T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

Farklı Seviyelerde Zeytin Yaprağı Ekstraktı (*Oleuropein*) İçeren Rasyonların Etlik Piliçlerde Performans ve Kesim Özellikleri İle Bazı Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Proje No: FBA-2018-6857

TEMEL ARAŞTIRMA PROJESİ

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Muhlis MACİT
Ziraat Fakültesi/Zootekni Bölümü

Araştırmacı: Arş. Gör. Gürkan SEZMİŞ
Ziraat Fakültesi/Zootekni Bölümü

10/2019

ERZURUM

ATATÜRK
ÜNİVERSİTESİ

ÖNSÖZ

Oniki ay süren araştırma, 11.09.2018-11.09.2019 tarihleri arasında BAP'ın sağladığı destekle yürütülmüş ve proje süresince söz konusu kurum tarafından 43263,46 TL mali destek sağlanmıştır. FBA-2018-6857 nolu temel araştırma projesi, farklı oranlarda zeytin yaprağı ekstraktı (oleuropein) içeren rasyonların etlik piliçlerde performans ve kesim özellikleri ile bazı antioksidan enzim aktiviteleri ve gen ekspresyonları üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla yürütülmüştür.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

İçindekiler

ÖZET 5
ABSTRACT 6
1.GİRİŞ 7
2. MATERYAL VE YÖNTEM 9
2.1. MATERYAL 9
2.2. YÖNTEM 10
2.2.1. Deneme Planı 10
2.2.2. Hayvanların bakım ve beslemesi 10
2.2.3. Canlı Ağırlık Değişiminin Belirlenmesi 10
2.2.4. Yem Tüketiminin Belirlenmesi 10
2.2.5. Yemden Yararlanma Oranının Belirlenmesi 11
2.2.6 Mortalite Özelliklerinin Belirlenmesi 11
2.2.7. Kesim Özelliklerinin Belirlenmesi 11
2.2.8. Thiobarbituric Acid Reactive Substans (TBARS) Değerinin Belirlenmesi 11
2.2.9. Enzim Aktivite Ölçümü 12
2.2.10. Moleküler Çalışmalar İçin Örneklerin Toplanması 13
2.3. İSTATİSTİK ANALİZ 15
3. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 15
3.1. Performans Parametrelerine Ait Bulgular 15
3.2. Kesim Özelliklerine Ait Bulgular 16
3.3. TBARS Değerlerine Ait Bulgular 17
3.4. Enzim Aktivasyonuna Ait Bulgular 17
3.5. Gen Ekspresyonuna Ait Bulgular 18
4. SONUÇ 19
KAYNAKLAR 20

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

ÖZET

Farklı oranlarda zeytin yaprağı ekstraktı (oleuropein) içeren rasyonların etlik piliçlerde performans ve kesim özellikleri ile bazı antioksidan enzim aktiviteleri ve gen ekspresyonları üzerine etkisini incelemek amacıyla yürütülen çalışmada, toplam 180 adet karışık cinsiyette (dişi+erkek) bir günlük yaşta etlik piliç civcivi (Ross-308) denemenin ilk 28 günü etlik piliç bazal yemi ile beslenmişlerdir.

Daha sonra cinsiyet tayini yapılarak erkek olduğu tespit edilen 24 adet etlik piliç (+%5 mortalite) deneme başı canlı ağırlıkları alındıktan sonra biri kontrol diğer ikisi muamele grubu olmak üzere üç gruba ayrılmış ve 28-35. günler arası kontrol grubu etlik piliç büyütme yemi ile muamele grupları ise sırasıyla 200 (OLE1) ve 400 (OLE2) ppm/kg oleuropein içeren büyütme yemi ile beslenmişlerdir.

Denemenin sonunda elde edilen tüm veriler SPSS (10.0 V.) paket programı ile tek yönlü varyans analizine tabi tutulmuş ve ortalamalar arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Performans özelliklerinden yem tüketimi, canlı ağırlık artışı ve mortalite değerleri muameleden etkilenmemiştir. Yemden yararlanma oranı (YYO) değerleri bakımından gruplar arasında meydana gelen farklılıklar önemli bulunmuştur ($P<0.05$). 400 (OLE2) ppm/kg oleuropein içeren rasyonla beslenen 3. grupta YYO değeri diğer gruplardan daha düşük olmuştur. Kesim özelliklerinden, soğuk karkas ağırlığı hariç, diğer kesim özellikleri bakımından gruplar arasında meydana gelen farklılıklar önemli olmamıştır ($P>0.05$). En yüksek soğuk karkas ağırlığı üçüncü grupta tespit edilmiştir. Göğüs bölgesinden alınan et örneklerinde depolamanın 3 ve 7. günlerinde tespit edilen TBARS değerleri bakımından gruplar arasında fark olmazken, 11. günde tespit edilen ortalamalar arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Ayrıca, kas ve karaciğerde tespit edilen bazı antioksidan enzim aktiviteleri (SOD ve Katalaz) ve büyüme hormonu (IGF 1) ile gen ekspresyonu değerleri bakımından gruplar arasında meydana gelene farklılıklar önemli olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Oleuropein, etlik piliç, performans, kesim özellikleri, bazı antioksidan enzim aktiviteleri, gen ekspresyonu

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of olive leaf extract (oleuropein) on performance, carcass characteristics, antioxidant enzyme activities and gene expression in broiler chickens. One hundred and eighty birds (1-day-old, Ross 308) were fed with broiler basal feed for 28 days. From day 28 to day 35, twenty-four broilers that subsequently identified as gender (+ 5% mortality), were assigned into three groups containing control, 200 (OLE1) and 400 (OLE2) ppm oleuropein / kg feed, respectively.

Obtained data were subjected to one-way analysis of variance with SPSS (10.0 V.) package program, and the differences among the means were determined by Duncan multiple comparison test. From the performance characteristics, feed consumption, live weight gain and mortality values were not affected by the treatment. The differences among the groups in terms of feed conversion ratio (FCR) values were found to be significant ($P < 0.05$). In the 3rd group (fed with 400 (OLE2) ppm / kg oleuropein), the FCR value was lower than the other groups. There were no significant differences among the the groups in terms of other slaughter traits except for cold carcass weight ($P < 0.05$). The highest cold carcass weight was determined in the third group. No significant difference was observed on the 3rd and 7th days of storage in TBARS values of meat samples taken from the chest area, but the differences among the groups in means determined on the 11th day was significant ($P < 0.05$). In addition, some antioxidant enzyme activities (SOD and Catalase) and growth hormone (IGF 1) and gene expression values were affected by treatments ($p<0.05$; $p<0.01$).

Keywords: Oleuropein, broiler, performance, carcass characteristics, antioxidant enzyme activities, gene expression

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

1. GİRİŞ

Dünyadaki en dayanıklı ağaçlardan biri olan zeytin (*Olea europaea*), özellikle Akdeniz ülkelerinde üretilen önemli tarım ürünlerindendir. Zeytin yaprakları, zeytin ağaçlarının budanması ve zeytinlerin yağının çıkarılmasından önceki temizleme ve harmanlama işlemleri sırasında elde edilen yaprak, sap ve dalları içeren bir yan üründür.

Hayvansal kökenli protein açığının en hızlı ve ucuz şekilde kapatılmasında kanatlı yetiştiriciliği büyük öneme sahiptir. Çünkü kanatlılar en kısa sürede en az miktarda yemle en fazla canlı ağırlık kazancı sağlamakta, dolayısıyla da hayvan yetiştiriciliğinin ekonomik temelini oluşturmaktadır.

Yurdumuzda kişi başına düşen tavuk eti tüketimi, gelişmiş ülke verilerinin gerisinde kalmasına rağmen, sektör oldukça yüksek standartlarda üretim yapmaktadır. Hayvansal ürün elde edilmesinde, işletme giderleri içinde yemin payı yaklaşık % 70 kadardır. Son zamanlarda bilinçli tüketicilerin ne yedikleri konusunda daha dikkatli ve seçici davranmaları ile kimyasal katkı maddesi kullanılmadan (antibiyotik, sentetik antioksidan, renk maddeleri vb.) beslenen hayvanlardan elde edilen hayvansal (et, yumurta) ürünleri tercih etmeleri, kanatlı yetiştiriciliğinde besleme tekniklerinde doğal ürünlerin kullanımlarını cazip hale getirmiştir. Keza, antimikrobiyal ve antioksidan etkilerinden dolayı antibiyotiklere ve sentetik antioksidanlara alternatif olabilecek doğal aromatik bitkiler ve bunların uçucu yağları veya ekstraktları üzerine ilgi artmış ve gün geçtikçe de artmaya devam etmektedir.

Son yıllarda moleküler genetik alanda elde edilen gelişmelere bağlı olarak genomların kompozisyonları ve işlevleri hakkında artan bilgi birikimi uygulamaya da aktarılmaya başlanmıştır. Bu gelişmeler besinlerin gen ve protein ekspresyonunu nasıl değiştirdiğini, hücre ve organizma metabolizması üzerinde nasıl etkili olduğunu anlamaya olanak vermiştir. "Nutrigenomik" terimi ilk kez DellaPenna (1999) tarafından besin maddelerinin gen ekspresyonunda oynadıkları rolle ilgilenen bir bilim dalı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra çeşitli araştırıcılar tarafından çeşitli tanımlamaları yapılan nutrigenomik ya da nutrisyonel genomik sağlık, besleme ve genomik alanlarında, moleküler genetik ve genomiğin birlikte çalışması olarak ifade edilmiştir (Afman ve Müller, 2006).

Bahsedilen varsayımların doğrultusunda nutrigenomiğin amacı, bireylerin sağlık ve üretkenliklerini optimize etmek için her bireyin genetik profiline uygun besleme uygulamalarını bulmaktır (Müller ve Kersten, 2003).

Nutrigenomiğin, besin maddelerinin genom üzerindeki etkilerini anlamaya yönelik araştırmalar üç önemli yardımcı çalışma alanı ile gerçekleştirilir. "Omik" adı verilen bu uygulamalar, genom ile gen ekspresyonu, protein sentezlenmesi ve metabolik süreçler arasındaki kantitatif ilişkileri inceleyen ve sırasıyla transkriptomik, proteomik ve metabolomik olarak isimlendirilen araştırma dallarından oluşmaktadır (Dawson., 2006). Ayrıca bu alanlardaki gelişmeler bilgisayar ve biyoinformatik uygulamalardaki gelişmelere paralel olarak hızlanmıştır (Hocquette ve ark., 2007).

Zeytin yaprağı, oleuropein ve diğer fenolik maddeler bakımından önemli bir doğal antioksidan kaynağı olup, sağlık üzerine de olumlu etkileri vardır. Çeşitli çalışma sonuçlarına bağlı olarak bu hammaddelerin değerlendirilmesi hem sağlık hem de teknolojik açıdan önemlilik arz etmektedir.

Fenolik bileşikler, gıda maddelerinin görünüş, tat ve lezzet gibi tüketim açısından önemli olan kalite özellikleri ve doğal antioksidan olarak insan sağlığı üzerine olumlu etkileri nedeniyle önemli bileşenlerdir. Sağlık açısından, sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen etkileri nedeniyle doğal antioksidan özellik gösteren fenolik bileşiklere olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Antioksidan olarak fenolik bileşiklerin kanser, kalp hastalıkları, göz hastalıkları, yaşlılık hastalıkları vb. birçok hastalığı engelleyebildiği ifade edilmektedir (Nizamlıoğlu ve Nas., 2010). Bu nedenle fenolik madde içeriği yüksek olan meyve ve sebze tüketimi hastalıklara yakalanma riskini azaltmakta ve insan sağlığı üzerine olumlu etkide bulunmaktadır. Meyve ve sebzelerde niteliklerine göre çeşitli fenolik bileşikler farklı oranlarda bulunabilmekte ve gıdaların renk, tat ve lezzetine etkide bulunmaktadır.

Hayvansal ürünlerde lipid oksidasyonu ve raf ömrünün antioksidan enzim aktiviteleri ile ilişkileri güncel konular olarak değerlendirilmektedir. Butillenmiş hydroksi-anisol (BHA), Butillenmiş hidroksi-toluen (BHT), Tert-Butilhidroquinon (TBHQ) ve diğer sentetik antioksidanlar günümüze kadar geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Bu maddelerin insan ve hayvan sağlığı üzerine olumsuz etkiler göstermesi nedeniyle tüketici tercihleri doğal ürünlere kaymış ve aromatik bitkilerin antioksidan olarak kullanımı gündeme gelmiştir.

Son zamanlarda konuyla ilgili olarak yapılan çalışmalar bitkideki genetik farklılıklar, etken maddelerin kimyasal kompozisyonu ve etki mekanizması, farklı izolasyon yöntemlerinin antioksidan aktivite üzerine etkisi, etken maddenin gıdalarda lipid oksidasyonu üzerine etkisi üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak, nutrigenomik bilimi, çiftlik hayvanlarının performans özellikleri ile fertilitesini etkileyen genom düzeyindeki faktörlerin beslenme durumu ile olan ilişkilerinin değerlendirilmesinde kullanılması gerektiği bilinmesine rağmen antioksidan enzim aktiviteleri ve hayvan beslemenin gen ekspresyonları üzerine etkisini bir arada ele alıp inceleyen Türkçe veya yabancı dilde yapılmış çalışmaya literatür taraması esnasında rastlanılmamıştır. Bu yeni araştırma alanının temel yaklaşımı, yaygın kullanılan gıda kimyasallarının genom üzerine doğrudan ya da dolaylı olarak etki ederek, gen ekpresyonunu ya da yapısını değiştirmesi, beslemenin belli şartlar altında bazı hayvanlarda ve insanlarda risk faktörü olabileceği, besleme düzeyi ve genotip hakkındaki bilgilere göre gerçekleştirilen beslemenin kronik hastalıkların önlenmesi, hafifletilmesi ve tedavi edilmesinde kullanılması için daha fazla araştırma yapılması gerektiğini açık bir şekilde ortaya koymuştur.

Aromatik bitkilerden zeytin yaprağı, hayvan beslemede yem katkı maddesi olarak kullanılabilme olanağı bulunan büyük bir potansiyele sahiptir. Ülkemizde, özellikle Ege ve Akdeniz Bölgesi'nde, söz konusu bitkilerden elde edilen ürünleri ihraç eden birçok firma bulunmaktadır. Bu firmalarla ortak

çalışmalar yapılarak, aromatik bitkilerin kendilerinin, uçucu yağlarının veya ekstralarının antioksidan aktivitelerinin saptanmasının yanı sıra besinlerinin gen ekspresyonları ile ilişkileri ortaya çıkarılabilir.

Önerilen projeyle, zeytin yaprağı ekstraktı etken maddesi olan oleuropeini farklı seviyelerde içeren rasyonların etlik piliçlerde rutin olarak çalışılan performans ve kesim özelliklerinin belirlenmesinin yanı sıra bazı antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi ve gen ekspresyonları ile ilişkisinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Projenin hedefleri maddeler halinde aşağıda verilmiştir. Bunlardan ilk 4 maddesi projenin ilk 6 ayında, geriye kalan maddeler ise 6 aya tekabül edecek şekilde toplamda 12 aylık bir süre içerisinde gerçekleştirilmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. MATERYAL

Araştırmanın hayvan materyalini, KÖYTÜR Yemsel Tavukçuluk Hayvancılık Yem Hammaddeleri Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi'nden temin edilen bir günlük yaşta toplam 180 adet karışık cinsiyette (dişi+erkek) etlik piliç civcivi (Ross-308) içerisinden erkek olduğu kesinleştirilen toplam 24 (+%5 mortalite) adet bir günlük yaşta erkek etlik piliç civcivi kullanılmıştır. Yem materyalini ise NRC (1994)'nin bildirdiği standartlara göre Samsun Yem Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi tarafından üretilen bazal yeme, CAYMAN firmasından alınan oleuropeinin (%98 saflıkta) değişik düzeylerde (0, 200, 400 ppm/kg oleuropein) ilavesiyle oluşturulmuştur. Rasyona ilave edilen oleuropeinin kimyasal değişiminin önüne geçmek için 19 Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Yem Analiz Laboratuvarı'nda denemenin son haftası hazırlanmış, yem çuvalları serin ve rutubet almayan bir alanda saklamıştır. Denemenin son haftası hazırlanması planlanan oleuropein içeren rasyonlarda kullanılacak olan etken maddenin kimyasal yapısını korumak için güneş geçirmeyen serin ortamda, koyu renkli ağzı kapalı cam şişelerde saklanmıştır.

Etlik piliçlerin beslenmesinde, etlik piliç birinci dönem başlangıç yemi (%23 ham protein ve 3025 kcal/kg ME, 0-10. günler arası), etlik piliç ikinci dönem başlangıç yemi (%22 ham protein 3075 kcal/kg ME,10-21) ve etlik piliç büyütme yemi (%21 ham protein ve 3150 kcal/kg ME, 21-35. günler arası) kullanılmıştır. Çalışma süresince periyodik olarak alınan yem örneklerinin kuru madde, ham kül, ham yağ ve ham protein analizleri Weende analiz yöntemine (Akyildiz., 1984) göre, ham selüloz analizleri ise ANKOM Technology 01/02 Selüloz, ADF, NDF analiz metoduna göre Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Yem Analiz Laboratuarı'nda yapılmıştır.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Deneme Planı

Toplam bir günlük yaşta toplam 180 adet karışık cinsiyette (dişi+erkek) etlik piliç civcivi (Ross-308) içerisinden erkek olduğu kesinleştirilen toplam 24 (+%5 mortalite) adet bir günlük yaşta erkek etlik piliç civcivi seçilerek, deneme başı canlı ağırlıkları alındıktan sonra biri kontrol (her birinde iki hayvan 6 tekerrürlü) ve iki muamele grubu (her birinde bir hayvan 6 tekerrürlü) olmak üzere 3 gruba ayrılmış ve bütün gruplar denemenin ilk 28 günü etlik piliç bazal yemi (0-10. gün etlik piliç başlatma yemi 1. dönem, 10-21. etlik piliç başlatma 2. dönem ve 21-35 etlik piliç büyütme yemi) ile beslenmişlerdir. 28. günden 35. güne kadar kontrol grubu büyütme yemi ile, muamele grupları ise sırasıyla 200 (OL1) ve 400 (OL2) ppm oleuropein /kg yem içeren rasyonlarla yemlenmişlerdir.

2.2.2. Hayvanların bakım ve beslemesi

Etlik civcivler kümese getirilmeden önce kümes dezenfekte edilip bölmelerin altlıkları serilecek ve standartlarda bildirilen ölçülere göre hesaplanan sayıda yemlik ve nipel suluklar bölmelere yerleştirilmiştir. Civcivler kümese getirilerek tartılmış ve canlı ağırlıkları benzer olacak şekilde bölmelere dağıtılmıştır. Kümes içi sıcaklığı ilk hafta 32-33 ºC'lerde olmuş, sonraki günlerde her gün yaklaşık 0,5 ºC azaltılarak 20 ºC'ye düşürülmüş ve kesim gününe kadar bu seviyede tutulmuştur. Kümes içerisinde deneme boyunca 23 saat aydınlık ve 1 saat karanlık uygulanmıştır. Hayvanlara denemenin 9. gününde ND+IB, 15. gününde Gumboro ve 19. gününde ND aşıları yapılmıştır.

2.2.3. Canlı Ağırlık Değişiminin Belirlenmesi

Bu amaçla, deneme gruplarını oluşturan hayvanlarda deneme başlangıcı ve denemenin 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerinde (haftalık) her alt grup kendi arasında ±0.1 g hassasiyetli elektronik terazide tartılmıştır. Denemenin başladığı gün esas alınarak her hafta aynı gün ve aynı saatte hayvanlar tartılarak canlı ağırlıklar belirlenmiştir. Canlı ağırlık artışı ise haftalık canlı ağırlıktan deneme başı canlı ağırlığınn çıkarılmasıyla tespit edilmiştir.

2.2.4. Yem Tüketiminin Belirlenmesi

Grupların yem tüketimleri, ayrı ayrı her alt grupta olmak üzere haftalık yapılan tartımlarla belirlenmiştir. Bu amaçla alt gruplara verilecek yemler önceden tartılmış ve *ad libitum* olarak verilmiştir. Sekizinci gün sabah yemleme yapılmadan önce önlerindeki yemler toplanarak, artan yemler verilen yemden çıkarılmış ve haftalık toplam yem tüketimi belirlenmiştir.

2.2.5. Yemden Yararlanma Oranının Belirlenmesi

Her gruba ait alt grupların haftalık yem tüketimi tespit edilerek tüketilen yemin üretilen canlı ağırlık artışı miktarına (gr) bölünmesiyle yemden yararlanma [(toplam tüketilen yem miktarı (kg)/toplam canlı ağırlık artışına (gr)] oranları belirlenmiştir.

2.2.6 Mortalite Özelliklerinin Belirlenmesi

Deneme süresi boyunca gruplarda ölümler düzenli olarak takip edilmiş, fakat söz konusu sürede herhangi bir grupta ölen hayvan olmamıştır. Dolayısıyla gruplar için mortalite oranları hesaplanmamıştır.

2.2.7. Kesim Özelliklerinin Belirlenmesi

Kesim özelliklerinin saptanması amacıyla denemenin 35. gününde toplam 18 hayvan (1 hayvan/tekerrür ortalamaya en yakın) 19 Mayıs Üniversitesi Döner Sermaye İşletmesi Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü Tavukçuluk Şubesi Kesim Ünitesi'nde kesildikten sonra tüyleri, baş ve ayakları ayrılmıştır. Daha sonra iç organları ile abdominal yağ çıkartılmış ve sıcak karkas tartımını takriben karkaslar 24 saat +4 ^{o}C'de soğuk karkas deposunda bekletildikten sonra soğuk karkas tartımı yapılmış, sıcak karkas ve soğuk karkas ağırlıkları kesim ağırlığına bölünüp yüzle çarpılarak sıcak ve soğuk randıman oranları tespit edilmiştir. Seçilen hayvanlar kesilip tartımı yapıldıktan sonra kalp, karaciğer, dalak, taşlık (boş), abdominal yağ, 0.0001 g hassas terazide tartılamış ve ağırlıkları kaydedilmiştir.

2.2.8. Thiobarbituric Acid Reactive Substans (TBARS) Değerinin Belirlenmesi

Etin raf ömrüne etki eden en önemli faktör içerdiği lipidlerin acılaşmasıdır. Bu acılaşmanın ölçüsü olan lipidlerin beta-oksidasyonunun bir göstergesi olan Thiobarbituric acid reactive substans (TBARS; mg malondialdehit/kg) değerinin belirlenmesi amacıyla deneme sonunda kesilen hayvanların göğüs dokularından alınan örneklerde TBARS seviyeleri belirlenmiştir. Raf ömrünü tespit etmek amacıyla alınan dokular (göğüs) analizin yapılacağı güne kadar -20 ^{o}C'de bekletilmiş, analize başlanacak gün için +4 ^{o}C'ye alınarak 3., 7. ve 11. gün depolanan et örneklerinde TBARS değerleri Zootekni Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda analize tabi tutulmuştur. TBARS değerlerinin belirlenmesi amacıyla 2 g örnek alınarak üzerine 12 ml TCA çözeltisi [%7,5 TCA, %0,1 EDTA, %0,1 Propil galat-3 ml etanolde çözülür] ilave edilmiş, 15-20 sn ultra-toraks'da homojenize edildikten sonra Whatman 1 filtre kağıdından süzülmüştür. Süzüntüden 3 ml alınarak deney tüpüne aktarıldıktan sonra üzerine 3 ml 0,02 M TBA çözeltisi ilave edilerek karıştırılmıştır. Deney tüpleri 100°C'de 40 dakika su banyosunda bekletildikten sonra musluk suyu altında soğutularak 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve sonra, spektrofotometrede 530 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur (Lemon 1975; Kılıç and Richards 2003). TBARS değerleri aşağıda verilen eşitlikten yararlanılarak hesaplanmıştır.

TBARS =[(absorbans/ k (0,06) x 2/1000) x 6,8] x 1000/örnek ağırlığı

2.2.9. Enzim Aktivite Ölçümü

Biyokimyasal analizler için gerekli miktarda karaciğer ve kas dokusu tartılmış analizlere göre uygun tampon çözeltiler seçilerek sulandırılıp, Qiagen TissueLyser II cihazı kullanılarak homojenize edilmiştir. Analizlerde belirtilen rpm ve sürede santrifüj edilerek süpernatantlar elde edilmiş SOD aktivitesini g/protein cinsinden ifade edebilmek için karaciğer dokusunda protein düzeyleri Lowry metoduna göre ölçülmüştür. SOD ve CAT aktivitesi Biotek Elisa Reader (Bio Tek µQuant MQX200 Elisa reader/USA) ile ölçülmüştür.

Karaciğer ve Kas Dokusu Katalaz (CAT) Aktivitesi:

Prensip: Katalaz tayininde H_2O_2 ile plazmanın inkübe edilmesinden sonra ortamda kalan hidrojen peroksitin amonyum molibdatla stabil bir kompleks oluşturması ve bunun spektrofotometrik ölçümü temeline dayanan bir metot kullanılmıştır (Goth, 1991).

Fosfat tamponu ile dilue edilen süpernatantın 0.2 mL'si, 1 mL substrat (60 µmol/L, pH: 7.4 sodyum potasyum fosfat tamponu içinde 65 mmol/mL H_2O_2) ile 37 °C'de 60 sn inkübe edilmiştir. Enzimatik reaksiyon 1 mL amonyum molibdat (32.4mmol/L) eklenerek durdurulmuş ve hidrojen peroksidin molibdatla oluşturduğu sarı renkli kompleksin absorbansı 405 nm'de köre karşı spektrofotometrede ölçülerek A numune'nin absorbans değeri elde edilmiştir. A kör 1'in absorbans değeri 1 mL substrat, 1 mL molibdat ve 0.2 mL plazmanın ilave edilmesi sonucu elde edilerek aşağıdaki formüle göre sonuçlar hesaplanmıştır.

Katalaz aktivite hesabı (kU/L) = ((A kör1 –A numune)/(A kör2-A kör3)) x 271

Karaciğer ve Kas Dokusu SOD Aktivitesi:

Prensip: Ksantin, ksantin oksidaz enzimi vasıtasıyla ürik asite dönüştürüldüğünde oluşan süperoksit radikalleri, ortamda NBT'nin (nitrobluetetrazolium) varlığında NBT ile reaksiyona girerek 560 nm dalga boyunda, maksimum absorbans veren formazon bileşiğini meydana getirirler. Eğer ortamda SOD enzimi varsa süperoksit radikalleri bu enzim tarafından H_2O_2'ye dönüştürüldüğü için formazon oluşumu azalır ve buna bağlı olarak 560 nm'de ölçülen absorbans azalır. Absorbanstaki azalmanın miktarı bize SOD aktivitesi hakkında bilgi verecektir (Sun ve ark., 1988).

Boş deney tüplerinin her birine 2.85 mL ölçüm tamponu konulmuştur. Test tüplerine 100 µL hazırlanan süpernatant eklenirken kör tüpüne 100 µL distile su eklenmiş ve 50 µL Xanthine Oxidase çözeltisi tüm tüplere aktarıldıktan sonra 25 °C'de 20 dk inkübe edilmiştir. Sonra tüm tüplere 1mL $CuCl_2$ ilave edilip, 560 nm'de reaktif solüsyonuna karşı okunmuştur. SOD'un ölçümü ve aktivitesinin belirlenmesi oluşan formazon miktarları dikkate alınarak geliştirilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

Hesaplama (EU/mg doku) = (ΔAkör – ΔAnumune) / ΔAkör

2.2.10. Moleküler Çalışmalar İçin Örneklerin Toplanması

Moleküler analizlerde kullanılacak doku örnekleri (karaciğer ve göğüs) için her gruptan kesilen altı hayvandan söz konusu dokular çıkarılıp RNA later solüsyonu içerisine konularak -86°C'de muhafaza edilmiştir.

Total RNA İzolasyonu: -80°C'de derin dondurucuda tutulan doku örnekleri alınarak karda çözünmeleri sağlanmıştır. Çözünen doku örneklerinden 100 mg veya 50 mg doku örneği alınarak önceden içlerine demir bilye atılmış olan steril ependorf tüplerine konulmuş ve üzerine 1ml Q1Azol LysisReagent eklenmiştir. Lyser cihazında 3+3 dk boyunca 40 Hz'de parçalama işlemi yapılmıştır. Daha sonra örnek üzerine 200 µL kloroform ilave edilmiş ve 15 sn vortex işleminden sonra 12000 G'de 15dk +4°C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj edildikten sonra yaklaşık 500 µL olacak şekilde en üst fazdan alınmış ve 2ml'lik toplama tüpüne konulmuştur. Örnekler daha sonra RNA izolasyon robotuna yerleştirilmiş ve yaklaşık 40 dk sonra işlem tamamlanmıştır. RNA izolasyon robotundan çıkarılan örnekler -80°C'de bir daha ki kullanıma kadar derin dondurucuda depolamamıştır.

RNA'nın Kalitatif Tayini: 3,5 µL ddH_2O, 0,5 µL 20x MOPS solüsyonu, 5 µL formamid üzerine elde edilen RNA örneklerinden 1µL alınarak üzerine konulmuş ve 65 ºC'de 15 dk süreyle etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Jel için 0,7 gr agaroz 4,38 mL 20x MOPS ve 66,5 mL ddH_2O ve 15,6 µL formamid erlenmayere konularak mikrodalga fırında 3-4 dk kaynatılıp musluk altında biraz soğutulduktan sonra üzerine 12,8 µL EtBr (etidyum bromür) eklenerek hazırlanmıştır. Jel donduktan sonra elektroforez küvetine 1x MOPS solüsyonundan jelin üzerini kaplayacak şekilde yavaşça dökülmüştür. Daha sonra örnekler yüklenmiş ve elektroforez işlemi 90 V'da 30 dakika elektrik akımı verilerek yapılmıştır. Daha sonra UV (ultraviole) ışığında bant gözlemlenmesi yapılarak görüntülenmiş ve görüntüler kaydedilmiştir.

RNA'nın Kantitatif Tayini: İzole edilen RNA'ların kantitatif analizi Nanodrop ile (OD_{260} ve OD_{280} nm'de) yapılmıştır. RNA preparasyonlarınının yaklaşık saflığını 260 ve 260 nm'deki absorbansların oranıyla (A260/A280) belirlemek mümkündür. Absorbsiyon spekturumunun şekli bazların doğasıyla değişiklik arz eder. Öyle ki, saf RNA için OD260/OD280 oranı 2,0 civarındadır. Dolayısıyla yapılan çalışmada izole edilen RNA'lar için bu oranın 2'den küçük olması durumunda izolasyon yenilenmiştir.

Total RNA'dan mRNA İzolasyonu: Total RNA izolasyonunun ardından çalışmada mRNA konsantrasyonu farkından doğacak hataları minimize etmek maksadıyla mRNA izolasyonu yapılmış ve mRNA konsantrasyonları eşitlenmiştir. mRNA izolasyonunda Total RNA'dan mRNA izolasyon kiti kullanılmıştır. mRNA izolasyonu kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiş ve aynı oranda mRNA konsantrasyonlarına sahip olan örneklerden cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

RT-PCR (Reverse Transkriptaz) ile cDNA Kütüphanesinin Hazırlanması: Elde edilen izole mRNA örnekleri buz üzerinde 5dk tutularak çözündürülmüş ve daha sonra mikrosantrifüj yapılmıştır. Kullanılacak olan kimyasallarla birlikte hacim 20 µl olacağı için 0,2 ml'lik PCR tüpleri kullanılmıştır. PCR

tüpü'ne 1 µL 50 µM Oligo dT_{20}, 1 µl 10 mMdNTPMix (pH=7.0 olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'nin her birinden 10 mM), 11-x µL ddH_2O ve 1mg total RNA'dan x µL konularak hafif pipetaj yapılmıştır (Toplam örnek miktarı 13 µL olacağı için ddH_2O miktarı 11-x µL'dir). Hazırlanan karışım 65°C'de 5 dakika ısıtılmış ve buz üzerinde en az 1 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra kısa süreli (5-10 sn) mikrosantrifüj yapılmış ve üzerine 4 µl 5xFirst-Strand Buffer, 1 µl0.1 M DTT, 1 µl Super Script TM III RT (200 units/µl) ve 1 µl RNAase OUT^{TM} eklenerek tekrar yavaşça pipetaj yapılmıştır. 50°C'de 45 dk. inkübasyonu takiben 70°C'de 15 dakika tekrar inkübe edilmiş ve cDNA kütüphanesi bu şekilde tamamlanarak -20°C'de muhafaza analize devam edilecek güne kadar muhafaza edilmiştir.

Sentezlenen cDNA'nın Kontrolü: RT-PCR ile sentezlenen cDNA'lar referans gen olarak kullanılacak GAPDH (GenBank erişim numarası: NM_204305.1) gen bölgesine spesifik primerlerle PCR'da kontrol edilmiştir. Elde edilen PCR ürünü agaroz jel elektroforezinde yürütülecek ve görüntüleme sisteminde fotoğraflandırılarak değerlendirilmiştir. Bu referans (kontrol) geninin PCR'da amlifiye edilmesi cDNA kütüphanesinin sentezlendiği anlamına gelmektedir.

Genlere Spesifik Primer ve Prob Dizaynı: İnternet ortamındaki gen bankasından (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) Çizelge'de verilen gen bank erişim numaraları ile mRNA verileri ışığında baz dizilimleri değerlendirmeye alınmış ve yine internet ortamındaki başka bir primer dizayn programı (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) kullanılarak genlerin maksimum 60-150 bp'lik kısmına spesifik primerler oluşturulmuştur. Oluşturulan primerlerin ilgili bölgeye spesifiklikleri (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) kullanılarak kontrol edilmiş ve uygun bulunmayan primerlerin seçimleri elle yapılmıştır.

Enzim Aktivite ve Gen Ekspresyon Sonuçları Arasındaki İnteraksiyonel Etkileşimlerin Karakteristik Ölçü Olarak Kullanılabilirlikleri: İstatistik analizlerle, elde edilen enzim aktivite sonuçlarının gen ekspresyonları ile aralarındaki bağlantıların kurulması hedeflenmiştir.

Tablo 1. Etlik Piliçlerde kullanılacak primerlere ait dizilim bilgileri ve genbank erişim numaraları

Primer	**Sekans (5'→3')**	**Genbank Erişim No**
CAT Forward	TGGGGGAGCTGTTTACTGCAAG	NM_001031215.2
CAT Reverse	AGCTTCCATTGGCTATGGCATTG	
SOD Forward	AGCGCAGGTGCTCACTTTAATC	NM_205064.1
SOD Reverse	TTCCTCCCTTTGCAGTCACATTG	
IGF 1 Forward	AGAAACACTGTGTGGTGCTGAG	NM_001004384.2
IGF 2 Reverse	TTGGAGCACAGTACATCTCCAG	
GAPDH Forward	AGAGGGTAGTGAAGGCTGCTG	NM_204305.1
GAPDH Reverse	ATCAAAGGTGGAGGAATGGCTG	

2.3. İSTATİSTİK ANALİZ

Deneme sonunda elde edilen veriler tam şansa bağlı deneme planında aşağıda verilen matematik modele göre analiz edilmiş ve tüm istatistik analizlerde SPSS 10.0 paket programından yararlanılmıştır (Zhang ve ark., 1996).

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$$

Y_{ij} = Bireye ait gözlem değeri,

μ = Popülasyon ortalaması,

α_i = Oleuropeinin doz etkisi,

e_{ij} = Deneme hatası

3. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Farklı seviyelerde zeytin yaprağı ekstraktı içeren rasyonların etlik piliçlerde performans ve kesim özellikleri ile bazı antioksidan enzim aktiviteleri ve gen ekspresyonu üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada elde edilen bulgular aşağıda ayrı ayrı ele alınarak değerlendirilmiştir (Tablo 2-Tablo 7).

3.1. Performans Parametrelerine Ait Bulgular

Grupların deneme başı ağırlıkları, deneme sonu ağırlıkları, toplam ağırlık artışları, toplam yem tüketimi ve yemden yararlanma oranları Tablo 2 'de verilmiştir.

Tablo 2. Deneme gruplarının performans özelliklerine ait varyans analizi sonuçları ile ortalama ve standart hatalar

Gruplar	**DBA(g)**	**DSA(g)**	**TAA(g)**	**TYT(g)**	**YYO** (TYT/TAA)
Kontrol	1148,35	2204.17	1055.82	1949.23	1.85[a]
OLE-1	1112,30	2161.17	1048.87	1905.22	1.82[a]
OLE-2	1131,08	2267.67	1138.58	1902.95	1.68[b]
SEM	17,4	34.40	3.38	31.08	0.045
P	0.364	0.114	0.141	0.510	**0.029**
Polinomiyal Analiz					
Linear	0.492	0.198	0.100	0.309	**0.014**
Kuadratik	0.296	0.092	0.255	0.591	**0.278**

a-b: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p<0.05$)
***DBA** (Deneme başı ağırlığı), ***DSA** (Deneme sonu ağırlığı), ***TAA** (Toplam ağırlık artışı), ***TYT** (Toplam yem tüketimi), ***YYO** (Yemden yararlanma oranı), **Kontrol:** oleuropein içermeyen, yani bazal yemle beslenen grup, **OLE-1:** Kilogramında 200 ppm oleuropein içeren yemle beslenen grup, **OLE-2:** Kilogramında 400 ppm oleuropein içeren yemle beslenen grup.

Yemden yararlanma oranı (YYO) değerleri hariç (P<0.05), diğer performans parametreleri bakımından gruplar arasında fark gözlenmemiştir (P>0.05). OLE-2 grubunun muameleden etkilendiği ve diğer gruplardan daha düşük YYO değerine sahip olduğu tespit edilmiştir (P<0.05).

Etlik piliç rasyonlarına ilave edilen zeytin yaprağı ekstraktının toplam ağırlık artışı, toplam yem tüketimini etkilemediğini belirten Varmaghany ve ark. (2013)'nın bulgularıyla mevcut çalışmadan elde edilen sonuçlar benzerlik göstermiştir. Yine, rasyona ilave edilen oleuropeinin yemden yararlanma oranını iyileştirdiğini belirten Güray ve ark. (2009)'nın bildirişleriyle mevcut çalışmada tespit edilen sonuçlar uyumlu olurken, Shafey ve ark. (2013)'nın bildirişleriyle çelişmektedir. Bu durum, bazal yeme katılan zeytin yaprağının içerisinde bulunan etken maddelerin farklılığından, zeytin hasadı sonrası yaprakların toplanma süresi nedeniyle etken maddelerin değişiminden, çevre koşullarından, zeytin ağacı genotipi ile bakım ve besleme koşullarından kaynaklanmış olabileceği gibi etken maddenin (oleuropein) saf (%98) olarak bazal yeme ilave edilmesinden de kaynaklanmış olabilir.

3.2. Kesim Özelliklerine Ait Bulgular

Deneme gruplarının kesim özelliklerine ait varyans analizi sonuçları ile ortalama ve standart hataları Tablo 3 'de verilmiştir.

Tablo 3. Deneme gruplarının kesim özelliklerine ait varyans analizi sonuçları ile ortalama ve standart hataları

Gruplar	Kesim Ağırlığı (g)	SKA (g)	Kalp (g)	Karaciğer (g)	Dalak (g)	Taşlık (g)	AY (g)	SoKA (g)	SKR (%)	SoKR(%)
Kontrol	2150,15	1639.72	11.42	39.83	2.85	35.37	16.20	1497,1^{ab}	76.84	70.19
OLE-1	2010,25	1619.18	11.10	37.57	2.23	33.72	14.98	1446,3^{b}	77.77	69.67
OLE-2	2155,05	1704.23	11.78	41.92	2.23	36.85	13.07	1571.4^{a}	76.12	70.72
SEM	33,60	27.03	0.58	1.51	0.26	1.86	1.57	28.39	0.40	1.62
P	0,110	0.100	0.715	0.159	0.164	0.509	0.389	0.023	0.160	0.902
Polinomiyal Analiz										
Linear	0,195	0.112	0.663	0.344	0.093	0.582	0.180	0.084	0.831	0.822
Kuadratik	0,090	0.132	0.495	0.093	0.367	0.311	0.858	0.023	0.061	0.700

a-b: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (p<0.05)
SKA: Sıcak karkas ağırlığı, **AY:** Abdominal yağ, **SoKA:** Soğuk karkas ağırlığı, **SKR:** Soğuk karkas randımanı, **SoKR:** Soğuk karkas randımanı. **Kontrol:** Oleuropein içermeyen, yani bazal yemle beslenen grup, **OLE-1:** Kilogramında 200 ppm oleuropein içeren yemle beslenen grup, **OLE-2:** Kilogramında 400 ppm oleuropein içeren yemle beslenen grup.

Kesim ağırlığı, sıcak karkas ağırlığı, kalp, karaciğer, dalak, taşlık, abdominal yağ ağırlıkları, sıcak karkas randımanı ve soğuk karkas randımanı verileri bakımından gruplar arasında fark önemsiz olmasına rağmen (P>0.05), soğuk karkas ağırlığı bakımından gruplar arasındaki fark önemli bulunmuştur (P<0.05).

Karkas özellikleri (kesim ağırlığı, sıcak karkas ağırlığı, sıcak karkas randımanı ve soğuk karkas randımanı) ile organların (kalp, karaciğer, dalak, taşlık) rasyona ilave edilen zeytin yaprağı ekstraktından

etkilenmedikleri bulgusu, Basmacıoğlu ve Yavaş (2013)'ın sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Soğuk karkas ağırlığı bakımından gruplar arasında farklılık bulunmuş, en yüksek değer 400 ppm/kg rasyon ile beslenen OLE2 grubunda tespit edilmiştir (P<0.05).

3.3. TBARS Değerlerine Ait Bulgular

Grupların kas dokularında belirlenen Thiobarbituric Acid Reactive Substans (TBARS) değerlerine ait varyans analizi sonuçları ile ortalama ve standart hataları Tablo 4 'de verilmiştir.

Tablo 4. Deneme gruplarının kasta (göğüs) belirlenen TBARS değerlerine ait varyans analizi sonuçları ile ortalama ve standart hataları

Gruplar	3. Gün	7. Gün	11. Gün
Kontrol	0,437	0,218	0,133^{b}
OLE-1	0,407	0,151	0,162^{b}
OLE-2	0,396	0,203	0,326^{a}
SEM	0,029	0,056	0,035
P	0,609	0,683	0,030

a-b: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (p<0.05)
Kontrol: Oleuropein içermeyen, yani bazal yemle beslenen grup, **OLE-1:** Kilogramında 200 ppm oleuropein içeren yemle beslenen grup, **OLE-2:** Kilogramında 400 ppm oleuropein içeren yemle beslenen grup.

Göğüs bölgesinden alınan et örneklerinde depolamanın 3 ve 7. günlerinde tespit edilen TBARS değerleri bakımından gruplar arasında fark olmazken, 11. günde tespit edilen ortalamalar arasındaki fark önemli bulunmuştur (P<0.05). Elde edilen bulgular, Gümüş ve Küçükersan (2017)'nın bildirdikleri sonuçlarla benzerlik gösterirken, Bölükbaşı ve Erhan (2006)'ın bildirişleriyle uyumlu olmamıştır.

Bu durum, aromatik bitkilerin antioksidan aktivitelerinin yapılarındaki fenolik bileşiklerle (Skerget ve ark., 2005), bu bileşiklerin serbest radikalleri temizleme ve metal iyonlarla bileşik oluşturmaları, tekli oksijen oluşumunu engelleme veya azaltmaları (Rice Evans ve ark.,1995; Pekkarinen ve ark., 1999) ve bu özellikleri sayesinde antioksidan olarak görev yapmaları (Önenç ve Açıkgöz, 2005) ile açıklanabilir.

3.4. Enzim Aktivasyonuna Ait Bulgular

Deneme gruplarının enzim aktivasyonu özelliklerine ait bulguları Tablo 5'de verilmiştir. Kas (göğüs) ve karaciğer dokularından alınan örneklerde katalaz ve süperoksit dismütaz enzim aktivasyonu değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılıklar çok önemli bulunmuştur (P<0.01).

Tablo 5. Deneme gruplarının enzim aktivasyonu değerlerine ait varyans analizi sonuçları ile ortalama ve standart hatalar

Gruplar	Kas (Göğüs)		Karaciğer	
	SOD (EU/g protein)	CAT (U/g doku)	SOD (EU/g protein)	CAT (U/g doku)
Kontrol	57,95^{c}	45,44^{c}	116,12^{b}	85,92^{c}

OLE-1	70,71[b]	53,25[b]	121,35[a]	122,88[b]
OLE-2	85,46[a]	80,05[a]	123,50[a]	127,16[a]
SEM	2,701	2,097	0,936	1,419
P	0,000	0,000	0,000	0,000
Polinomiyal Analiz				
Linear	0,000	0,000	0,000	0,000
Kuadratik	0,000	0,000	0,000	0,000

a-b-c: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p<0.05$)
***SOD** (Süperoksit dismütaz), ***CAT** (Katalaz), **Kontrol:** oleuropein içermeyen, yani bazal yemle beslenen grup, **OLE-1:** Kilogramında 200 ppm oleuropein içeren yemle beslenen grup, **OLE-2:** Kilogramında 400 ppm oleuropein içeren yemle beslenen grup.

Elde edilen bulgular, Dalia ve ark. (2017) ile Niu ve ark. (2018)'nın bulgularıyla uyumlu olmuştur. Oksidatif strese karşı metabolizma enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Enzimatik olmayan antioksidanların bir kısmı organizma tarafından sentezlenebilirken, bir kısmı da tüketilen gıdalardan temin edilmektedir. Gıdalar ile alınan antioksidanlar plazma ve dokularda serbest radikal reaksiyonlarını bozarak reaktif oksijen türlerinin üretilmesini önlemektedir. Çalışmadan elde edilen bulgular neticesinde doğal bir antioksidan olan oleuropeinin seviyesi artıkça kontrol grubuna göre katalaz ve süperoksik dismütaz aktivitesinin de arttığı tespit edilmiştir.

3.5. Gen Ekspresyonuna Ait Bulgular

Deneme gruplarının gen ekspresyonuna ait bulgular Tablo 6 ve Tablo 7'de verilmiştir. Tablo 6 'da karaciğer dokusu için CAT, SOD enzimleri ile IGF1 büyüme hormonuyla ilgili varyans analizi sonuçları, ortalamaları ve standart hataları izah edilirken, Tablo 7 'de kas (göğüs) dokusu için CAT, SOD enzimleri ile IGF1 büyüme hormonuyla ilgili varyans analizi sonuçları, ortalamaları ve standart hataları belirtilmiştir.

Tablo 6. Deneme gruplarının gen ekspresyonuna (karaciğer) ait varyans analizi sonuçları ile ortalama ve standart hataları

Karaciğer						
Gruplar	**SOD 1**	**SOD 2**	**CAT 1**	**CAT 2**	**IGF 1**	**IGF 2**
Kontrol	2,915	2,205	0,412	0,327[b]	0,087	0,059
OLE-1	3,993	3,548	1,384	0,559[b]	0,140	0,143
OLE-2	3,702	4,252	0,364	1,277[a]	0,159	0,171
SEM	0,490	0,492	0,246	0,156	0,015	0,022
P	0,710	0,248	0,116	0,004	0,160	0,094

a-b: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p<0.05$)
SOD1: SOD forward/GPDH forward, **SOD2:** SOD reserve/GPDH reverse, **CAT1:** CAT forward/GPDH forward, **CAT2:** CAT reserve/GPDH reverse**, IGF1:** IGF forward/GPDH forward, **IGF2**: IGF reserve/GPDH reverse, **Kontrol:** oleuropein içermeyen, yani

bazal yemle beslenen grup, **OLE-1:** Kilogramında 200 ppm oleuropein içeren yemle beslenen grup, **OLE-2:** Kilogramında 400 ppm oleuropein içeren yemle beslenen grup.

Tablo 7. Deneme gruplarının gen ekspresyonuna (kas) ait varyans analizi sonuçları ile ortalama ve standart hataları

Kas						
Gruplar	**SOD 1**	**SOD 2**	**CAT 1**	**CAT 2**	**IGF 1**	**IGF 2**
Kontrol	0,351	0,325^{b}	0,011^{b}	0,007	0,003^{b}	0,003^{b}
OLE-1	0,330	0,216^{b}	0,013^{b}	0,013	0,003^{b}	0,003^{b}
OLE-2	1,841	1,390^{a}	0,047^{a}	0,214	0,025^{a}	0,028^{a}
SEM	0,342	0,220	0,006	0,061	0,005	0,005
P	0,100	0,022	0,006	0,331	0,057	0,006

a-b: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p<0.05$)
SOD1: SOD forward/GPDH forward, **SOD2:** SOD reserve/GPDH reverse, **CAT1:** CAT forward/GPDH forward, **CAT2:** CAT reserve/GPDH reverse**, IGF1:** IGF forward/GPDH forward, **IGF2**: IGF reserve/GPDH reverse, **Kontrol:** oleuropein içermeyen, yani bazal yemle beslenen grup, **OLE-1:** Kilogramında 200 ppm oleuropein içeren yemle beslenen grup, **OLE-2:** Kilogramında 400 ppm oleuropein içeren yemle beslenen grup.

Deneme gruplarının gen ekspresyonuna ait bulguları Tablo 6 ve Tablo 7'de verilmiştir. Tablo 6 'da karaciğer dokusu için CAT ve SOD enzimleri ile IGF1 büyüme hormonuna ait varyans analizi sonuçları, ortalamaları ve standart hataları izah edilirken, Tablo 7 'de kas (göğüs) dokusu için CAT ve SOD enzimleri ile IGF1 büyüme hormonu için varyans analizi sonuçları, ortalamaları ve standart hataları belirtilmiştir.

Karaciğer dokusu için yapılan gen ifadesi çalışması sonucu CAT2 (CAT reserve/GPDH reverse) gruplar arasında fark önemli bulunmuş, kas dokusu için gen ekspresyonu çalışmaları sonucu ise SOD2 (SOD reserve/GPDH reverse), CAT1 (CAT forward/GPDH forward), IGF1 (IGF forward/GPDH forward) ve IGF2 (IGF reserve/GPDH reverse) değerleri bakımından gruplar arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

Zeytin yaprağı ekstraktı veya uçucu yağının etlik piliç rasyonlarına ilave edilerek performans, kesim ve lipid oksidasyonu ile ilgili sınırlı sayıda araştırma yapılmış, ancak literatür taraması sırasında zeytin yaprağı etken maddesi olan oleuropeinin (%98) etlik piliçlerde enzim aktiviteleri ve gen ekspresyonları üzerine etkileriyle ilgili Türkçe ya da yabancı dilde yayınlanmış herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Dolayısıyla, enzim aktivasyonu ve gen ekspresyonu ile ilgili olarak elde edilen değerler literatür bildirişleriyle mukayese edilip tartışılmamıştır.

4. SONUÇ

Zeytin yaprağı fenolik bileşiklerinden olan ve etlik piliç bazal yemine katılan oleuropein performans özelliklerinin en önemlisi olan yemden yaralanma oranını iyileştirmiş, depolamanın 3. gününe kadar kasta (göğüs) lipit oksidasyonunu düşürmüş, kas ve karaciğerde süperoksit düsmitaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzimlerinin aktivasyonunu artırmış ve yine aynı dokularda CAT ve SOD enzimleri ile IGF1 büyüme hormonuyla ilgili gen ifadesi değerlerini olumlu yönde etkilemiştir. Yukarıda

da bahsedildiği gibi oleuropeinin (%98) etlik piliçlerde enzim aktivitesi ve gen ekspresyonu üzerine etkisiyle ilgili Türkçe ya da yabancı dilde yayınlanmış herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Dolayısıyla, daha güvenilir sonuçlar elde etmek için oleuropeinin (%98) etlik piliçlerde enzim aktivitesi ve gen ekspresyonu üzerine etkisiyle ilgili daha fazla araştırmanın yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

Afman, L., Müller, M. 2006. Nutrigenomics: From molecular nutrition to prevention of disease. J. Am. Diet Assoc. 106: 569-576.

Akyıldız, A. R. 1986. Yemler Bilgisi ve Teknolojisi. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yay. No: 974, Ders Kitabı No: 286, Ankara.

Basmacıoğlu, H., Yavaş, İ. 2013. Etlik piliç karma yemlerine ilave edilen zeytin yaprağının performans, bazı kan parametreleri ve bağırsak mikroflorası üzerine etkileri. (Yüksek lisans Tezi).

Bölükbaşı, Ş. C. ve Erhan, M. K., 2006. Etlik piliçlerin yemlerine ilave edilen kekik yağı ve vitamin E'nin performans, doku yağ asidi kompozisyonu ve raf ömrüne etkileri. Türkiye 9. Gıda Kongresi: 24-26 Mayıs Bolu.

Dalia A. M., Loh T. C., Sazili A. Q., Jahromi M. F. and Samsudin A. A., 2017. The effect of dietary bacterial organic selenium on growth performance, antioxidant capacity, and Selenoproteins gene expression in broiler chickens. BMC Veterinary Research 13:254.

Dawson, K. A. 2006. Nutrigenomics: Feeding the genes for ımproved fertility. animal reprod. Sci. 96: 312-322.

DellaPenna, D. 1999. Nutritional genomics: Manipulating plant micronutrients to ımprove human health. Science, 285: 375-379.

Erener, G., Ocak, N., Öztürk, E., Çankaya, S., Özkanca, R. 2009. Zeytin yaprağı ekstraktının etlik piliçlerde performans, bazı kan parametreleri ve kör bağırsak mikroflorası üzerine etkileri. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Tarım ve Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Grubu, TOVAG-1070820 no'lu proje kesin raporu.

Gümüş E. ve Küçükersan S., 2017. Etlik piliç rasyonlarına doğal antioksidan ilavesinin performans, et pH değeri ile karaciğer ve kanda antioksidan aktiviteye etkisi. Vet Hekim Der Derg 88(2): 82-94.

Goth L (1991). A simple method for determenation of serum catalase activity and revision of serum catalase activity and revision of reference range. Clin Chim Acta 196,143–152.

Hocquette, J. F., Lehnert, S., Barendse, W., Cassar-Malek, I., Picard, B. 2007. Recent advances ın cattle functional genomics and their application to beef quality. Animal 1: 159-173.

Kılıc, B., Richards, M. P. 2003. Lipid oxidation in poultry doner kebap: prooxidative and antioxidative factors. Journal of Food Science 68(2): 686–689.

Lemon, D. W. 1975. An improved TBA test for rancidity. New Series Circular, vol. 51. Halifax-Laboratory, Halifax, Nova Scotia.

Müller, M., Kersten S. 2003. Nutrigenomics: Goals and strategies. nat. rev. Genet. 4: 315-322

Niu Z. Y., Min Y. N. ve Liu F. Z., 2018. Dietary vitamin E improves meat quality and antioxidant capacity in broilers by upregulating the expression of antioxidant enzyme genes. Journal of Applied Animal Research, 46:1, 397-401.

Nizamlıoğlu N. M., Nas S. 2010. Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri. Electronic Journal of Food Technologies. 5: 20-35.

Önenç, S. S. ve Açıkgöz, Z., 2005. Aromatik bitkilerin hayvansal ürünlerde antioksidan etkileri. Hayvansal Üretim 46 (1): 50-55.

Pekkarinan, S.S., Heinonen, I.M. and Hopia, A.I., 1999. Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+) – catechin as antioxidant in methyl linoleate. J. Sci. Food Agric. 79: 499-506.

Rice Avans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M. and Pridham, J.B., 1995. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenol flavonoids. Free Radical Research 22(4): 375-383.

Shafey, T. M., Almufarij, S .I., Albatshan, H. A. 2013. Effect of feding olive leaves on the performance, intestinal and carcass characteristics of broiler chickens. International Journal of Agriculture and Biology 15: 585– 589.

Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A.R., Simonic, M. and Knez, Z., 2005. Phenols, proanthocyanidis, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. Food Chemistry 89: 191-198.

Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem, 34, 497-500.

Varmaghany, S., Rahimi, S., Torshizi-Karimi, M.A., Lotfollahian, H. And Hassanzadeh, M. 2013. Effect of olive leaves on ascites incidence, hematological parameters and growth performance in broilers reared under standard and cold temperature conditions. Animal Feed Science and Technology, 185: 60-69.

Zhang, T., Ramakrishnon R., Livny., M. 1996. BIRCH: An efficient data clustering method for very large databases. Proceedings of the ACM SIGMOD Conference on Management of Data.p. 103–114, Montreal, Canada.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ