstra R.** Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia* 2011, 166, 869-887.
- Shoshana Y, Adamo ML.** Insulin-like growth factor-1 physiology: Lessons from mouse models. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2012, 41, 231-47.
- Shrimpton JM, Björnsson BTH, McCormick SD.** Can Atlantic salmon smolt twice? Endocrine and biochemical changes during smolting. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 2000, 57, 1969-1976.
- Silverstein JT, Shearer KD, Dickhoff WW, Plisetskaya EM.** Regulation of nutrient intake and energy balance in salmon. *Aquaculture* 1999, 177, 161-169.
- Simontacchi C, Poltronieri C, Carraro C, Bertotto D, Xiccato G, Trocino A.** Alternative stress indicators in sea bass *Dicentrarchus labrax*, L. *Journal of Fish Biology* 2008, 72, 747-752.
- Singh AK, Lal B.** Seasonal and circadian time dependent dual action of GH on somatic growth and ovarian development in the Asian catfish, *Clarias batrachus* (Linn.): Role of temperature. *General and Comparative Endocrinology* 2008, 159, 98-106.
- Sirkecioğlu AN.** Farklı Yağ Kaynakları ve Su Sıcaklığının *Oncorhynchus mykiss* Yavrularının Büyüme Performansı, Lipit Metabolizması ve Bazı Genlerin mRNA Ekspresyonu Üzerine Etkisi, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum 2011, 198.
- Sloat MR, Reeves GH.** Individual condition, standart metabolic rate and rearing temperature influence steelhead and Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) life histories. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 2014, 71(4), 491-501.
- Smith GR, Stearly RF.** The classification and scientific names of Rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 1989, 78, 153-161.

- Sohm F, Manfroid I, Pezet A, Rentier-Delrue F, Rand Weaver M, Kelly PA, Boeuf G, Postel-Vinay MC, Luze A, Edery M.** Identification and modulation of a growth hormone-binding protein in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma during seawater adaptation. *General and Comparative Endocrinology* 1998, 111, 216-224.
- Sözbilir BN, Bayşu N.** Biyokimya. In: Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 2008, s 361-363.
- Stephen D, McCormick J, Shrimpton M, Moriyama S, Björnsson BT.** Differential hormonal responses of Atlantic salmon parr and smolt to increased daylength: A possible developmental basis for smolting. *Aquaculture* 2007, 273, 337-344.
- Tanck MW, Booms T, Eding GHR, Bonga EH, Komen J.** Cold shocks: A stressor for Common carp. *Journal of Fish Biology* 2000, 57, 881-894.
- Taylor JF, Migaud H, Porter MJ, Bromage NR.** Photoperiod influences growth rate and plasma insulin-like growth factor-I levels in juvenile Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology* 2005, 142, 169-185.
- Taylor JF, Porter MJR, Bromage NR, Migaud H.** Relationships between environmental changes, maturity, growth rate and plasma insulin like growth factor-I (IGF-I) in female Rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology* 2008, 155, 257-270.
- Tietz.** Tietz Textbook of Clinical Chemistry. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (ed). Elsevier, United States 1994.
- Tonsfeldt KJ, Chappell PE.** Clocks on top: the role of the circadian clock in the hypothalamic and pituitary regulation of endocrine physiology. *Molecular Cell Endocrinology* 2012, 349, 3-12.
- Tort L.** Impact of Stress in Health and Reproduction. In: Farrell AP (ed), Encyclopedia Of Fish Physiology: From Genome To Environment. Elsevier, Canada, 2011, s 2273.
- Trenzado CE, Carrick TR, Pottinger TG.** Divergence of endocrine and metabolic responses to stress in two Rainbow trout lines selected for differing cortisol responsiveness to stress. *General and Comparative Endocrinology* 2003, 133, 332-340.
- Tse DLY, Tse MCL, Chan CB, Deng L, Zhang WM, Lin HR, Cheng CHK.** Seabream growth hormone receptor: Molecular cloning and functional studies of the fulllength cDNA and tissue expression of two alternatively spliced forms. *Biochimica Biophysica Acta* 2003, 1625, 64-76.

- Valdes JA, Einarsdottir IE, Fuentes EN, Alvarez M, Molina A, Björnsson BTH.** Inherent growth hormone resistance in the skeletal muscle of the fine flounder is modulated by nutritional status and is characterized by high contents of truncated GHR, impairment in the JAK2/STAT5 signaling pathway and low IGF-I expression. *Endocrinology* 2012a, 153, 283-294.
- Van Ham EH.** The Physiology of Juvenile Turbot (*Scophthalmus maximus*, *Rafinesque*) and Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*, *L.*) under Different Stress Conditions, PhD thesis, Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen, Holland 2003, s 210.
- Vargas-Chacoff L, Arjona FJ, Ruiz-Jarabo I, Pa´scoa I, Gonçalves O, Marti´n del Río MP, Mancera JM.** Seasonal variation in osmoregulatory and metabolic parameters in earthen pond cultured gilthead sea bream *Sparus auratus*. *Aquaculture Research* 2009a, 40, 1279-1290.
- Vera Cruz EM, Brown CL, Luckenbach JA, Picha ME, Bolivar RB, Borski RJ.** Insulin like growth factor-I cDNA cloning, gene expression and potential use as a growth rate indicator in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 2006, 251, 585-595.
- Vera Cruz EM, Brown CL.** Influence of the photoperiod on growth rate and insulin like growth factor-I gene expression in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology* 2009, 75, 130-141.
- Very NM, Kittilson JD, Klein SE, Sheridan MA.** Somatostatin inhibits basal and growth hormone stimulated hepatic insulin like growth factor-I production. *Molecular Cell Endocrinology* 2008, 281(1-2), 19-26.
- Vijayakumar A, Novosyadlyy R, Wu Y, Yakar S, LeRoith D.** Biological effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Growth Hormone and IGF Research* 2010, 20(1), 1-7.
- Vijayan MM, Aluru N, Leatherland JF.** Stress response and the role of cortisol. In: Leatherland JF, Woo PTK (ed). *Fish diseases and disorders*. Wallingford: CAB International, Canada, 2010, s 182-201.
- Vong QP, Chan KM, Cheng CH.** Quantification of common carp (*Cyprinus carpio*) IGF-I and IGF-II mRNA by real-time PCR: Differential regulation of expression by GH. *Journal of Endocrinology* 2003, 178, 513-521.

Wagner T, Congleton JL. Blood chemistry correlates of nutritional condition, tissue damage and stress in migrating juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 2004, 61, 1066-1074.

Wargelius A, Fjellidal PG, Benedet S, Hansen T, Bjornsson BT, Nordgarden U. A peak in GH receptor expression is associated with growth activation in Atlantic salmon vertebrae, while upregulation of Igf-I receptor expression is related to increased bone density. *General and Comparative Endocrinology* 2005, 142, 163-168.

Weil JC, Rescan PY, Navarro I, Gutierrez J, Le Bail PY. Effects of environmental temperature on IGF1, IGF2 and IGF type I receptor expression in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology* 2003a, 133, 233-242.

Wendelaar-Bonga S.E. Hormonal response to stress. In: Farrel AP (ed), *Encyclopedia of Fish: Fish Physiology From Genome to Environment*. Academic Press, Canada, 2011, s 1515-1523.

Wenger M. Developmental oestrogen exposure differentially modulates IGF-I and TNF- α expression levels in immune organs of *Yersinia ruckeri* challenged young adult Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General Comparative Endocrinology* 2014, 205, 168-175.

Wilkinson RJ, Porter M, Woolcott H, Longland R, Carragher JF. Effects of aquaculture related stressors and nutritional restriction on circulating growth factors (GH, IGF-I and IGF-II) in Atlantic salmon and Rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2006, 145A 214-224.

Won ET, Borski RJ. Endocrine regulation of compensatory growth in fish. *Frontiers in Endocrinology* 2013, 4, 74.

Wood AW, Duan C, Bern HA. Insulin like growth factor signaling in fish. *International Review of Cytology* 2005, 243, 215-285.

Wootton R. Growth: Environmental Effects. In: Farrell AP (ed), *Encyclopedia of fish physiology: From genome to environment*. Academic Press, Canada, 2011, s 1629-1635.

Yaseen QK, Hameed UR, Muhammad N, Munir A. Artificial feed for Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in district Swat Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 2016, 4(5), 155-158.

Yom Din S, Hurvitz A, Goldberg D, Jackson K, Levavi-Sivan B, Degani G. Cloning of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) growth hormone and insulin like growth factor I

and their expression in male and female fish during the first period of growth. *Journal of Endocrinological Investigation* 2008, 31(3), 201-10.

Zarejabad AM, Pouralimotlagh SM, Bastami KD. Effects of rearing temperature on hematological and biochemical parameters of great sturgeon (*Huso huso Linnaeus, 1758*) juvenile. *Comparative Clinical Pathology* 2010, 19, 367-371.

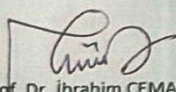
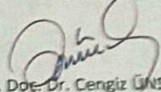
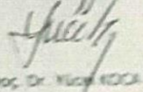
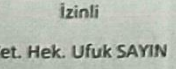
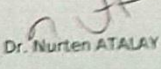
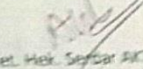
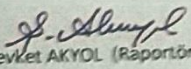
Zohar Y, Muñoz-Cueto JA, Elizur A, Kah O. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 2010, 165, 438-455.

Zou Z, Kamei H, Modi Z, Duan C. Zebrafish IGF genes: Gene duplication, conservation and divergence and novel roles in midline and notochord development. *Plos One* 2009, 4, 1-12.



EKLER

Ek 1: Etik Kurul Raporu

	T.C. ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (ADÜ-HADYEK)	
		Aydın, 9 Ekim 2014
Oturum	: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2014 Yılı IX. Oturumu	
Sayı	: 64583101/2014/140	
Proje Başlığı	: Gökkuşuğu alabalıklarında (Oncorhynchus mykiss) büyüme genlerinin (IGM), (IGF-1), (IGF-2) ekspresyonu ile serum kortizol düzeyleri üzerine yaş ve mevsimsel değişimlerin etkisi	
Proje Yürütücüsü	: Ayşegül BİLDİK	
Proje Ekibi	: Hakan TEKELİ	
Hayvan Çalışması	Bu çalışmanın hiçbir bölümünde: - İnsan embriosu ve fötüsü kullanılması - İnsan embriosu ve fötüsü dokularının kullanılması - Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması İnsanlarda araştırma İnsan olmayan primatların kullanılması Transgenik hayvanların kullanılması Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.	
Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.		
 Prof. Dr. İbrahim CEMAL (Üye)	 Yrd. Doç. Dr. Cengiz ÜNSAL (Üye)	 Doç. Dr. Yücel DOĞAL (Üye)
 Vet. Hek. Ufuk SAYIN (Üye)	 Dr. Nürten ATALAY (Üye)	 Vet. Hek. Seydi AKTAŞ (Üye)
 Şevket AKYOL (Raporör)		

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : TEKELİ Hakan
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : İZMİR / 05.01.1985
Telefon : 0554-321-11-16
E-mail : hakantekeli85@hotmail.com/htekeli@mehmetakif.edu.tr
Yabancı Dil : KPDS: 62.5/YÖKDİL: 72.5

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora		
Y. Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	2012
Lisans	Ege Üniversitesi (Biyoloji Bölümü)	2009

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2012-	Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi	Öğr. Gör.

AKADEMİK YAYINLAR

MAKALELER

1- SCI, SSCI ve AHCI tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar dışındaki makale

Sürmeli E, **Tekeli H**, Kırıl F. Measurement of asymmetric dimethylarginine, nitric oxide levels and total antioxidant capacity in experimental diabetic rats. *Medycyna Weterynaryjna* 2017, 73 (7), 418-421.

2- SCI, SSCI ve AHCI dışındaki indeks ve özler tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar dışındaki makale

Tekeli H, Kırıl F, Bildik A, Yılmaz M, Kaçamaklı Z. Effect of aging of on enzymatic and non-enzymatic antioxidant status in Saanen Goats. *Veterinarija Ir Zootechnika* 2015, 71 (93), 1-5.

Tekeli H, Bildik A. Karbon tetraklorür ile oluşturulan karaciğer hasarında Glutasyon (GSH) ve Glutasyon S-Transferaz (GST) aktivitesi üzerine N-Asetil sisteinin etkisi. *Balıkesir Health Sciences Journal* 2016, 5 (2), 83-87.

3- SCI, SSCI ve AHCI dışındaki indeks ve özler tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayın

Tekeli H, Tosun G, Bildik A, Ekren G, Kırıl F, Beceriklisoy HB. Effects of enzymatic antioxidant parameters of boric acid application in ovariectomized rats. *Journal of Cell Membranes and Free Radical Research* 2014, 6 (1), 412.

Tekeli H, Ural M, Ulutaş PA, Kırıl F, Kırtas AI. Effect of *Caparis Spinosa L.* extraxt on acute-phase proteins and trace elements levels in rats with fed high lipid diet. *Clinical Chemical Labaratory Medicine* 2014, 52,1760.

BİLDİRİLER

1-Uluslararası kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda sunularak, programda yer alan, özet metin olarak yayımlanan bildiri

Sözel Bildiri:

Tekeli H, Bildik A. Farklı mevsim sıcaklığı ve yaş gökkuşağı alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) büyüme faktör genlerini (GHR, IGF-1, IGF-2) nasıl etkiler? 1. Uluslararası Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi 15.04.2018.

Tekeli H, Taş F. Türkiye'deki üniversitelerde yer alan eczane hizmetleri programına genel bakış. 1. Uluslararası Sağlık Bilimleri ve Yaşam Kongresi 1st International Health Science and Life Congress (IHSLC 2018) 02.05.2018.

2- Uluslararası kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda sunularak, programda yer alan poster bildirisi

Poster Bildirisi:

Tekeli H, Kırıl F, Bildik A, Yılmaz M, Kaçamaklı Z. Effect of aging of on enzymatic and non-enzymatic antioxidant status in Saanen Goats. European Regional Conference on Goats 2013.

Tekeli H, Tosun G, Bildik A, Ekren G, Kırıl F, Beceriklisoy HB. Effects of enzymatic antioxidant parameters of boric acid application in ovariectomized rats. 5. Uluslararası Hücre Zarları ve Oksidatif Stres Kongresi 9-12 Eylül 2014.

Tekeli H, Ural M, Ulutaş PA, Kırıl F, Kırtas AI Effect of *Caparis Spinosa L.* extract on acute-phase proteins and trace elements levels in rats with fed high lipid diet. IFCC WorldLab Istanbul 22-26 Haziran 2014.

3- Ulusal kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda sunularak, programda yer alan poster bildirisi

Tekeli H, Bildik A. Karbon tetraklorür ile oluşturulan karaciğer hasarında Glutasyon (GSH) ve Glutasyon S-Transferaz (GST) aktivitesi üzerine N-Asetil sisteinin etkisi. 6. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi 2013.

4- Alınan Eğitimler ve Sertifikalar

Bilimsel Araştırmalarda Deney Hayvanları Kullanım Kursu - MAKÜ-HADYEK - 2013

Uygulamalı Moleküler Genetik Kursu - İstanbul Üniversitesi - 2013

ISO 9001:2000 Kalite Yönetim Sistemi Temel Eğitimi - Avrasya Uluslararası Eğitim ve Danışmanlık - 2007

ISO 9001:2000 İç Tetkikçi Eğitimi - Avrasya Uluslararası Eğitim ve Danışmanlık - 2007

Ulusal Üniversiteli Girişimciler Zirvesi - Üniversiteli Girişimciler Ortak Platformu - 2007