



**Demir Sülfat Heptahidrat'ın Alabalık (Onchorhyncus Mykiss) Yem Rasyonlarına İlavesinin Büyüme, Antioksidan Enzimler ve Termal Stres Üzerine Olan Etkileri**

**Program Kodu:1002**

**Proje No:1230607**

**Proje Yürütücüsü:  
ECE EVLİYAOĞLU**

**Araştırmacı(lar)**

Doç. Dr. HATİCE ASUMAN YILMAZ  
Prof. Dr. GÜLÜZAR ATLI DEMİRAY  
SERDAR KİLERCİOĞLU

**Danışman(lar)**

Prof. Dr. ORHAN TUFAN EROLDOĞAN

**ARALIK 2023  
ANKARA**



## ÖNSÖZ

Bu proje halihazırda yürütülmekte olan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen 'FDK-2020-12915' nolu, 'Demir sülfat heptahidratın Alabalık (*Onchorhynchus mykiss*) yem rasyonlarına ilavesinin büyüme, antioksidan enzimler ve termal stres üzerine olan etkileri' başlıklı doktora projesine destek sağlamıştır. Bu proje ticari önemi yüksek gökkuşaağı alabalığının bitkisel bazlı yem formülasyonlarına demir sülfat heptahidrat ilavesinin etkilerini konu almaktadır. Söz konusu çalışmamızın ilk aşamasında demirin alabalıkların büyüme performansında, besinsel kompozisyonuna, sindirilebilirliğe, demir metabolizmasına ve iştahla ilgili belirlenen genlerin ekspresyonlara etkisi araştırılmış ve yayına dönüştürülmüştür (doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737884).

Projenin devamında demirin gökkuşaağı alabalığında primer antioksidan enzimlere ve bağışıklıkla ilgili belirlenen genlere etkisi ile termal strese karşı oluşturulan yanıt araştırılmıştır. 1002-B kapsamında destek başvurusu yapılan bu çalışma ile planlanan araştırmanın gen ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Başarılı bir şekilde sonuçlandırılarak sonuç raporu hazırlanmıştır. Proje çalışmasına desteğinden dolayı (Proje numarası:123O607), Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkür ederiz.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
TABLolar DİZİNİ.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	IV
ÖZET .....	V
ABSTRACT.....	VI
SONUÇ RAPORU ANA METNİ.....	1
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ .....	1
2.1. HSP70, HSP90, IL1 $\beta$ ve Cas3'ün balık fizyolojisi üzerindeki etkisi.....	2
2.2. Termal Stresin Balık Fizyolojisi Üzerindeki Etkileri .... <b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>	
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	5
3. 1. Gereç.....	5
3.1.1. Deneme Balıklarının Alıştırılması ve Etik Uygulamalar .....	5
3. 2. Yöntem .....	5
3.2.1. Deneme Dizaynı .....	5
3.2.1.1. Besleme Denemesi.....	5
3.2.1.2. Termal stres denemesi.....	6
3.2.2. Deneme yemlerinin hazırlanması .....	7
3.2.3. Örneklemelerin Yapılması .....	8
3.2.4. Analizler.....	8
3.2.4.1. Farklı Miktarda Demir İçeren Deneme Yemleri İle Beslenen Alabalıklarda Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi.....	8
3.2.4.2. İstatistik Analizler .....	9
4. BULGULAR .....	10
4.1. Karaciğer Dokularında HSP70, HSP90, IL1 $\beta$ ve Cas3 genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri .....	100
4.1.1. Karaciğer Dokularında HSP70 geninin mRNA ekspresyon seviyeleri .....	10
4.1.2. Karaciğer Dokularında HSP90 geninin mRNA ekspresyon seviyeleri .....	10
4.1.3. Karaciğer Dokularında IL1 $\beta$ geninin mRNA ekspresyon seviyeleri.....	11
4.1.4. Karaciğer Dokularında Cas3 geninin mRNA ekspresyon seviyeleri .....	12
5. TARTIŞMA.....	13
5.1. Isı şoku proteinlerinin (HSP70 ve HSP90) değerlendirilmesi.....	13
5.2. IL1- $\beta$ mrna ekspresyonlarının değerlendirilmesi: .....	14
5.3. Cas3 mrna ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi .....	15
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	16

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Denemede kullanılan jüvenil alabalıklar ( <i>Onchorhynchus mykiss</i> ) için oluşturulmuş yem formülasyonu .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
Tablo 2. Denemede kullanılan gerçek zamanlı PCR analizi için kullanılan primerlerin sekansları .....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1. Deneme dizaynı ve araştırılan parametreler..... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
- Şekil 2. Farklı deneme yemleri ile 60 gün doyunca beslenmiş gökkuşuğu alabalıklarının (*Onchorhyncus mykiss*) karaciğerlerindeki HSP70 gen ekspresyonları. **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.0**
- Şekil 3. Farklı deneme yemleri ile 60 gün doyunca beslenmiş gökkuşuğu alabalıklarının (*Onchorhyncus mykiss*) karaciğerlerindeki HSP90 gen ekspresyonları. **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.1**
- Şekil 4. Farklı deneme yemleri ile 60 gün doyunca beslenmiş gökkuşuğu alabalıklarının (*Onchorhyncus mykiss*) karaciğerlerindeki IL1 $\beta$  gen ekspresyonları. **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.2**
- Şekil 5. Farklı deneme yemleri ile 60 gün doyunca beslenmiş gökkuşuğu alabalıklarının (*Onchorhyncus mykiss*) karaciğerlerindeki CAS3 gen ekspresyonları. **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.3**

## ÖZET

Bu çalışmada düşük oranda balık unu içeren (%10) gökkuşığı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) yemlerine üç farklı dozda 150 (Fe150), 300 (Fe300) ve 600 (Fe600) mg Fe/kg yem dozlarında demir ilavesinin ( $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  formunda) HSP70, HSP 90, IL1- $\beta$  ve Cas3 gen ekspresyonlarına etkisi incelenmiştir. Bu gruplara ek olarak demir ilavesinin etkisini karşılaştırabilmek için demir eklenmeyen sadece hammaddelerden demir gelen grup (Fe0) ve ticari yemle (Skreting, Norway) beslenmiş (CMF) gruplar oluşturulmuştur. Daha sonra bu yemlerle 60 gün beslenen balıkların su sıcaklığı günde 1°C arttırarak, 7 günde 17°C'den 24°C'ye kadar çıkartılarak termal stres yanıtları karşılaştırılmıştır.

Besleme finali sonunda en yüksek HSP70 gen ekspresyon seviyesi Fe300 grubunda termal stres sonrasında ise Fe150 grubunda gözlenmiştir. Termal stres sonrasında bu gruplarda HSP70 gen ekspresyonunun azalmıştır. Besleme finali sonunda HSP90 gen ekspresyonu gruplar arasında farklılık göstermemiş ancak termal stres sonrasında en yüksek HSP90 gen ekspresyonu CMF grubunda görülmüştür. Besleme finali ile karşılaştırıldığında Fe150, Fe300 ve CMF gruplarının HSP90 gen ekspresyonları yükselmiştir. Besleme finali sonunda IL1- $\beta$  ve Cas3 gen ekspresyonları en yüksek Fe300 ve Fe600 gruplarında, termal stres denemesinin sonunda ise Fe150 grubundan elde edilmiştir. Besleme finaline göre termal stres sonrasında Fe150 ve CMF gruplarının Cas3 gen ekspresyonları artmıştır. Sonuç olarak, bu çalışma, deneme grupları arasında 150 mg/kg yem demir ilave edilen (toplam ~270 mg/kg yem) yemle beslenen gökkuşığı alabalığında antioksidan sistem ve termal strese karşı daha iyi yanıt verdiği gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** termal stres, HSP70, HSP 90, IL1- $\beta$ , Cas3



## ABSTRACT

In this study, the effects of iron supplementation (in the form of  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) at three different doses of 150 (Fe150), 300 (Fe300), and 600 mg Fe/kg feed (Fe600) to the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plant-based feed on HSP70, HSP 90, IL1- $\beta$ , and Cas3 gene expressions were examined. In addition to these groups, a group without iron addition (Fe0) and a group fed commercial feed (Skreting, Norway) (CMF) were set up in order to compare the effects of iron supplementation. After 60 days of feeding with these diets, the water temperature was increased by 1°C per day and from 17°C to 24°C in 7 days to compare the fish's responses to thermal stress.

At the end of the feeding final, the highest HSP70 gene expression level was observed in the Fe300 group and after thermal stress in the Fe150 group. HSP70 gene expression decreased in these groups after thermal stress. At the end of the feeding final, HSP90 gene expression did not differ between groups, but after thermal stress, the highest HSP90 gene expression was seen in the CMF group. HSP90 gene expressions of Fe150, Fe300 and CMF groups increased after thermal stress compared to the feeding final. The Fe300 and Fe600 groups had the highest levels of IL1- $\beta$  and Cas3 gene expressions at the feeding final, and the Fe150 group had the highest levels after thermal stress exposure. Cas3 gene expression in the Fe150 and CMF groups increased after thermal stress compared to the feeding final. As a result, this study observed that rainbow trout fed with feed supplemented with 150 mg iron/kg feed (total ~270 mg/kg feed) responded better to antioxidant systems and thermal stress among the experimental groups.

**Keywords:** thermal stress, HSP70, HSP 90, IL1- $\beta$ , Cas3

## SONUÇ RAPORU ANA METNİ

### 1. GİRİŞ

Dünyada 2021 yılında toplam 952,690 bin ton yetiştiriciliği yapılan (FAO, 2023) alabalık (*Oncorhynchus mykiss*), ülkemizde toplam 514,805 ton olan su ürünleri yetiştiriciliğinin 189.801 tonunu (144,347 ton iç su, 45,454 ton deniz üretimi) oluşturarak yetiştiriciliği en fazla yapılan türdür (TÜİK, 2022). Alabalıklar genellikle 8 ile 22 °C sıcaklık aralığında büyüebilmekle birlikte, optimum büyüme 12-18 °C arasında, 20 °C'nin üzerinde ise yem alımında azalma ve büyümede gerileme, 25 °C üzeri ise yaşamları için tehlikeli olmaktadır (Matthews ve Berg., 1997). Ekonomik değeri oldukça yüksek olan bu tür için değişen iklim koşulları ve su sıcaklığındaki değişimler türün yetiştiriciliğinde karşılaşılan oldukça önemli bir sorundur. Su sıcaklığındaki artış, solunumun hızlanmasına ve oksijen tüketiminin artmasına, sonuç olarak süperoksit anyonları (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve hidroksil (OH.) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi ve birikimine neden olur. Fazla miktardaki ROS protein, lipid ve DNA gibi hücrel makromoleküllerde hasara neden olan oksidatif strese yol açmaktadır (Lesser., 2006). Oksidatif strese karşı, antioksidan savunma sistemi ile ROS seviyesi dengelenebilmektedir. Antioksidan savunma sistemini SOD, GPX, CAT gibi enzimatik ve askorbik asit, α-tokoferol gibi enzimatik olmayan antioksidanlar oluşturmaktadır (Zheng ve ark., 2019).

Demir balıklar için esansiyel olan, hemoglobin, miyoglobulin, transferrin, ferritin gibi çeşitli proteinlerin ve mitokondriyal enzim taşıma zinciri enzimi gibi hayati enzimlerin yapıtaşını oluşturan mikro elementtir (Aisen ve ark., 2001). Ayrıca hücrel solunumda önemli rol oynadığı için bütün doku ve organlar için gereklidir. Bununla birlikte, lipid peroksidasyonunda ve immün sistemin düzenlenmesinde de etkilidir (Musharraf ve Khan, 2019). Ancak aşırı miktarda demir toksik etki yapabilmektedir. Hücrel düzeyde demir fenton reaksiyonu ile katalize olur. Bu reaksiyon sonucunda, hücrel oksidatif hasara yol açan hidroksil radikallerini de içeren serbest radikaller üretilmektedir (Bury ve ark., 2003; Valko ve ark., 2005). Yukarıda belirtildiği gibi demir organizma için hem yararlı hemde zararlı olabilmektedir, bu yüzden vücut için gerekli miktar sağlanmalı ancak oksidatif strese yol açan aşırı miktarda Fe<sup>+2</sup> birikiminden kaçınılmalıdır (Carriquiriborde ve ark., 2004).

Bu nedenle, düşük oranda balık unu içeren (%10) alabalık yemlerine 0, 150, 300 ve 600 mg Fe/kg yem dozlarında demir ilavesinin (Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O formunda) büyüme, vücut kompozisyonu, hematokrit, serum biyokimyasal parametreleri (total protein, albümin, demir, demir bağlama kapasitesi, ferritin), bağırsak dokularının histolojik incelemesi daha önceki çalışmamızda ortaya konulmuştur (Evliyaoğlu ve ark., 2022). Bu projede belirtilen dozlardaki yemle beslenmiş alabalıkların karaciğerdeki SOD (süperoksit dismutaz) ve CAT (katalaz) enzim aktivesi ve karaciğer dokularındaki stres ve demir metabolizması ile ilişkili gen ekspresyon seviyeleri belirlenerek balıkların bu yemlere karşı tepkileri ortaya



konulmuştur. Ayrıca bu yemlerle beslenen balıkların Kritik Termal Maksimum (CT<sub>max</sub>) değerleri belirlenerek termal tolerans noktalarına etkisi araştırılmıştır. Daha sonra balıklar termal strese maruz bırakılarak yine serum biyokimyasal parametreleri, gen ekspresyon seviyeleri ve enzimatik parametreler yardımıyla balıkların sıcaklık artışına karşı oluşan stres yanıtları belirlenmiştir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. HSP70, HSP90, IL1 $\beta$ ve Cas3'ün balık fizyolojisi üzerindeki etkisi

Isı şok proteinleri farklı organizmalardaki yüksek benzerliği ile günümüze kadar korunmuş bir protein ailesidir (Alak ve ark., 2017). Bu ailenin çok sayıda üyesi olmakla birlikte üç grupta incelenmektedir; HSP90 (85-90 kDa), HSP70 (68-73 kDa) ve daha küçük moleküler ağırlığa sahip olanlar (16-47 kDa) (Takle vd., 2005). Isı stresine maruz kalan *Drosophila*'da bu proteinlerin artış göstermesi sonucu 'Isı Şok Proteinleri' ismini almışlardır (Basu ve ark., 2002). Ortam sıcaklığının organizmanın uygun yaşama ve büyüme sıcaklığını 5–10°C aştığı durumlarda bu protein grubunun uyarıldığı gözlenmiştir (Clark ve Perk, 2009). Ani ısı değişimleri ya da diğer stres etmenleri ile karşılaşıldığında zaten hücrede var olan bu proteinlerin düzeyinde artış meydana gelir. Güçlü hidrojen bağlarına sahip çift kutuplu heliks yapıları ve hidrofobik etkileşimleri bozunmalarının nedenlerindedir. Isı şok proteinler diğer proteinlerin kararlılıklarının sürdürülmesini sağlar ve bozunmuş proteinlerin toplanıp kümelenmelerine engel olurlar. Balıklarda biyotik faktörlerin de ısı şok protein (özellikle hsp70) düzeylerinde artış meydana getirdiği bilinmektedir.

IL-1 ailesi geniş bir proenflamatuvar sitokin ailesidir. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-1ra (reseptör antagonisti) bu ailenin en iyi bilinen üyeleridir. IL-1, bağışıklık sisteminin enflamasyon yanıtında hızlı bir şekilde eyleme geçer ve diğer birçok sitokinin ifade değişimlerinde görev alır. IL-1 ailesinin ligand ve reseptör sistemi farklı agonist ve antagonistlerden oluşur. Çalışmamızda da ifade düzeyini araştırdığımız IL-1 $\beta$  pasif bir formda üretilir ve kaspaz-1 enzimi tarafından kesilerek aktif olgun forma dönüştürülür (Engelsma ve ark., 2002). IL-1 $\beta$ , özellikle memelilerde birçok hücre tipi tarafından üretilir ancak monositler ve dokularda yer alan makrofajlar ağırlıklı üretim yerleridir. Konağın patojenlere, doku hasarına ve hatta bağışıklık rahatsızlıklarına karşı lizozim artışına sağladığı katkıyla, fagositik aktiviteyi güçlendirmesiyle ve lökositlerin hasarlı bölgelere göç etmelerini teşvik etmesiyle hayati rol üstlenir (Covello ve ark., 2009).

Kaspaz-3, Cas3 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Kaspaz-3 sistein-aspartik proteazlar ailesinin bir üyesidir. Bu protein öncül ve oligonlaşmamış bir formda üretilir ve aktif hale gelmesi için enzim ile kesilmesi gerekir. Kaspaz-3 apoptozun bir aracısı olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte doku farklılaşması, yenilenme ve sinir gelişimi gibi apoptotik olmayan işlevlere de sahiptir (Asadi ve ark., 2022). Apoptoz, gelişmiş organizmalarda

gelişim ve homeostazisini kontrol eden, korunmuş bir yapı olarak günümüze kadar gelen hücre ölüm mekanizmasıdır (Liyang ve ark., 2001). Apoptoz, standart hücre döngüsü, bağışıklık sistemi, metamorfoz ve çevresel strese tepki gibi farklı sistem ve döngülerde rol alan önemli bir süreçtir. (Yabu ve ark., 2001). Kaspaz-3 aktivasyonu apoptoz yolağının tüm bileşenleri ile aktif hale gelmesinde önemli bir rol üstlenmiştir. Kaspaz-3, mitokondriyal membranın koruyucu işlevinin bozulmasını takiben aktif hale gelen kaspazlardandır (Liyang ve ark., 2001). Balıklarda kaspaz-3 gen ifade değişikliği üzerine birçok çalışma literatüre kazandırılmıştır.

## **2.2. Termal Stresin Balık Fizyolojisi Üzerindeki Etkileri**

Su sıcaklığı, bilindiği üzere, su ürünleri yetiştiriciliğinin tüm aşamalarında balık gelişimini ve fizyolojisini kontrol eden ve sınırlayan ana abiyotik faktördür (Islam ve ark., 2021). Günlük veya mevsimsel sıcaklıktaki dalgalanmalar balıklarda büyüme, yem alımı ve birçok fizyolojik süreçleri etkilemektedir (Rebl ve ark. 2013; Cheng ve ark., 2015,2018). Küresel iklim değişikliğine bağlı olarak okyanuslardaki su sıcaklığında artış olacağı (Almroth ve ark., 2015) ve 2100 yılına kadar yüzey sıcaklığının bu iklim değişikliğine bağlı olarak kademeli olarak 1 ile 4 °C artacağı tahmin edilmektedir (IPCC, 2014). Ülkemizin de dahil olduğu Akdeniz ülkelerinin iklim değişikliğinden önemli ölçüde etkileneceği beklenmektedir (Reid ve ark., 2019). Bireysel düzeydeki başlıca fizyolojik kısıtlamalar, balık büyümesinde, hemato-fizyolojide, metabolizmada, aşırı sıcaklık olaylarına karşı bağışıklık ve moleküler stres tepkilerinde meydana gelen değişikliklerin temelini oluşturur (Islam ve ark., 2022).

Stres, Gorissen ve Flik (2016) tarafından faydalı olduğu kadar dezavantajlı da olabilecek bir endokrin tepkisini uyandıran bir faktörün (stres etkeni) neden olduğu bir durum olarak tanımlanmıştır. Stres doğası gereği kötü değildir ve akut stres tepkisi, çevresel zorluklara daha iyi uyum sağlamak ve homeostaziyi yeniden kazanmak için fizyolojik ve/veya davranışsal bir değişikliği teşvik etmenin etkili bir yolu olarak görülebilir. Ancak stres tepkisinin oluşturduğu fizyolojik ve davranışsal düzenlemeler, stresin tekrarlandığı veya devam ettiği ve kaçınılmaz olduğu ve hayvanların buna alışmadığı koşullarda uygun olmayabilmektedir (Barton, 2002).

Bir stres etkenine maruz kalındığında, farklı organizasyon düzeylerinde (hücreler, doku, organ, tüm organizma) çeşitli süreçler başlatılır. Stres tepkisi, bir uyarının (içsel veya çevresel) algılanması ve bunun, balıklarda ön beyinde (çoğunlukla hipotalamus ve telensefalonda) yer aldığına inanılan beyin “stres merkezleri” tarafından algılanması ile başlatılır (Gorissen ve Flik, 2016). Beyinde, dopamin (DA), noradrenalin (NE) ve özellikle serotonin (5-HT) gibi monoaminerjik nörotransmitterlerin aktivitesi olası stres durumunun organizasyonu ve kontrolünde rol oynar (Gesto ve ark., 2013). Beyin, büyük ölçüde iki farklı nöroendokrin yolu takip eden entegre bir stres tepkisini düzenler. Birincisi, ön böbrekteki

kromaffin hücrelerinin (beyin-empatik-kromafin hücre eksen, BSC) doğrudan sinirsel uyarılmasını içerir, bu da katekolaminlerin dolaşıma salınmasıyla sonuçlanır (Wendelaar Bonga, 1997). İkinci bir nöroendokrin yol olan hipotalamus-hipofiz-interrenal (HPI) eksen daha karmaşıktır. Kısaca, kortikotropin salgılatıcı faktörü (CRF) ön hipofizin pars distalisine boşaltan CRF nöronlarının aktivasyonu ile başlar. Orada, CRF ve diğer peptitler (örneğin vazotosin), adrenokortikotropik hormonun (ACTH) dolaşıma salınmasını uyarır, bu da ön böbrekteki böbreklerarası hücrelerden kortizolün (teleostlardaki ana kortikosteroid) üretimini ve salınmasını uyarır (Sadoul ve Geffroy, 2019). Her iki stres hormon seti (katekolaminler ve kortizol), çeşitli doku ve organlarda, hayvanın stres etkeni tehdidinin üstesinden gelme şansını arttırmayı amaçlayan ikincil etkilere sahiptir (Alfonso ve ark., 2020). İkincil stres tepkileri kan ve dokularda hormon salınımı, metabolik bozukluk, enerji mobilizasyonu ve hidromineral dengesidir (Islam ve ark., 2022). Sıcaklık stresine akut ve kronik düzeyde maruz kalma aynı zamanda antioksidan tepkileri de aktive eder (Islam ve ark., 2022). Ayrıca balık bağışıklık sistemi üzerinde engelleyici etkiler de gözlemlenebilir (Tort, 2011). Hücresel düzeyde endokrin stres sistemleri aynı zamanda ısı şok proteinleri (HSP'ler) salınımında neden olur (Alfonso ve ark., 2020). Eşlik eden diğer ikincil tepkiler arasında hidromineral fonksiyon bozukluğu yer alır çünkü adrenalın, solungaç kan akış düzenlerini ve solungaç geçirgenliğini değiştirir; her ikisi de, çevresel tuzluluğa bağlı olarak balığın içinde veya dışında suyun ozmotik gradyanı boyunca akmasını kolaylaştırır. Dolayısıyla kortizolün bu bağlamdaki mantıksal rolü, ozmotik dengenin yeniden sağlanması olacaktır. Hormonlar, bir stres etkenine maruz kalma sırasında enerjiyi ihtiyaç duyulan yerde kullanılabilir hale getirerek organizma üzerinde olumlu bir etkiye sahip olsa da, tüm hayvan düzeyindeki üçüncül tepkilerin çoğu uyumsuzdur. Bağışıklık fonksiyonunun bozulması, büyüme veya üreme başarısı gibi uzun vadeli üçüncül etkiler balık yetiştiriciliği performansını olumsuz yönde etkilemektedir (Schreck ve Tort, 2016).

Termal stresin balık fizyolojisi üzerindeki etkisini konu alan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Örneğin gökkuşağı alabalıklarında yapılan bir çalışmada su sıcaklığını 18°C'den günde 1 °C arttırarak 24°C'ye çıkarıldığında HSP47, HSP70 ve HSP90 genlerinin aktive olduğu görülmüştür (Li ve ark., 2017). Vinagre ve ark. (2012)'nin Avrupa deniz levreği (*Dicentrarchus labrax*) ile yaptıkları bir çalışmada oksidatif stres paramaterelerinin (MDA ve CAT) optimum su sıcaklığında (24°C) en düşük seviyede ve bu türün üst ve alt optimum termal limitlerinin dışında bu değerleri arttığını gözlemlemiştir. Yazarlar ayrıca 28°C' ye maruz bırakılan balıkların 15 gün sonunda CAT ve MDA seviyelerinin maksimum seviyeye ulaştığını ancak termal strese 30 gün maruz kalmasının sonunda tekrar düştüğünü belirtmiştir. Pisi balıklarında (*Solea senegalensis*) yapılan başka bir çalışmada 1 saat içinde su sıcaklığını 18°C'den 24°C'ye çıkarıldığında, 18°C sıcaklıkta tutulan kontrol

grubuna göre stres uygulanan balıkların 1 ve 24 saat sonra karaciğerlerindeki HSP70 ve HSP90 gen ekspresyonlarının daha yüksek olduğu (Benítez-Dorta ve ark., 2017).

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3. 1. Gereç**

##### **3.1.1. Deneme Balıklarının Alıştırılması ve Etik Uygulamalar**

Denememizde kullanılan alabalık yavruları Kahramanmaraş'ın Fırınz mevkiindeki Aras Alabalık tesisinden 1 m<sup>3</sup>'lük taşıma tankı ile Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Ünitesine getirilmiş ve 800 adet yavru birey (2-3 gr) öncelikle 1,5 tonluk iki adet polietilen karantina tankına alınmıştır. Bu süreç boyunca balıklar ısıtma-soğutma cihazının (Gemaş, Fairland PHC25V, Türkiye) da bulunduğu resirküle sisteme bağlı olan bu tanklarda tutulmuştur. Karantina koşullarında bekletilen balıklar ünite koşullarına adapte edilmeye çalışılmış ve günde iki kez, ad libitum (doyana kadar) beslenerek yaklaşık 90 gün içerisinde deneme boyu başlangıç ağırlığına (20 g) ulaştırılmıştır.

Deneme materyalinin transferi, deneme ortamına alıştırılması, denemenin yürütülmesi, tüm örnekler öncesi nekropsi amacıyla ötenazi işlemleri Çukurova Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Etik Kurulunun 10.06.2020 tarihli ve 3 nolu toplantısında değerlendirilmiş ve uygun bulunmuştur.

#### **3. 2. Yöntem**

##### **3.2.1. Deneme Dizaynı**

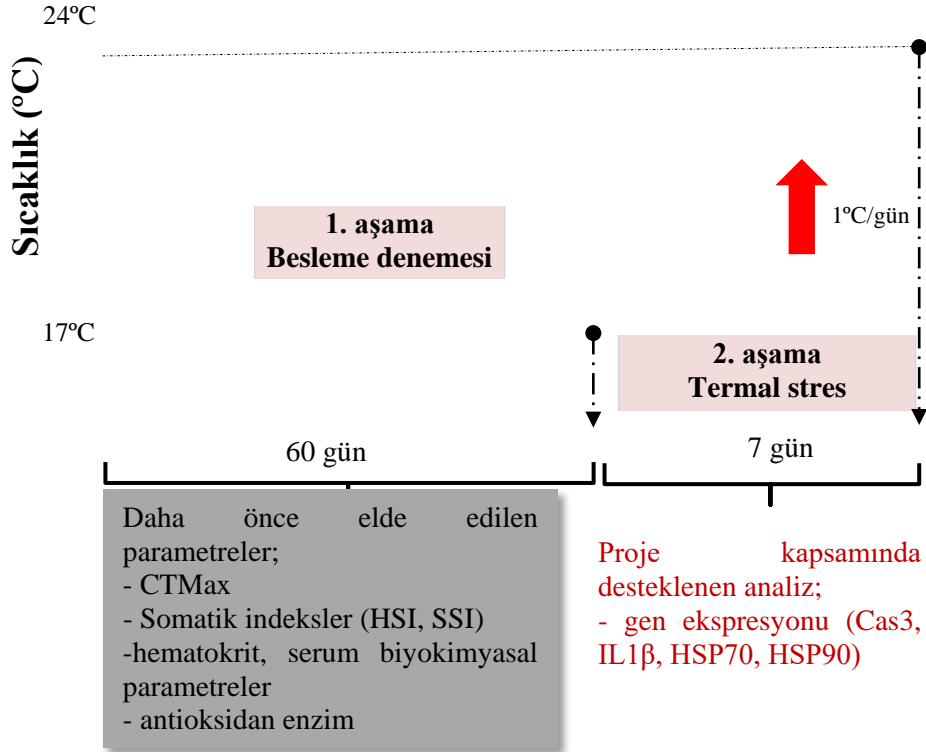
Deneme, Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Ünitesi'nde yürütülmüştür. Resirküle sisteme bağlı 260 L'lik 15 adet silindirik fiberglas deneme tankının su sıcaklığı ısıtma-soğutma cihazı ile kontrol altına alınmıştır. Deneme tanklarında su sıcaklığı 15±0,5°C Balıkların aklimasyon döneminden itibaren fotoperiyot otomatik zaman rölesi ile 06:30-18:30 saatleri (12Aydınlık:12Karanlık) arasında aydınlık olarak ayarlanmıştır. Bu süreçte balıklar ticari alabalık yemi ile (Optiline 2PS, Skretting) günde iki kez ad libitum beslenmiştir.

Çalışmamız iki aşamalı olacak şekilde planlanmıştır. İlk aşamada farklı miktarlarda demir ilave edilen yemlerle 60 gün boyunca besleme yapılarak demir metabolizması ile büyüme, besinsel kompozisyon ve sindirilebilirlik ile ilişki çeşitli analizlerle değerlendirilmiştir. Çalışmamızın ikinci aşamasında ise bu yemlerle beslenmiş balıklar termal strese maruz bırakılarak bağışıklık yanıtları incelenmiştir.

##### **3.2.1.1. Besleme Denemesi**

Deneme süresince balıklar yine günde iki kez ad libitum hazırlanan deneme yemleriyle beslenmeye devam edilmiştir. Su sıcaklığı 17°C'de sabitlenerek, oksijen seviyesi

oksijenmetre ile (YSI 550A), amonyak, nitrit ve nitrat miktarları kolorimetrik kitlerle (Merck) her hafta düzenli olarak ölçülerek balıklar için optimum ortam koşulları sağlanmaya çalışılmıştır. Şekil 1'de görüleceği gibi deneme 60 gün sürdürülmüştür. Besleme denemesinin sonunda balık büyüme parametreleri, besinsel kompozisyon, sindirilebilirlik, bağırsak histomorfometrisindeki değişim, demirle ilişkili serum parametreleri ve gen ekspresyonları değerlendirilmiştir.



Şekil 1. Deneme dizaynı ve araştırılan parametreler

### 3.2.1.2. Termal stres denemesi

Denemenin bu aşamasında, farklı demir içeriğine sahip yemlerle beslene gökkuşuğu alabalık bireylerinin termal strese karşı verdiği yanıtlar incelenmiştir. Bu amaçla, besleme denemesi sonunda, balıklar termal strese maruz bırakılmadan önce farklı demir içerikli yemler ile beslemenin kiritk termal maksima (CTMax) üzerine olan etkileri belirlenmiştir.

Şekil 1.'de görülen termal stres uygulamasında, deneme tanklarındaki su sıcaklığı günde 1°C arttırarak, 7 günde 17°C'den 24°C'ye kadar çıkartılmıştır (Li ve ark., 2017). Bu sürenin sonunda balıklarda yapılan örneklemeler sonucunda serum parametreleri (albümin, total protein), gen ekspresyonları (HSP70, HSP90, CAS3, IL1β), antioksidan enzim analizleri (SOD, CAT, GPX) gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.2. Deneme yemlerinin hazırlanması

Çalışmada izoproteolitik (%45 protein) ve izolipidik (%18 lipit) deneme yemleri formülize edilmiştir. Yemlerin formülasyonlarında kullanılacak hammaddeler Skretting, Gümüşdoğa, Turkuaz A.Ş. ve Suna A.Ş. firmalarından temin edilmiştir. Formülasyonda kullanılan hammaddelerin ham yağ (Bligh ve Dyer, 1959), protein, kuru madde (KM) ve ham kül (HK) analizleri (AOAC, 1990) yapılmıştır. Elde edilen analiz sonuçlarına göre Tablo.1.'de belirtilen yem formülasyonu ticari alabalık yemlerinde uygun bir formülasyon içeriği ile hazırlanmıştır. Deneme yemlerine ilave edilen üç farklı dozda demir sülfat heptahidrat (CAT no: 12354, Sigma-Aldrich, USA) miktarları, bileşiğin içerisinde %20 oranında demir olduğu göz önünde bulundurularak 0 (kontrol), 150, 300 ve 600 mg Fe/kg yem olacak şekilde hesaplanarak ilave edilmiştir. Dört deneme yemine ek, bir adette "ticari yem kontrol" grubu (yavru alabalık yemi, Optiline 2PS Skretting) olarak eklenmiştir. Deneme yemleri hazırlandıktan sonra, demir içerikleride ayrıca analiz edilmiştir.

**Tablo 1.** Denemede kullanılan juvenil alabalıklar (*Onchorhynchus mykiss*) için oluşturulmuş yem formülasyonu

Yem hammaddeleri (g/kg)	Deneme grupları			
	Fe0	Fe150	Fe300	Fe600
Tavuk unu <sup>1</sup>	125	125	125	125
Balık unu <sup>2</sup>	100	100	100	100
Buğday unu <sup>3</sup>	99	99	99	99
Buğday gluteni <sup>1</sup>	113	113	113	113
SPC <sup>2</sup> (soya protein konsantresi)	200	200	200	200
Soya unu <sup>1</sup>	110	110	110	110
CMC (karboksimetil selüloz)	30,95	30,2	29,45	27,95
Balık yağı <sup>2</sup>	50	50	50	50
Kanola yağı	90	90	90	90
Mineral mix <sup>2</sup>	4,5	4,5	4,5	4,5
Vitamin mix <sup>2</sup>	4,5	4,5	4,5	4,5
Vit C <sup>5</sup>	0,05	0,05	0,05	0,05
Kolin klorid <sup>1</sup>	5	5	5	5
Metiyonin <sup>1</sup>	3	3	3	3
Lizin <sup>1</sup>	3	3	3	3
Kromik oksit (Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) <sup>6</sup>	2	2	2	2
Demir sülfat (Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O) <sup>6</sup>	-	0,75	1,5	3

<sup>1</sup> Skretting

<sup>2</sup> Gümüşdoğa

<sup>3</sup> Turkuaz A.Ş.

<sup>4</sup> Sunar A.Ş.

<sup>5</sup> ROVIMIX® C-EC, (DSM)

Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich)

Yem yapımından önce yem hammaddeleri öğütücü ile tamamen toz haline getirilmiştir. Toz haldeki kuru maddeler Tablo 1'deki formülasyonda belirtilen oranlarda tartılıp karıştırıldıktan sonra karışımın üzerine yağlar ilave edilerek homojen dağılım

sağlanana kadar karıştırılmaya devam edilmiştir. Belirlenen dozlarda toz formdaki demir sülfat heptahidrat suda çözdürülmüş ve yem karışıma püskürtülmüştür. Kontrol grubu için ise demir eklenmeden sadece aynı miktarda su püskürtmesi yapılmıştır. Bu hamur karışımı homojen forma geldiğinde peletleme makinesine (La Monferrina-Dolly, Italy) aktarılmış ve makinenin bıçak hızı ayarlanarak, balıkların ağız açıklığına göre uygun boyutlarda pelet (yaklaşık 2 mm) haline getirilmiştir. Peletler daha sonra 25-30°C sıcaklıkta klimatize edilmiş bir ortamda serilerek bir gece boyunca kurutulmuştur. Deneme yemlerinin sindiriminin artırılması amacıyla, kurumuş peletler bir otoklav yardımıyla altı delikli otoklav tepsilerine yerleştirilerek 1,5 bar basınçta yaklaşık 20 dk ısıtılma tabi tutulmuştur. Pişirilen peletler daha sonra neminin giderilmesi için tekrar serilerek kurutulmuştur. Kurutulan yemler kullanılabileceği kadar -20°C'de saklanmıştır.

### **3.2.3. Örneklemelerin Yapılması**

Örneklemeye öncesinde balıklar 48 saat süreyle aç bırakılmıştır. Stresi önlemek amacıyla 100-150 ppm dozunda Phenoxyethanol (Sigma-Aldrich, USA) anestezi uygulaması yapılmıştır. Besleme denemesi sonunda, deneme tanklarındaki bütün balıkların bireysel ağırlıkları ve total uzunlukları büyüme performanslarının belirlenmesi amacıyla kayıt altına alınmıştır.

Moleküler analizlerin hassasiyeti sebebiyle, yukarıdaki örneklenen balıklara ek olarak her tanktan ayrıca iki balığın (n=2, N=6) karaciğerleri aseptik koşullarda disekte edilmiş, dokular hızlı bir şekilde sıvı azot içerisinde dondurulmuş ve analiz yapılabileceği kadar -80°C'de saklanmıştır.

### **3.2.4. Analizler**

#### **3.2.4.1. Farklı Miktarda Demir İçeren Deneme Yemleri İle Beslenen Alabalıklarda Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi**

Yaklaşık 100 mg'lık balık karaciğer dokuları doku parçalayıcı (Qiagen tissue lyzer II) yardımıyla TRIzol reaktifi (Thermo Fisher Scientific) ile kullanılan kimyasalın protokolüne göre ekstrakte edilmiştir ve RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA kalitesi ve miktarı sırasıyla spektrofotometrik (260/280 oranı, Thermo Fisher Multiskan GO Reader) ve florometrik (Qubit 2.0, Thermo Fisher Scientific) yöntemleri kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen RNA örnekleri, yüksek kapasiteli cDNA reverse transkripsiyon kiti (High capacity cDNA transcriptase kit, Applied Biosystems, Thermo Fisher) ile komplementer DNA'ya dönüştürülmüştür. Ters transkripsiyon, 20 µL toplam hacimde (2 µL 10 x RT Tamponu, 0,8 µL dNTP, 2 µL rastgele primer, 1 µL ters transkriptaz ve 10 µL RNA (1000 ng)) olacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler cihazında

25°C'de 10 dakika, 37°C'de 60 dakika ve 85°C'de 5 dakika çalışma şartlarında yürütülmüştür. Elde edilen cDNA'lar -20°C'de tutulmuştur.

RT-PCR için 2 µL cDNA kullanılmıştır. Kantitatif PCR reaksiyonları, SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar, üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Toplam hacim 25 µL olacak şekilde; 12,5 µL Sybr Green Master Mix, 1,25 µL 10 pmol ileri primer, 1,25 µL 10 pmol ters primer, 2 µL cDNA şablonu ve 8 µL su olarak ayarlanmıştır. Applied Biosystem 7500 RT-PCR cihazı ile gerçekleştirilen qPCR döngü koşulları; 2 dakika boyunca 50°C, 10 dakika boyunca 95°C, ardından 15 saniye boyunca 95°C ve 1 dakika boyunca 60°C'lik 40 döngü olarak düzenlenmiştir. Referans gen olarak β-aktin kullanılmıştır. Tüm primer dizileri Çizelge 3.2 ve 3.3'te verilmiştir. Göreceli ekspresyon seviyeleri, replikatlardan elde edilen eşik döngü (Ct) değerleri kullanılarak karşılaştırmalı 2-ΔΔCt formülü (Livak ve Schmittgen, 2001) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(Ct_{\text{hedef}} - Ct_{\text{referans}}) - (Ct_{\text{kontrol}} - Ct_{\text{referans}})]}$$

**Tablo 2.** Denemede kullanılan gerçek zamanlı PCR analizi için kullanılan primerlerin sekansları

Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	GenBank Erişim numarası	Referanslar
<i>Cas3</i>	AATCGAGCTCAAGAG	CAGGAGCCAGT	XM_0216190	Dizayn edildi*
	CCTCAC	CTGAGTGTTT	54.2	
<i>IL1-β</i>	CTGGAGAGTGCTGT	GCGTGACGTAC	NM_0011243	Dizayn edildi*
	GGAAGAACAT	GAAGACAGG	47.2	
<i>HSP70</i>	CCTGTGGAGAAAGC	TTGTTTAGCTC	NM_0011242	Dizayn edildi*
	CCTCAG	TCGGCCGTT	28.1	
<i>HSP90</i>	TAATCCTGCTTTTCG	CTTCGTCGTCA	NM_0011242	Dizayn edildi*
	AGACCGT	TCGATTCCCAG	31.1	
<i>β-aktin</i>	CAGGGAGAAGATGA	GCCCTCGTAGA	NM_0011242	Dizayn edildi*
	CCCAGATTAT	TGGGTACTG	35.1	

### 3.2.4.2. İstatistik Analizler

Gruplar arasındaki farklılıkların belirlenebilmesi için tek yönlü varyans analizi (One-way Anova) Tukey post hoc testleri kullanılmıştır. Ayrıca, grupların final ve termal stres verileri bağımsız t-testi yapılarak karşılaştırılmıştır. Verilerin homojenitesi Levene testi ile ölçülmüştür. Verilerin analizinde SPSS 20,0 yazılımı (SPSS, Chicago, ABD) kullanılmıştır. Gen ekspresyon seviyeleri ortalama ± standart hata; diğer tüm veriler ise ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur (P<0,05).

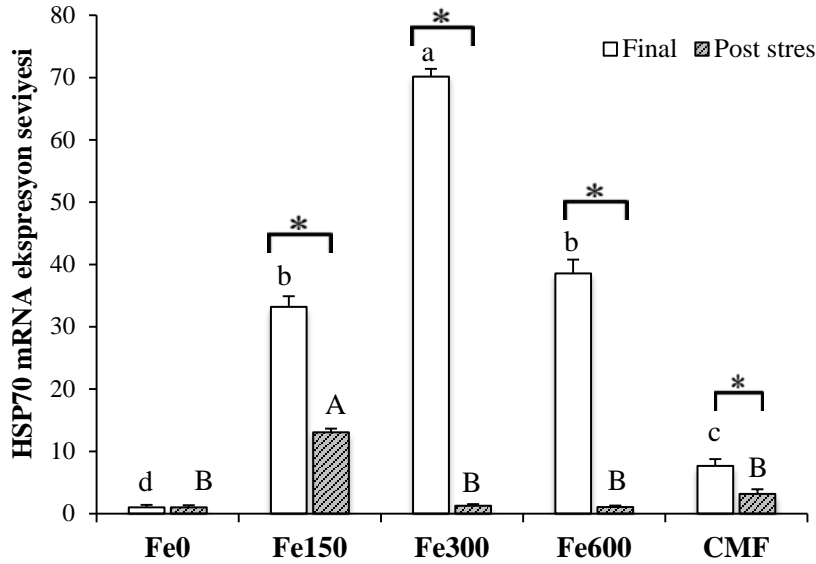


## 4. BULGULAR

### 4.1. Karaciğer Dokularında HSP70, HSP90, IL1 $\beta$ ve Cas3 genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri

#### 4.1.1. Karaciğer Dokularında HSP70 geninin mRNA ekspresyon seviyeleri

Besleme ve termal stres denemesi sonunda balıkların karaciğerdeki HSP70 mRNA ekspresyon değerleri Şekil 2’de gösterilmiştir. Besleme finali sonunda en yüksek HSP70 gen ekspresyon seviyesi Fe300 grubunda bulunurken, bu grubu sırasıyla Fe150, Fe600 ve CMF grupları takip etmiştir. Termal stres sonrasında ise en yüksek HSP70 gen ekspresyonu Fe150 grubunda olmasıyla beraber diğer gruplar arasında istatistiksel bir fark gözlenmemiştir. Bağımsız t-testine göre, Fe0 grubu hariç, diğer grupların tamamında besleme finali ile termal stres verilerinin arasındaki farklılık anlamlı olmakla birlikte bu gruplardaki termal stres HSP70 gen ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir ( $P < 0,05$ ).

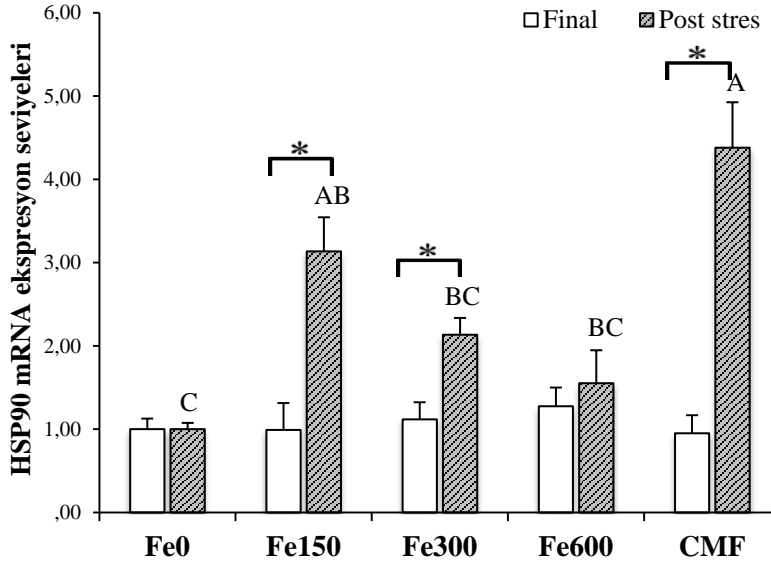


**Şekil 2. Farklı deneme yemleri ile 60 gün doyunca beslenmiş gökkuşuğu alabalıklarının (*Onchorhynchus mykiss*) karaciğerlerindeki HSP70 gen ekspresyonları.** Barların üzerindeki küçük harfler final örnekleme sonucunu, büyük harfler ise termal stres sonrasındaki gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ( $P < 0,05$ , ANOVA). Barların üzerindeki asteriks ifadeleri ise t-testine göre grubun örnekleme sonucunda fark olduğunu göstermektedir ( $P < 0,05$ , ANOVA).

#### 4.1.2. Karaciğer Dokularında HSP90 geninin mRNA ekspresyon seviyeleri

Besleme denemesi ve termal stres denemesi sonunda balıkların karaciğerdeki HSP90 mRNA ekspresyonları Şekil 3’de gösterilmiştir. Besleme finali sonunda tek yönlü varyans analizine göre gruplar arasında istatistiksel fark görülmemiştir ( $P > 0,05$ ). Ancak termal stres sonrasında HSP90 gen ekspresyonu en yüksek CMF grubunda olup, Fe150

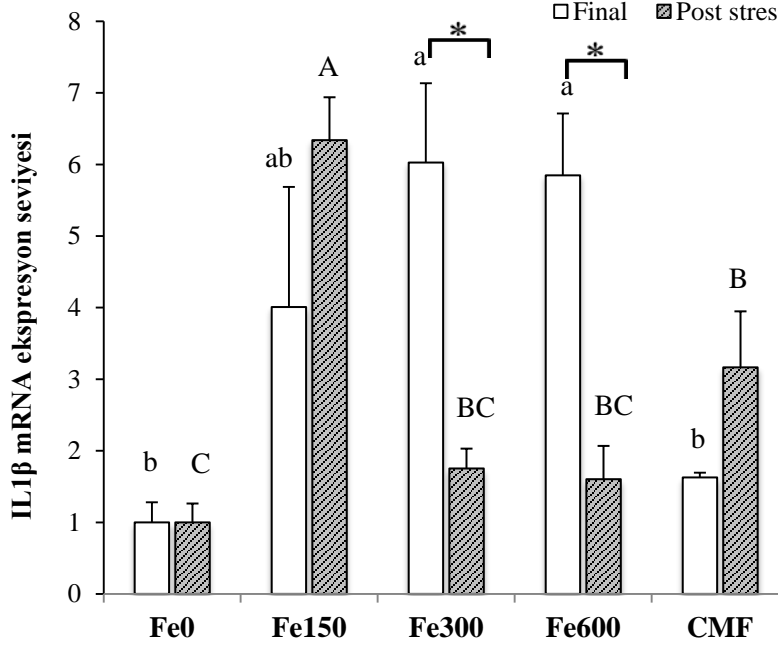
grubu ile istatistiksel olarak benzer sonuç göstermiştir. En düşük HSP90 gen ekspresyonu ise yine Fe0 grubunda belirlenmiştir. Besleme finali ile termal stres verilerinin arasındaki farklılığın belirlendiği bağımsız t-testine göre, Fe150, Fe300 ve CMF grupları istatistiksel olarak anlamlı olup, HSP90 gen ekspresyonları termal stresle birlikte yükselmiştir ( $P<0,05$ ). Bununla birlikte, Fe0 ve Fe600 gruplarının final ve termal stres sonrasında istatistiksel fark gözlenmemiştir ( $P>0,05$ ).



**Şekil 3. Farklı deneme yemleri ile 60 gün doyunca beslenmiş gökkuşuğu alabalıklarının (*Onchorhynchus mykiss*) karaciğerlerindeki HSP90 gen ekspresyonları.** Barların üzerindeki küçük harfler final örnekleme sonucunu, büyük harfler ise termal stres sonrasındaki gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ( $P<0,05$ , ANOVA). Barların üzerindeki asteriks ifadeleri ise t-testine göre grubun örnekleme sonucunda fark olduğunu göstermektedir ( $P<0,05$ , ANOVA).

#### 4.1.3. Karaciğer Dokularında IL1 $\beta$ geninin mRNA ekspresyon seviyeleri

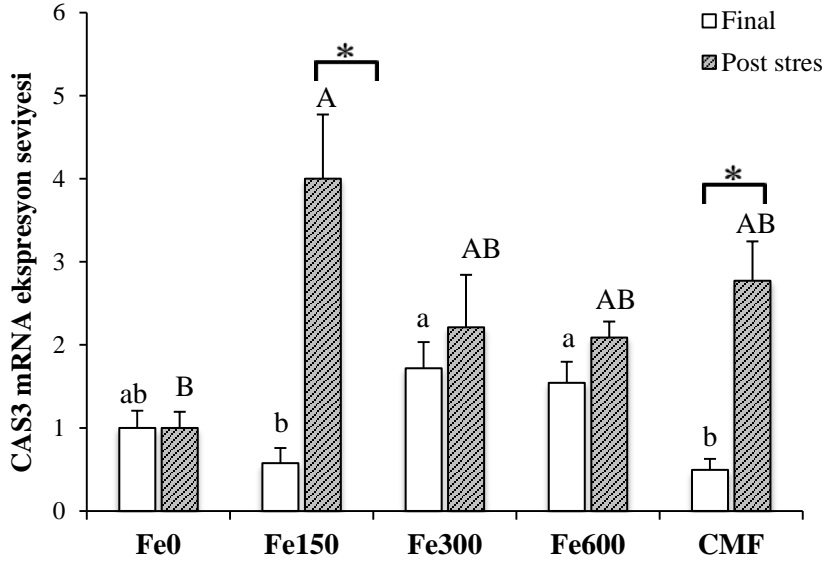
Besleme denemesi ve termal stres denemesi sonunda balıkların karaciğerdeki IL1 $\beta$  mRNA ekspresyonları Şekil 4'de gösterilmiştir. Besleme finali sonunda Fe300 ve Fe600 gruplarının gen ekspresyonları en yüksek değerlerde olmasıyla beraber, Fe150 grubu ile benzer ancak Fe0 ve CMF gruplarına göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). Termal stres denemesinin sonunda ise IL1 $\beta$  mRNA ekspresyonları en yüksek Fe150 grubunda, en düşük ise Fe0 grubunda görülmüştür. Bağımsız t-testine göre, Fe300 ve Fe600 gruplarının besleme finali ile termal stres verilerinin arasındaki farklılığın anlamlı olduğu ve termal stresin IL1 $\beta$  gen ekspresyonlarını düşürdüğü belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Bununla birlikte, diğer gruplarda besleme finali ile termal stres arasında istatistiksel fark bulunmazken beraber Fe150 ve CMF gruplarında diğer grupların aksine IL1 $\beta$  gen ekspresyonları artış eğilimi göstermiştir.



**Şekil 1.** Farklı deneme yemleri ile 60 gün doyunca beslenmiş gökkuşığı alabalıklarının (*Onchorhynchus mykiss*) karaciğerlerindeki IL1 $\beta$  gen ekspresyonları. Barların üzerindeki küçük harfler final örnekleme sonucunu, büyük harfler ise termal stres sonrasındaki gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ( $p < 0,05$ , ANOVA). Barların üzerindeki asteriks ifadeleri ise t-testine göre grubun örnekleme sonuçları arasında fark olduğunu göstermektedir ( $p < 0,05$ , ANOVA).

#### 4.1.4. Karaciğer Dokularında Cas3 geninin mRNA ekspresyon seviyeleri

Besleme denemesi ve termal stres denemesi sonunda balıkların karaciğerdeki Cas3 mRNA ekspresyonları Şekil 5'de gösterilmiştir. Besleme finali sonunda Fe300 ve Fe600 gruplarının gen ekspresyonları Fe150 ve CMF grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Termal stres denemesinin sonunda ise Fe150 grubunun Cas3 gen ekspresyonları Fe300, Fe600 ve CMF grupları ile benzer olup, Fe0 grubundan daha yüksek olduğu görülmüştür ( $p < 0,05$ ). Bütün grupların besleme ve termal stres sonuçları arasındaki farkı görmek için yapılan bağımsız t-testi analizi sonuçlarına göre, Fe150 ve CMF gruplarının istatistiksel olarak anlamlı olduğu ve termal stresle birlikte arttığı gözlenmiştir ( $p < 0,05$ ).



**Şekil 5.** Farklı deneme yemleri ile 60 gün doyunca beslenmiş gökkuşuğu alabalıklarının (*Onchorhynchus mykiss*) karaciğerlerindeki CAS3 gen ekspresyonları. Barların üzerindeki küçük harfler final örnekleme için, büyük harfler ise termal stres sonrası gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir ( $p < 0,05$ , ANOVA). Barların üzerindeki asteriks ifadeleri ise t-testine göre grubun örneklemeler arasında fark olduğunu göstermektedir ( $p < 0,05$ , ANOVA).

## 5. Tartışma

### 5.1. Isı şoku proteinlerinin (HSP70 ve HSP90) değerlendirilmesi

Isı şoku proteinleri (HSP'ler) tüm hücrelerde ve organizmalarda genel koruyucu işlevlere sahip, yüksek oranda korunmuş bir protein grubudur (Roberts ve ark., 2010). Oksidatif stres proteinlere zarar verir ve bu hasarlı protein yapılarını eski haline getirmek için HSP'lerin artması gereklidir (Wang ve ark., 2016). HSP ailesi içinde HSP70 ve HSP90, stres koşulları altında, proteinlerin yanlış katlanma kusurlarını ve toplanmalarını hafifleterek protein dengesini (homeostazını) koruyan moleküler şaperonlar olarak hareket ederler, böylece hücreyi hasardan korurlar (Ranford ve ark., 2000; Fu ve ark., 2011). Çalışmamızda besleme denemesi sonunda Fe300 grubunun HSP70 gen ekspresyonu, en yüksek çıkmıştır ve bunu Fe150-Fe600 ve daha sonra CMF grubu takip etmiştir. Bu durumda 300 mg/kg Fe yem dozunun balıklarda toksisite oluşturarak stres oluşumuna neden olduğu açıktır. Bununla birlikte, daha yüksek dozda demir içeren Fe600 grubundaki HSP70 ekspresyon seviyesinin Fe150 grubuna göre daha düşük olduğu görülmüştür. Literatürde demir ve HSP ilişkisini konu alan ve çalışmamızdaki bulguları karşılaştırabileceğimiz çalışmaya rastlanmamıştır. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde birbirleri ile uyumsuz birçok çalışmaya da rastlanılmıştır. Ancak Köhler ve ark. (1999) ve Bowen ve ark. (2006) metale maruz kalmanın HSP70 ekspresyonunu azaltabileceğini bildirmiştir. Termal stres sonunda en yüksek HSP70 gen ekspresyon seviyesi Fe150 grubundan elde edilmiştir. Bu durumda Fe150 grubunun termal strese karşı başarılı yanıt vererek hücrelerin hayatta

kalması için savaştığı sonucuna varılabilir. Bununla birlikte ilginç bir şekilde, Fe0 grubu haricindeki bütün gruplarda besleme sonrasına göre anlamlı düzeyde bir azalma görülmüştür. Topal ve ark. (2021) alabalıkların 20 ve 25°C sıcaklığa maruz kaldıklarında beyinlerindeki HSP70 ve HSP90 gen ekspresyonlarının arttığını bildirmiştir. Ancak belirtilen çalışmada örnekleme, sıcaklığa maruz bırakıldıktan en fazla 8 saat sonra yapılmıştır, dolayısıyla sıcaklığa maruz kalma süresi balıkların HSP yanıtını değiştirebilmektedir. Örneğin, dil balıkları (*Solea senegalensis*) ile yapılan bir çalışmada su sıcaklığı 1 saat içinde 18°C den 24°C 'ye çıkartıldıktan 1 saat sonra, karaciğerdeki HSP70 gen ekspresyonları ani artış gösterirken, 24 saat sonra bu ani artış düşmeye başlamış ve 7 gün sonra ise çalışmamızda olduğu gibi bazal seviyenin altına düşmüştür (Benitez-Dorta ve ark., 2017). Koho somonlarında yapılan bir çalışmada su sıcaklığı günde 1°C arttırıldığında termal strese yanıt olarak HSP70 miktarlarının düştüğü gözlenmiştir (Bowen ve ark., 2006). HSP70 stres proteinindeki bu azalmanın stres etkenlerinin yoğunluğuna bağlı olarak önce indüklenmesi ve ardından kinetiğine bağlı olarak azaldığı sonucuna varılabilmektedir (Köhler ve ark., 2001; Bowen ve ark., 2006). Çalışmamızda HSP70 gen ekspresyonunun aksine, farklı dozlarda demir ile beslenen balıkların HSP90 gen ekspresyon seviyelerini etkilenmemiştir. Bununla birlikte, Fe150, Fe300 ve CMF gruplarında sıcaklıkla birlikte anlamlı miktarda artış gözlenmiştir. Çalışmamızla uyumlu olarak, yine alabalıklarda yapılan bir çalışmada su sıcaklığını günde 1°C arttırarak 18°C'den 24°C'ye çıkartıldığında karaciğer dokusundaki HSP 90 gen ekspresyonlarının dramatik şekilde arttığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2017). Sonuç olarak çalışmamızda, hem demirin hemde termal strese maruz bırakılan alabalıkların HSP70 ile HSP90 gen ekspresyon yanıtlarının indüklenmesinin ve çalışma mekanizmalarının farklı olduğu görülmüştür ve bu mekanizmanın daha detaylı çalışmalarla ortaya çıkarılması gerektiği düşünülmektedir.

## 5.2. IL1-β mrna ekspresyonlarının değerlendirilmesi

IL1-β güçlü pro-inflamatuvar etkiye sahip bir sitokindir ve enfeksiyon ve vücut hasarı gibi durumlarda konağın doğal bağışıklık yanıtını başlatan ve güçlendiren bir rol üstlenir. IL-1β organizmaların enfeksiyona yanıt vermesini sağlayan ve inflamasyona yol açan bir dizi reaksiyonu indükleyen en önemli erken yanıt proinflamatuvar sitokinlerinden biridir (Wang ve ark., 2006). Çalışmamızda, besleme sonunda IL1-β gen ekspresyon seviyeleri Fe300 ve Fe600 gruplarında Fe0 ve CMF grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Bu durumda Fe300 ve Fe600 gruplarındaki demir miktarının balıklarda enflamasyon oluşturduğu sonucuna rahatlıkla varılabilmektedir. Benzer şekilde, Fazelan ve ark. (2020) sazan balıklarının bakıra maruz bırakıldığında, inflamatuvar cevaplarının tetiklendiğini ve IL1-β ekspresyonunu arttırdıklarını bildirmiştir. Kou ve ark. (2023) yüksek dozda çinko içeren

yemlerle beslenen iri ağızlı levrelerin (*Micropterus salmoides*) IL1- $\beta$  ekspresyonunu arttırdığını belirtmiştir. Çalışmamızda, termal stres sonunda ise Fe300 ve Fe600 gruplarındaki IL1- $\beta$  ekspresyonları anlamlı derecede düşerken, Fe150 ve CMF gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kısmen artmıştır. Termal stresin Atlantik cod balıklarında (*Gadus morhua*; Pérez-Casanova et al., 2008), Atlantik somonunda (*Salmo salar*) IL1- $\beta$  ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Zanuzzo ve ark., 2020). Çalışmamızdaki Fe150 ve ticari yemle beslenen grubun (CMF) sıcaklık stresine karşı IL1- $\beta$  ekspresyonunu arttırması literatür ile uyumludur. Diğer taraftan, Fe300 ve Fe600 gruplarının besleme sonunda zaten yüksek olan IL1- $\beta$  ekspresyonunu azaltması sitokinlerin stresle baş edememesinden kaynaklanabilir. Aynı şekilde, Fe0 grubunun hem besleme hem de termal stres sonunda düşük pro-inflamatuvar IL1- $\beta$  ekspresyonu göstermesi malnütrisyona bağlı olarak gerekli bağışıklık tepkisini gösterememesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

### 5.3. Cas3 mrna ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi

Strese karşı, hücrelerin çeşitli koruyucu mekanizmaları olsa da, hücrelerin stres ile başa çıkma yeteneğinin üstündeki bir stres artışı, hücre sinyalleşmesinin bozulmasına, kapsamlı DNA hasarına ve hücre apoptozisine (programlanmış hücre ölümü) yol açabilir (Chandra ve ark., 2000). Hücrelerde meydana gelen apoptoz canlınının gelişim, doku homeostazının sağlanması ve bağışıklık tepkilerinde çok rol oynayan önemli yaygın bir fizyolojik süreçtir. Diğer taraftan kaspazlar (sistein aspartik asit proteaz) ise bir protein ailesi olup, apoptoz oluşumunda önemli rol oynarlar ve bu aileden kaspaz-3 hücresel yapı ve fonksiyon kaybına yol açarak apoptotik hücre ölümüne neden olur (Cheng ve ark., 2015). Çalışmamızda besleme denemesinin sonunda, Fe300 ve Fe600 gruplarının Cas3 gen ekspresyonlarının Fe150 ve CMF gruplarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızla uyumlu olarak, Nawaz ve ark. (2006) in vitro alabalık hepatositlerinin bakıra maruz bırakıldığında Cas3 ekspresyonlarını arttırdığını bildirmiştir. Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, artan demir dozlarının balıklar için normalin üzerinde bir stres oluşturup hücre hasarına yol açtığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, çalışmamızda termal stresle birlikte grupların Cas3 gen ekspresyonunda artış olmuştur ancak sadece Fe150 ve CMF gruplarında istatistiksel bir artış gözlenmiştir. Benzer şekilde düşük sıcaklığa maruz kalan turuncu benekli kaya balıklarında (*Epinephelus coioides*) (Sun ve ark., 2019), akut sıcaklık artışında balon balıklarında (*Takifugu obscurus*) (Cheng ve ark., 2015) ve alabalıkların beyin dokularında (Topal ve ark., 2021) Cas3 gen ekspresyonunun arttırdığı ortaya konulmuştur. Dolayısıyla termal stresin balıklarda doku hasarının oluşumuna neden olduğu açıktır. Çalışmamızdaki Fe150 ve CMF gruplarının Cas3 aktivasyonu diğer gruplara göre besleme finalinde daha düşük iken termal stres sonrasında anlamlı derecede artması



termal stres sonrasındaki HSP70 gen ekspresyon seviyelerinin azalması ile uyumludur. Bu durumda oluşan hasara karşı hücrenin protein onarımı yerine apoptoza uğradığı sonucuna varılabilmektedir (Beere 2004).

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Çalışmamızda kullandığımız bitkisel bazlı yem formülasyonunda demir ilave edilmeyen sadece yem hammaddelerinin (mineral mix dahil olmak üzere) içindeki demir miktarı ile beslenen Fe0 grubu balıkları, gerekli bağışıklık yanıtlarını gösterememiştir.
- Besleme denemesi sonunda, Fe300 (toplam 403,4 mg/kg yem) ve Fe600 (toplam 741 mg/kg yem) grubundaki balıkların özellikle IL1  $\beta$  ve Cas3 gen ekspresyon parametrelerinin diğer gruplara göre daha yüksek olması göz önünde bulundurulduğunda bu dozlarda demirin balıklar için stres kaynağı oluşturduğu düşünülmektedir.
- Fe150 ve CMF (ticari yemle beslenen) grupların besleme denemesi sonunda IL1  $\beta$  ve Cas3 gen ekspresyonlarının benzer olması Fe150 demir dozunun balıklar için kabul edilebilir düzeyde olduğu sonucuna varılabilir.
- Farklı dozlarda demir ile beslenme HSP90 gen ekspresyonlarını etkilememiştir. Ancak termal stress sonrasında Fe150,Fe300 ve CMF gruplarında anlamlı düzeyde artmıştır.
- Termal stres sonunda Fe0 grubu haricindeki bütün gruplarda hsp70 gen ekspresyon seviyeleri azalmıştır.

Sonuç olarak, farklı dozlarda demir ilave edilen yemlerle beslenen gökkuşacağı alabalığında HSP70,HSP90, IL1  $\beta$  gen ekspresyonları üzerine etkisinin değerlendirildiği bu çalışmada, deneme grupları arasında 150 mg/kg yem demir ilave edilen (toplam ~270 mg/kg yem) yemle beslenen gökkuşacağı alabalığında antioksidan sistem ve termal strese karşı daha iyi yanıt verdiği gözlenmiştir. Bu miktarda ticari yemdeki demir miktarı (253 mg/kg yem) ile uyumludur.

## Kaynaklar

Aisen, P., Enns, C., Wessling-Resnick, M. 2001. "Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33(10), 940-959.

Alak, G., Ucar, A., Parlak, V., Yeltekin, A. Ç., Taş, I. H., Ölmez, D., Kocaman, E. M., Yılgin, M., Atamanalp, M. ve Yanık, T. 2017. "Assessment of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activity, gene expression and antioxidant enzyme activity on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues exposed to biopesticide", *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 203, 51-58.

Alfonso, S., Gesto, M., Sadoul, B. 2021. "Temperature increase and its effects on fish stress physiology in the context of global warming", *Journal of Fish Biology*, 98(6), 1496-1508.

Almroth, B. C., Asker, N., Wassmur, B., Rosengren, M., Jutfelt, F., Gräns, A., Sundell, K., Axelsson, M., Sturve, J. 2015. "Warmer water temperature results in oxidative damage in an Antarctic fish, the bald notothen", *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 468, 130-137.

Asadi, M., Taghizadeh, S., Kaviani, E., Vakili, O., Taheri-Anganeh, M., Tahamtan, M., Savardashtaki, A. 2022. "Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(4), 1633-1645.

Barton, B. A. 2002. "Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids", *Integrative and Comparative Biology*, 42, 517–525.

Basu, N., Todgham, A. E., Ackerman, P. A., Bibeau, M. R., Nakano, K., Schulte, P. M., Iwama, G. K. 2002. "Heat shock protein genes and their functional significance in fish", *Gene*, 295 (2), 173-183.

Beere, H. M. 2004. "The stress of dying': the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis", *Journal of Cell Science*, 117(13), 2641-2651.

Beitinger, T.L., Bennett, W.A., McCauley, R.W. 2000. "Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature", *Environmental Biology of Fishes*, 58, 237–275.

Benítez-Dorta, V., Caballero, M. J., Betancor, M. B., Manchado, M., Tort, L., Torrecillas, S., Zamorano, M. J., Izquierdo, M., Montero, D. 2017. "Effects of thermal stress on the expression of glucocorticoid receptor complex linked genes in Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Acute and adaptive stress responses", *General and Comparative Endocrinology*, 252, 173-185.

Bowen, L., Werner, I., Johnson, M. L. 2006. "Physiological and behavioral effects of zinc and temperature on coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*)", *Hydrobiologia*, 559, 161-168.,

Bury, N., Grosell, M. 2003. "Iron acquisition by teleost fish", *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 135(2), 97-105.

Carriquiriborde, P., Handy, R. D., Davies, S. J. 2004. "Physiological modulation of iron metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low and high iron diets", *Journal of Experimental Biology*, 207(1), 75-86.





Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S. 2000. "Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress", *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3-4), 323-333.

Cheng, C. H., Guo, Z. X., Luo, S. W., Wang, A. L. 2018. "Effects of high temperature on biochemical parameters, oxidative stress, DNA damage and apoptosis of pufferfish (*Takifugu obscurus*)", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 150, 190-198.

Cheng, C. H., Yang, F. F., Liao, S. A., Miao, Y. T., Ye, C. X., Wang, A. L., Tan, J.W., Chen, X. Y. 2015. "High temperature induces apoptosis and oxidative stress in pufferfish (*Takifugu obscurus*) blood cells", *Journal of Thermal Biology*, 53, 172-179.

Clark, M. S., Peck, L. S. 2009. "HSP70 heat shock proteins and environmental stress in Antarctic marine organisms: a mini-review", *Marine Genomics*, 2 (1), 11-18.

Covello, J. M., Bird, S., Morrison, R. N., Battaglione, S. C., Seacombs, C. J., Nowak, B. 2009. "Cloning and expression analysis of three striped trumpeter (*Latris lineata*) pro-inflammatory cytokines, TNF- $\alpha$  and IL- $\beta$ , in response to infection by the ectoparasitic, *Chondracanthus goldsmidi*", *Fish & Shellfish Immunology*, 26; 773–786.

Dülger, N., Kumlu, M., Türkmen, S., Ölçülü, A., Eroldoğan, O. T., Yılmaz, H. A., Öçal, N. 2012. "Thermal tolerance of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles acclimated to three temperature levels", *Journal of Thermal Biology*, 37(1), 79-82.

Engelsma, M. Y., Huising, M. O., van Muiswinkel, W. B., Flik, G., Kwang, J., Savelkoul, H. F., Verburg-van Kemenade, B. L. 2002. "Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1", *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 87(3-4), 467-479.

Evliyaoğlu, E., Kilercioğlu, S., Yılmaz, H. A., Turchini, G. M., Paolucci, M., Clark, T. D., Demirkale, İ., Eroldoğan, O. T. 2022. "Iron supplementation in plant-based aquafeed: Effects on growth performance, tissue composition, iron-related serum parameters and gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", *Aquaculture*, 550, 737884.

Fazelan, Z., Hoseini, S. M., Yousefi, M., Khalili, M., Hoseinifar, S. H., Van Doan, H. 2020. "Effects of dietary eucalyptol administration on antioxidant and inflammatory genes in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ambient copper", *Aquaculture*, 520, 734988.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. "Fishstat Statics Database", [https://www.fao.org/fishery/statistics-query/en/aquaculture/aquaculture\\_quantity](https://www.fao.org/fishery/statistics-query/en/aquaculture/aquaculture_quantity)

Fu, D., Chen, J., Zhang, Y., Yu, Z. 2011. "Cloning and expression of a heat shock protein (HSP) 90 gene in the haemocytes of *Crassostrea hongkongensis* under osmotic stress and bacterial challenge", *Fish & Shellfish Immunology*, 31(1), 118-125.

Gesto, M., López-Patiño, M. A., Hernández, J., Soengas, J. L., Míguez, J. M. 2013. "The response of brain serotonergic and dopaminergic systems to an acute stressor in rainbow trout: a time course study", *Journal of Experimental Biology*, 216(23), 4435-4442.

Gorissen, M., Flik, G. 2016. "The endocrinology of the stress response in fish: an adaptation-physiological view", *Fish Physiology*, 35, 75-111.

IPCC, in: R.K. Pachauri, L.A. Meyer (Eds.), *Climate Change 2014: Synthesis Report. "Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change"*, Core Writing Team, IPCC, Geneva, Switzerland, 2014.

Islam, M. J., Kunzmann, A., Slater, M. J. 2022. "Responses of aquaculture fish to climate change-induced extreme temperatures: A review" *Journal of the World Aquaculture Society*, 53(2), 314-366.

Islam, M. J., Slater, M. J., Bögner, M., Zeytin, S., Kunzmann, A. 2020. "Extreme ambient temperature effects in European seabass, *Dicentrarchus labrax*: Growth performance and hemato-biochemical parameters", *Aquaculture*, 522, 735093.



- Kou, H., Liu, X., Hu, J., Lin, G., Zhang, Y., Lin, L. 2023. "Impact of dietary zinc on the growth performance, histopathological analysis, antioxidant capability, and inflammatory response of largemouth bass *Micropterus salmoides*", *Fish & Shellfish Immunology*, 109025.
- Köhler, H. R., Bartussek, C., Eckwert, H., Farian, K., Gränzer, S., Knigge, T., Kunz, N. 2001. "The hepatic stress protein (hsp70) response to interacting abiotic parameters in fish exposed to various levels of pollution", *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 8, 261-279.
- Köhler, H. R., Eckwert, H., Triebkorn, R., Bengtsson, G. 1999. "Interaction between tolerance and 70 kDa stress protein (hsp70) induction in collembolan populations exposed to long-term metal pollution", *Applied Soil Ecology*, 11(1), 43-52.
- Lesser, M. P., Kruse, V. A. 2004. "Seasonal temperature compensation in the horse mussel, *Modiolus modiolus*: metabolic enzymes, oxidative stress and heat shock proteins", *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 137, 495–504. doi:10.1016/j.cbpb.2003.10.022
- Li, Y., Huang, J., Liu, Z., Zhou, Y., Xia, B., Wang, Y., Kang, Y., Wang, J. 2017. "Transcriptome analysis provides insights into hepatic responses to moderate heat stress in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", *Gene*, 619, 1-9.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. 2001. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> ΔΔCT method", *Methods*, 25(4), 402-408.
- Liyang, Y., Yan, C., Schor, N. F. 2001. "Apoptosis in the absence of caspase 3", *Oncogene*, 20(45), 6570-6578.
- Matthews, K.R., Berg, N.H. 1997. "Rainbow trout responses to water temperature and dissolved oxygen stress in two southern California stream pools", *Journal of Fish Biology*, 50:50–67. doi:10.1111/j.1095-8649.1997.tb01339.x
- Musharraf, M., Khan, M. A. 2019. "Requirement of fingerling Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton) for dietary iron based on growth, whole body composition, haematological parameters, tissue iron concentration and serum antioxidant status", *Aquaculture*, 504, 148-157.
- Nawaz, M., Manzl, C., Lacher, V., Krumschnabel, G. 2006. "Copper-induced stimulation of extracellular signal-regulated kinase in trout hepatocytes: the role of reactive oxygen species, Ca<sup>2+</sup>, and cell energetics and the impact of extracellular signal-regulated kinase signaling on apoptosis and necrosis", *Toxicological Sciences*, 92(2), 464-475.
- Pérez-Casanova, J. C., Rise, M. L., Dixon, B., Afonso, L. O. B., Hall, J. R., Johnson, S. C., Gamperl, A. K. 2008. "The immune and stress responses of Atlantic cod to long-term increases in water temperature", *Fish & Shellfish Immunology*, 24(5), 600-609.
- Ranford, J. C., Coates, A. R., Henderson, B. 2000. "Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones", *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2(8), 1-17.
- Rebl, A., Verleih, M., Köbis, J. M., Kühn, C., Wimmers, K., Köllner, B., Goldammer, T. 2013. "Transcriptome profiling of gill tissue in regionally bred and globally farmed rainbow trout strains reveals different strategies for coping with thermal stress", *Marine Biotechnology*, 15, 445-460.
- Reid, G. K., Gurney-Smith, H. J., Marcogliese, D. J., Knowler, D., Benfey, T., Garber, A. F., Forster, I., Chopin, T., Brewer-Dalton, K., Moccia, R. D., Flaherty, M., Smith, C. T., De Silva, S. 2019. "Climate change and aquaculture: Considering biological response and resources", *Aquaculture Environment Interactions*, 11, 569–602.



Roberts, R. J., Agius, C., Saliba, C., Bossier, P., Sung, Y. Y. 2010. "Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review", *Journal of Fish Diseases*, 33(10), 789-801.

Sadoul, B., Geffroy, B. 2019. "Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes", *Journal of Fish Biology*, 94(4), 540-555.

Schreck, C. B., & Tort, L. 2016. "The concept of stress in fish", *Fish Physiology*, 35, 1-34.

Son erişim tarihi: 29 Kasım 2023

Son erişim tarihi: 28 Kasım 2023

Sun, Z., Tan, X., Liu, Q., Ye, H., Zou, C., Xu, M., Zhang, Y., Ye, C. 2019. "Physiological, immune responses and liver lipid metabolism of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) under cold stress", *Aquaculture*, 498, 545-555.

Take, H., Baeverfjord, G., Lunde, M., Kolstad, K., Andersen, Ø. 2005. "The effect of heat and cold exposure on HSP70 expression and development of deformities during embryogenesis of Atlantic salmon (*Salmo salar*)", *Aquaculture*, 249(1-4), 515-524.

Topal, A., Özdemir, S., Arslan, H., Çomaklı, S. 2021. "How does elevated water temperature affect fish brain? (A neurophysiological and experimental study: Assessment of brain derived neurotrophic factor, cFOS, apoptotic genes, heat shock genes, ER-stress genes and oxidative stress genes)", *Fish & Shellfish Immunology*, 115, 198-204.

Tort, L. 2011. "Stress and immune modulation in fish", *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1366-1375.

Türkiye İstatistik Kurumu. "Su Ürünleri İstatistikleri"  
<https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=97&locale=tr>,

Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. T. D. 2005. "Metals, toxicity and oxidative stress", *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161-1208.

Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., Diniz, M. 2012. "Effect of temperature on oxidative stress in fish: lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*", *Ecological Indicators*, 23, 274-279.

Wang, Y., Liu, Z., Li, Z., Shi, H., Kang, Y., Wang, J., Huang J., Jiang, L. 2016. "Effects of heat stress on respiratory burst, oxidative damage and SERP1H1 (HSP47) mRNA expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*", *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(2), 701-710.

Wang, Y., Wang, Q., Baoprasertkul, P., Peatman, E., Liu, Z. 2006. "Genomic organization, gene duplication, and expression analysis of interleukin-1 $\beta$  in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)", *Molecular Immunology*, 43(10), 1653-1664.

Wendelaar-Bonga, S. E. 1997. "The stress response in fish", *Physiological reviews*, 77(3), 591-625.

Yabu, T., Kishi, S., Okazaki, T., Yamashita, M. 2001. "Characterization of zebrafish caspase-3 and induction of apoptosis through ceramide generation in fish fathead minnow tailbud cells and zebrafish embryo", *Biochemical Journal*, 360(1), 39-47.

Yanar, M., Evliyaoğlu, E., Tekelioğlu, B. K. 2023. "Sex Differences in Thermal Tolerance of Nine Ornamental Fish Species from the Poeciliidae, Cichlidae and Cyprinidae Family", *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 23(6).

Zanuzzo, F. S., Beemelmans, A., Hall, J. R., Rise, M. L., & Gamperl, A. K. 2020. "The innate immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) is not negatively affected by high temperature and moderate hypoxia", *Frontiers in Immunology*, 11, 1009.





T.C.  
TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU BAŞKANLIĞI  
Araştırma Destek Programları Başkanlığı

Sayı : E-16264401-161.3.1-532501

02.01.2024

Konu : 123O607 Numaralı Proje - Sonuç Raporu

**Sayın Ece EVLİ YAOĞLU**

Yürütücülüğünü yaptığınız **123O607** numaralı ve "**Demir Sülfat Heptahidrat'ın Alabalık (Onchorhyncus Mykiss) Yem Rasyonlarına İlavesinin Büyüme, Antioksidan Enzimler ve Termal Stres Üzerine Olan Etkileri**" başlıklı projenizin **Sonuç Raporu**, Grup Yürütme Kurulumuzun **22.12.2023** tarih ve **832** sayılı toplantısında görüşülmüş ve ilgili raporun kabulüne karar verilmiştir.

Bu proje kapsamında yapacağınız çıktılarına ilişkin bilgilerin [ardeb-pts.tubitak.gov.tr](http://ardeb-pts.tubitak.gov.tr) adresinden erişebileceğiniz çıktı ekleme bölümüne girilmesi ve ilgili dosyaların bu bölüme yüklenmesi önem taşımaktadır.

Bilgilerinizi saygılarımla rica eder, çalışmalarınızda başarılar dilerim.

**Dr. Öğr. Üyesi Naci SAĞLAM**  
Tarım, Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma  
Destek Grubu (TOVAG)  
Grup Koordinatörü

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmış ve proje yürütücüsünün (ECE EVLİ YAOĞLU) TÜBİTAK ARDEB PROJE TAKİP SİSTEMİ hesabına yüklenmiştir.  
Evrak doğrulaması talepleri, [ebys@tubitak.gov.tr](mailto:ebys@tubitak.gov.tr) adresine e-posta yoluyla yapılabilir.

**Bilgi Notu:**

- TÜBİTAK tarafından kabul edilebilir geçerli bir mazeret bildirilmeksizin; proje gelişme raporlarının sözleşmede belirtilen tarihlerde, proje sonuç raporlarının ise, sözleşmede belirtilen proje bitiş tarihinden itibaren 2 (iki) ay içinde gönderilmemesi halinde, ilgili rapor dönemine ait Proje Teşvik İkramiyeleri (PTİ) ödenmeyecektir.
- Proje ekibi tarafından, TÜBİTAK desteği ile yürütülmekte/sonuçlandırılmış olan projeler kapsamında yapılan yayınlarda [makale, kitap, bildiri (sözlü sunum/poster sunum), tez, yayılım vb.] proje sözleşmesi ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği (AYEK) gereğince ilgili proje numarası ile birlikte TÜBİTAK desteği belirtilmelidir.
- Proje sözleşmeniz gereği, proje kapsamında yapacağınız hiçbir yayın, iş ve işlemde TÜBİTAK logosu kullanılamaz.

**Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmış ve proje yürütücüsünün (ECE EVLİYAOĞLU) TÜBİTAK ARDEB PROJE TAKİP SİSTEMİ hesabına yüklenmiştir.**  
**Evrak doğrulaması talepleri, ebys@tubitak.gov.tr adresine e-posta yoluyla yapılabilir.**