T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YUMURTAYA VERİLEN AFLATOKSİN B_1'İN BROİLER CİVCİVLERDE KAS GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK METOTLARLA İNCELENMESİ

Nimet GÜNDÜZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Yasemin ÖZNURLU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından **09202028** proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2010

ii. ÖNSÖZ

Bu çalışmaya mali destek veren Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Koordinatörlüğü'ne (BAP Proje No: 09202028), Yüksek lisans eğitimimin tez aşaması sırasında bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İlhami Çelik'e teşekkür ederim.

iii. İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGELER VE KISALTMALAR	iv
1.GİRİŞ	1
1.1.Aflatoksinler	3
1.1.1. Aflatoksinlerin Sindirim Kanalından Emilimleri ve Metabolizmalar	3
1.1.2. Aflatoksinlerin Toksikasyon Mekanizmaları	5
1.1.3. Aflatoksinlerin Etkileri	6
Aflatoksinlerin akut ve kronik toksik etkileri	6
Aflatoksinlerin teratojenik ve embryotoksik etkileri	8
Aflatoksinlerin mutajenik etkiler	9
Aflatoksinlerin karsinojenik etkileri	10
Aflatoksinlerin ımmunosüpresif etkileri	10
1.2.Hücre Çekirdeğinin Yapısı	11
1.2.1.Nükleolusların Elektronmikroskobik Yapısı	12
Fibriler merkezler	12
Diffüz fibriler komponent	13
Granüler komponent	13
1.2.2.Nükleolus Proteinleri	14
Gümüşle boyanan nükleolar protein	14
AgNORların hücre çekirdeğindeki lokalizasyonu	16
AgNORların sayı, büyüklük ve şekillerini etkileyen faktörler	16
1.3.İskelet Kasının Embriyonik Gelişimi	17
1.3.1.Prenatal Dönemde Kas Gelişimi ve Büyümesi	20
1.3.2.Postnatal Dönemde Kas Gelişimi ve Büyümesi	21

1.3.3.Kas Teli Sayısı ve Çapı Arasındaki İlişki 22

1.3.4. Kas Teli Sayısı ve Çapını Etkileyen Faktörler 22

1.4.İskelet Kası Histolojisi 24

1.4.1. İskelet Kasının Düzenlenişi 25

1.4.2. İskelet Kası Tellerinin Düzenlenişi 26

2. GEREÇ VE YÖNTEM 31

2.1. Materyal 31

2.1.1. Yumurta materyali 31

2.2. Metotlar 31

2.2.1. Aflatoksin B_1 Solüsyonlarının Hazırlanması 31

2.2.2. Enjeksiyonlar ve Kuluçka İşlemleri 32

2.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve AFB_1 Solüsyonlarının Yumurtalara Verilmesi 32

2.2.4. Yumurtaların Açılması ve Doku Örneklerinin Alınması 33

2.2.5. AgNOR Boyaması ve AgNOR Parametrelerinin Belirlenmesi 33

2.2.6. Preparatların İncelenmesi ve Dijital Görüntülerin Analizi 34

2.2.7. İstatistiksel Analizler 34

3. BULGULAR 35

3.1. Rölatif Embriyo, Göğüs ve Bacak Kası Ağırlıkları 35

3.2. AgNOR Bulguları 38

3.3. Göğüs Kası ve Bacak Kasının Embriyonik Gelişimi 51

4. TARTIŞMA 56

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 65

6. ÖZET 66

7. SUMMARY 68

8. KAYNAKLAR 69

9. ÖZGEÇMİŞ 79

iv. SİMGE ve KISALTMALAR

AF : Aflatoksin

AFB_1 : Aflatoksin B_1

DNA : Deoksiribonükleik Asit

rDNA : Ribozomal Deoksiribonükleik Asit

NOR : Nucleolus Organizer Region

RPI : RNA Polimeraz I

RPII : RNA Polimeraz II

FC : Fibriller Center

DFC : Diffuse Fibriller Component

GC : Granüler Komponent

nm : Nanometre

ng : Nanogram

µg : Mikrogram

RGK : Rölatif göğüs kası

RBK : Rölatif bacak kası

REA : Rölatif embriyo ağırlığı

CA : Civciv ağırlığı

1.GİRİŞ

İnsanların dengeli beslenmelerinde hayvansal kaynaklı besin maddelerinin önemi çok büyüktür. Bunların en önemli bölümünü de et ve et ürünleri oluşturmaktadır. Günümüzde hayvansal protein açığının kapatılabilmesi için önemli çabalar sarf edilmektedir. Bunların başında da tavuk eti üretiminin artırılmasına ilişkin çalışmalar gelmektedir (Çobanoğlu ve ark 2003). Tavuk eti ucuz, çabuk ve kolay üretilebilen, arzulanan birçok besleyici besin maddesini içermesinden dolayı iyi bir beslenme kaynağıdır. Ülkemizde hayvansal protein açığının kapatılmasında gerek üstün beslenme değeri, gerekse hayvansal proteinin kısa sürede ve ucuza sağlanabilmesi bakımından et tavukçuluğunun diğer hayvancılık kolları arasında ayrı ve önemli bir yeri vardır (Erensayın 2001, Çobanoğlu ve ark 2003). Tavuk etinin diğer etlere göre ekonomik oluşu, parçalar halinde tüketimi kolaylaştıran yeni ambalajlama tekniklerinin özellikle kentsel alanlardaki tüketim tercihlerini karşılaması; düşük kolesterollü olduğundan nedeni ile kırmızı ete tercih edilmesi yönünde tüketici bilinçlenmesiyle son yıllarda beyaz et tüketiminde kayda değer bir artış eğilimi görülmektedir. Dünyada tavukçuluk sektöründe ülke ve pazar koşullarına göre, üretim maliyetini düşürmeye yönelik çalışmalarla, planlı ve programlı üretimler yapılmaktadır (Erensayın 2001, Çobanoğlu ve ark 2003, Gürler ve ark 2004).

Dünya nüfusunun hızlı artışı karşısında, insanoğlunun yüz yüze geldiği önemli sorunlardan birini, yeterli ve dengeli beslenme oluşturmaktadır. Beslenmede hayvansal protein kaynağı olarak önemli bir yeri olan tavuk etinin payı tartışılmaz bir gerçektir. Tavuk etinin önemi, içerdiği protein açısından zengin olmasından, düşük yağ oranına sahip bulunmasından ve sindiriminin kolaylığındandır.

Hayvansal üretim içinde hızlı bir gelişme gösteren broiler yetiştiriciliği, çok kısa bir zamanda bol miktarda üretim yapılması, broilerin yemi ete dönüştürme yeteneğinin diğer büyük ve küçükbaş hayvanlara göre fazla olması, her türlü iklim koşullarında yetiştirme avantajına sahip olması, küçük alanlarda yapılabilir olması, iş gücü gereksiniminin az olması, işletme sermayesi devir hızının diğer hayvansal

üretim kollarından daha yüksek olması gibi avantajları nedeni ile hayvansal protein açığının kapatılmasında oldukça önemli bir yer tutmaktadır (Çobanoğlu ve ark 2003).

Etlik piliç yetiştiriciliğinde performans üzerine pek çok faktör etkili olmaktadır. Olumsuz yönde etkili olabilecek faktörlerin belirlenmesi ve bunların düzeltilmesi yanında performansın artırılmasına yönelik de yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların çoğu üretim dönemindeki koşullarla ilgilidir. Bunun yanında, broiler performansı üzerinde etkili olan ve en fazla göz ardı edilen unsur ise, kuluçka sırasında uygulanan işlemlerdir. Son yıllarda broiler performansı üzerine kuluçka faktörlerinin etkilerini belirlemeye yönelik bilimsel çalışmalara ağırlık verilmekle birlikte, bu konudaki çalışmalar tatmin edici boyutlarda değildir.

Broiler sektöründe verimi ve kârlılığı olumsuz yönde etkileyen yem kökenli etkenlerin başında yem hammaddeleri ve yemlerde üreyen küflerden kaynaklanan mikotoksinler gelmektedir. Yemle alınan söz konusu toksinler ve metabolitleri yaklaşık olarak 1/2200 oranında yumurtaya taşındıklarından, halk sağlığını tehdit etmeleri yanında kuluçka randımanını da düşürdükleri daha önce yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Hamilton 1982). Aynı zamanda damızlık yumurtaları kontamine eden mikotoksinler, embriyotoksisiteye neden olmakta, embriyonun immün sisteminin gelişmesini baskılamakta ve embriyonun iskelet sisteminin gelişimini de olumsuz yönde etkilemektedir. Etkilenen embriyolarda genel gelişme geriliği yanında, iskelet sisteminde de belirgin gelişme bozuklukları ortaya çıkmaktadır. Hatta etkilenen broiler civcivlerin iskelet sistemlerinde oluşan yetmezlik ve geriliklerin, besleme döneminde çok hızlı bir gelişme ve büyüme sürecine giren hayvanların çeşitli iskelet ve kas sistemi hastalıklarına karşı daha duyarlı hale getirdiği de ileri sürülmektedir (Çelik ve ark 200b). Bu da, verimi ve kârlılığı düşürdüğünden, önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Broiler yetiştiriciliğinde, hayvanların kısa bir süre içerisinde tüketim ağırlığına ulaşması amaçlandığından hem prenetal dönemde hem de postnatal dönemde kas dokusu gelişimi oldukça önemlidir.

1.1.Aflatoksinler

Aflatoksinler (AF), esas olarak *Aspergillus* cinsi içinde yer alan ve özellikle *A. flavus* ve *A. parasiticus* cinsi mantarlar tarafından sentezlenen güçlü hepatotoksik özelliğe sahip olan metabolitlerdir. Bu mantarlardan başka bazı *Penicillium* ve *Rhisophus* türleri tarafından da sentezlenmektedir. "Aflatoksin" kelimesi, *Aspergillus flavus*'un "A-", "-fla" ve "toksin" hecelerinin birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Onsekiz ayrı aflatoksin türü bulunmasına karşın, yemlerde ve yem hammaddelerinde en sık rastlanan ve en fazla oranda bulunanlar aflatoksin B_1, B_2, G_1 ve G_2'dir (Ellis ve ark 1991, Demet ve ark 1995, Leeson ve ark 1995).

Bir aflatoksin molekülü, biri reaktif özellikteki bifuran halka sistemi ile diğeri de bir kumarin türevi olan pentanon (B serisi) veya lakton (G) serisi halkası olmak üzere iki halkadan ibarettir . Furan halkasındaki 8. ve 9. karbon atomları arasındaki çift bağ ile lakton halkası, toksik etkilerinin ortaya çıkışından sorumlu olan esas yapılardır (Hatch 1988, Leeson ve ark 1995, Oğuz 1997). Suda hiç çözünmeyen bu bileşikler kloroform, benzen ve aseton gibi organik çözücülerde kolayca çözünürler ve bu formda yapılarını uzun süre korurlar.

1.1.1.Aflatoksinlerin Sindirim Kanalından Emilimleri ve Metabolizmaları

AF yağda iyi çözünen bileşikler olduklarından, yem ve gıdalarla alındıklarında sindirim kanalından hızla emilirler ve kanda genellikle de serum albüminlerine bağlı halde taşınırlar (Schell ve ark 1993, Leeson ve ark 1995).

Doğada en bol bulunan ve en fazla kontaminasyona yol açan AF olduğundan, toksikoknetiği ve metabolizması üzerinde en yoğun biçimde çalışılmış olan AFB_1'in gastro-intestinal kanaldan emilerek, düşük moleküler ağırlıklı kan plazması proteinlerine bağlanmak suretiyle portal dolaşıma geçtiği ve bu yolla hepatositlere taşındığı ortaya konmuştur (Busbee ve ark 1990). Her ne kadar atılım hızları yüksek olan toksinler iseler de AF'in kümülatif etkileri olduğundan, az miktarlarda uzun

sürelerle alındıklarında kronik zehirlenmelere de neden olmaktadırlar. Diğer bir ifade ile AF'in kendileri değil etkileri kümülatif özelliktedir (Leeson ve ark 1995).

AFB_1'in biyotransformasyonu, Faz-I ve Faz-II reaksiyonları olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Faz-I reaksiyonları hidroksilasyon, O-demetilasyon, epoksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarını içerir. Bunlardan hidroksilasyon, O-demetilasyon ve epoksidasyondan sorumlu olan enzim, agranüler endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P-450 iken; redüksiyon olaylarından sitosolik redüktazlar sorumludurlar (Leeson ve ark 1995).

AFB_1'in metabolizma ürünlerinin çoğu safra ile atılır. Alınan AFB_1'in %85-90'ı ilk 24 saatte dışkıya geçerken, %15-20'lik kısmı idrarla atılır. Özgün bileşikler ve metabolitlerin tamamen atılabilmeleri için yaklaşık bir haftalık sürenin geçmesi gerekmektedir (Dafalla ve ark 1987, Oğuz ve ark 2000a). Ayrıca çeşitli hayvansal dokular (Stubblefield ve ark 1983) ile süt (Harvey ve ark 1991) ve yumurta (Hamilton 1982) gibi hayvansal ürünlere insan sağlığını tehdit edebilecek ve özellikle de tavukçulukta kuluçka randımanında düşüşe neden olan düzeylerde AFB_1 ve metabolitleri geçebilmektedir . Sığırlarda yem ile alınan AFB_1'in yaklaşık olarak %0,18'i, koyunlarda ise %0,1'i süte geçmektedir (Kaya 1982).

Yumurta tavuklarında yem ile alınan AFB_1 ve metabolitlerinin yumurtaya geçiş oranının belirlenmesi amacıyla oldukça fazla sayıda çalışma yapılmıştır. Aldemir (1992), günde 500 µg AFB_1 alan tavukların karaciğer ve böbrekleri ile kırmızı ve beyaz kaslarında yedirme sonrası 4. güne kadar ölçülebilir düzeyde (>0,01 ppb) AFB_1 tespit etmiştir. Jacobson ve Wiseman (1974) ise 100 ve 400 µg/kg (ppb) düzeyinde AFB_1 içeren yemle besledikleri tavukların yumurtalarında 0,2-0,3 µg/kg (ppb) düzeyinde AFB_1 tespit etmişlerdir. Söz konusu çalışmada (Jacobson ve Wiseman 1974), 100 µg/kg (ppb) AFB_1 içeren yemle beslenen tavukların yumurtalarında yedirmenin 10. gününde dahi 9 ng/yumurta düzeyinde AFB_1'e rastlanmıştır. Yumurtacı tavuklar üzerinde yapılan bir başka çalışmada (Trucksess ve ark 1983) ise, 7 gün süre ile 8000 µg/kg (ppb) düzeyinde AFB_1 içeren yemle beslenen hayvanların gerek yumurtalarında, gerekse de tüketime sunulan yenilebilir

dokularında hem AFB_1 ve hem de aflatoksikol (R_0) miktarları belirlenmiştir. Sonuçlar, en yüksek AFB_1 ve R_0 düzeylerinin karaciğer ve yumurtada bulunduğunu göstermektedir. Yumurtadaki en yüksek düzey olan 0,2 ng AFB_1/yumurta düzeyine, toksin içeren yem tüketiminin 4-5. günlerinde rastlanmıştır. Sudhakar (1992), 600 µg/kg (ppb) düzeyinde AFB_1 içeren yemle beslenen tavukların yumurtalarında 5 ng/g yumurta miktarında AFB_1 tespit ettiğini bildirirken; Oliveira ve ark (2000), 500 µg/kg (ppb) AFB_1 içeren yemle beslenen tavukların yumurtalarının 6 ng/yumurta düzeyinde AFB_1 içerdiğini ileri sürmektedirler. Qureshi ve ark (1998) ise, 14 gün boyunca 10 µg/kg (ppb) AFB_1 içeren yemle besledikleri broiler anaçların yumurtalarında 7. gün sonunda 0,15-0,48 ng/yumurta düzeyinde AFB_1, 0,22-0,51 ng/yumurta düzeyinde R_0 belirlemişlerdir. Yukarıdaki çalışma sonuçları dikkate alınarak yapılacak olan bir hesaplama, yemle alınan aflatoksin'in yumurtaya geçiş oranının 1/2000 ile 1/2500 arasında olduğunu ortaya koymaktadır (Hamilton 1982, Çelik ve ark 2000a).

Ülkemizde yumurtacı tavuklar için karma yemlerde bulunmasına izin verilen total aflatoksin düzeyinin 50 µg/kg yem (ppb) ve AFB_1 düzeyinin de 20 µg/kg yem (ppb) olduğu dikkate alınarak; bu düzeylerde AF ile kontamine olan yemden günde 130 gr tüketerek gün aşırı yumurtladığı varsayılan bir tavuğun yumurtasında, yumurtaya geçiş oranı 1/2000 olarak kabul edilmek suretiyle yapılan hesaplama sonuçları, yumurtada bulunması muhtemel olan AFB_1 düzeyinin 2,6 ng/yumurta (Hamilton 1982, Çelik ve ark 2000a), toplam AF düzeyinin de 6,5 ng/yumurta olduğunu göstermektedir. Broiler yemlerinde yapılan tarama sonuçları (Kaya ve ark 1990, Nizamlıoğlu 1996, Oğuz ve Kurtoğlu 2000), AF düzeyinin 5 ile 100 µg/kg (ppb) yem arasında değiştiğini, çoğunlukla da 50 µg/kg (ppb) yemin altında olduğunu göstermektedir.

1.1.2.Aflatoksinlerin Toksikasyon Mekanizmaları

Aflatoksinlerin tamamı, insan ve hayvan türlerinin hemen hemen tamamında önemli derecede toksik etkiye sahiptirler. En toksik olan AFB_1, karaciğerde sitokrom P-450'ye bağımlı (keçilerde P-448) karma işlevli oksidaz (mixed function

oxidase, MFO) enzim sistemiyle okside edilerek; daha güçlü sitotoksik, mutajenik ve karsinojenik etkileri olan epoksit türevlerine (AFB_1-8,9-epoksit) dönüştürülür (Kaya 1998, Leeson ve ark 1995). Bu maddelerin çok yönlü toksik etkileri, hücredeki nükleo proteinler ile nükleik asitler gibi makro moleküllerle kolayca ve hızla tepkimeye girerek protein sentezini bloke etmelerinden ve hücre bütünlüğünün bozulmasına yol açmalarından kaynaklanmaktadır (Hsieh ve ark 1977, Neldon-Ortiz ve Qureshi 1992a). Çelik ve ark (2000a), döllü tavuk yumurtalarına verdikleri AFB_1'in, embriyonik gelişimin ilk günlerinde yüksek oranda embriyonik ölümlere neden olduğunu tespit etmişlerdir. Bu dönemde, özellikle de embriyonik dönemin ilk 5 gününde karaciğer henüz fonksiyonel olmadığından, araştırıcılar (Çelik ve ark 2000a), AFB_1 molekülünün metabolize edilmeden de güçlü embriyotoksik etki gösterdiğini ileri sürmüşlerdir.

AFB_1'in sitotoksik etkisinin, yapısında bulunan bifuran halkasından ileri geldiği ve bu halkanın, DNA'nın N^7-guanin bölgesine bağlanmak suretiyle, bu molekülün normal biyokimyasal işlevlerini değiştirdiği, RNA sentezini ve sonuç olarak da protein sentezini baskıladığı bildirilmektedir (Huff ve ark 1988, Samarajeewa ve ark 1990).

1.1.3. Aflatoksinlerin Etkileri

Alınma dozlarına bağlı olarak aflatoksinlerin canlılar üzerinde ortaya çıkan etkileri 5 ana grupta toplanabilir. Bunlar;

Akut ve kronik toksik etkileri,
Teratojenik ve embriyotoksik etkileri,
Mutajenik etkileri,
Karsinojenik etkileri,
İmmunosüpresif etkileridir.

Aflatoksinlerin akut ve kronik toksik etkileri

AF, hem halk sağlığı ve hem de hayvan sağlığı açısından oldukça önemli sorunlara yol açmaktadırlar. AF'e duyarlılıkları bakımından hayvan türleri arasında

belirgin farklar vardır. Gerek insan gerek evcil hayvanlarda akut zehirlenmeler kronik olanlara oranla daha seyrektir ve genellikle sporadik olarak ortaya çıkarlar. Ancak kronik zehirlenmelerle pratikte daha çok karşılaşılmaktadır. Bu durum, kronik aflatoksikozisin hayvan yetiştiriciliği ve insan sağlığı açısından önemini daha da arttırmaktadır (Hamilton 1982). Çünkü bu tür zehirlenmeler kolayca fark edilmediğinden, ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadırlar.

Akut ve subakut aflatoksikozis olaylarında gözlenen klinik belirtiler çok spesifik olmamakla birlikte, genel olarak yem tüketiminin azalması, canlı ağırlık kaybı, halsizlik ve ishal ilk göze çarpan semptomlardır (Miller ve ark 1984, Suliman ve ark 1987, Oğuz ve Kurtoğlu 2000, Oğuz ve ark 2000b). Bununla birlikte, memelilerde kusma ve sarılık (Rao ve Gehring 1971), öksürük, burun akıntısı ve burun kanaması ile kansızlık gibi belirtiler gözlenebildiği gibi gebe hayvanlarda yavru atmalar da söz konusudur (Hatch 1988). Akut ve subakut formlarda gözlenen bu belirtilerin yanında, daha yaygın ve daha önemli sonuçlara yol açan kronik olaylarda yem tüketiminin azalması, canlı ağırlık artışında düşüş, kıllarda düzensizlik, anemi, depresyon, hafif derecede sarılık ve sürüde ölüm oranlarının artması gibi klinik belirtiler görülür (Huff ve ark 1986, Sahoo ve ark 1993, Fernandez ve ark 1994).

Kanatlılarda ise yine akut ve subakut toksikasyon formunda iştahsızlık, halsizlik, kanat ve bacaklarda felç, canlı ağırlık kazancının düşmesi, yumurta verimi ve yumurta ağırlığı ile yumurta kabuğu kalitesinde önemli düşüşler söz konusudur (Miller ve ark 1984, Huff ve ark 1986, Fernandez ve ark 1994).

Broiler yetiştiriciliğinde, hayvanların kısa bir süre içerisinde tüketim ağırlığına ulaşması amaçlandığından; besleme dönemi esnasında ortaya çıkabilecek olan her türlü olumsuz faktör, gelişmeyi engellemekte ve sonuç olarak verimi ve kârlılığı önemli oranda düşürmektedir. Broiler sektöründe besleme süresinin kısa, yem tüketimi hızının da yüksek olması nedeniyle yemde düşük düzeyde AF bulunsa bile hayvanların yüksek miktarda AF almaları sonucunu doğurmaktadır. AF, hem doğrudan toksikasyona sebep olmaları ve hem de immün sistemi baskılayarak dolaylı

yoldan sürünün hastalıklara karşı duyarlılığını arttırmaları nedeniyle de önemli sorunlara yol açmaktadırlar. Aflatoksikozisli broilerlerde dikkati çeken ilk belirtiler, yem tüketimi ile canlı ağırlık kazancının ve yemden yararlanma oranının düşmesidir (Diener ve Davis 1985, Oğuz ve Kurtoğlu 2000). Hepatoksik etkisinin bir sonucu olarak; bir yandan karaciğer yağlanması gelişirken, diğer yandan da protein sentezi önemli ölçüde aksamaktadır. Pıhtılaşma proteinleri sentezinin azalması ve kapillar damarlarda oluşan çatlamalar sonucu hayvanlarda peteşiyel kanamalar ve anemi şekillenir. Karkas kalitesi bozulur, karkasta oluşan kanamalar nedeniyle çürüme ve esmerleşme gözlenir. Bu durumun kesimden 2 hafta öncesinde AF' lı yem tüketen piliçlerde bile görülebildiği bildirilmektedir (Huff ve ark 1986, Demet ve ark 1995, Şanlı 1995). Toksinin yem içindeki dağılımı, yemdeki diğer mikotoksinler, yemin bileşimi, kümesteki sağlık problemleri, aşılamalar, stres faktörleri ve toksine maruz kalma süresi, hayvanların AF'a duyarlılığını etkilemektedir.

Aflatoksinlerin teratojenik ve embriyotoksik etkileri

Gerek memeli hayvanlar ve gerekse de kanatlılarda yapılan deneysel çalışma (Ellis ve Dipaolo 1967, Mayura ve ark 1998, Çelik ve ark 2000a, Sur ve Çelik 2003) sonuçları, AF'ın ve özellikle de AFB_1'in oldukça güçlü embriyotoksik etkilerinin olduğunu ortaya koymaktadır. Ellis ve Dipaolo (1967), hamsterlere gebeliğin 8. gününde, intraperitoneal yolla 4 mg/kg dozunda AFB_1 vererek 17. günde fetüsler üzerinde yaptıkları incelemede; fetüslerin %52,9'unun normal, %29,4'ünün yapısal kusurlu, %17,6'sının ölü veya rezorbe durumda olduğunu tespit etmişlerdir. En sık rastlanan anomalilerin; anensefali, ektopiya kordis, genel gelişme geriliği, mikrosefali ve umbilikal herni gibi malformasyonlar olduğu bildirilmiştir (Ellis ve Dipaolo 1967). Rat embriyo kültür ortamına ilave edilen AFB_1 ise, embriyonik hücrelerin protein ve DNA sentezlemelerini önemli oranda inhibe etmekte ve özellikle tubulus nöraliste önemli malformasyonlara neden olmaktadır (Geissler ve Faustman 1988).

Kanatlılarda, memelilerdeki gibi bir fötal-maternal ilişki bulunmamakla birlikte, yemler ile alınan AF'in belirli miktarları yumurtaya geçtiğinden,

yumurtadaki AF kanatlıların embriyonik gelişmelerinde ciddi problemlere yol açmaktadırlar. Yumurtaya geçen AFB_1, özellikle kuluçkanın erken dönemlerinde yüksek oranlarda embriyonik ölümlere ya da embriyonik gelişme geriliğine yol açmaktadır (Cilievici ve ark 1980, Çelik ve ark 2000a, Sur 2001). Çelik ve ark (2000a) inkübasyonun başlangıcında yumurtaya verdikleri 10 ng ve 100 ng/yumurta düzeyindeki saf AFB_1'in sırasıyla %74.5 ve %98 oranında erken embriyonik ölümlere yol açtığını bildirmişlerdir. Sur (2001) ise, yine inkübasyon başlangıcında; 5 ng, 10 ng, 20 ng ve 40 ng/yumurta düzeyinde AFB_1 enjekte ettiği döllü tavuk yumurtalarının embriyonik mortalitelerini sırasıyla % 41,66; % 43,47; % 80,43; % 91,22 olarak tespit etmiştir. Sur ve Çelik (2003), 20 ng ve 40 ng AFB_1 enjekte ettikleri gruplardaki yumurtalarda embriyonik disk sahasının *area opaca* bölgesindeki hücrelerin aşırı çoğalarak, yüzük biçiminde ve perifere doğru yayılan kalın bir hücre katmanı oluşturduğunu ve *area pellucida*'nın orta bölümünün dışa doğru fıtıklaştığını tespit etmişlerdir. Cilievici ve ark (1980), inkübasyonun 96. saatinde 0,01ve 0,002 ppm olmak üzere iki farklı düzeyde AFB_1 verdikleri yumurta gruplarının embriyonik mortalitelerini sırası ile %35 ve %26 olarak bildirmişlerdir. Jelinek ve ark (1985) ise 3-30 ng/yumurta düzeyinde aflatoksin verilen grubun embriyonik mortalitesinin %33, kalp anomalisi oranının %12 ve vücut anomalisi oranının ise % 4 olduğunu kaydetmişlerdir.

Aflatoksinlerin mutajenik etkileri

AFB_1'in mutajenik etkilerinin, bu maddenin epoksit türevlerinin hücrede yeni DNA zincirlerinin sentezi sırasında sentezlenmekte olan DNA zincirlerine bağlanmak suretiyle, DNA polimeraz enziminin aktivitesini inhibe etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Dietert ve ark 1985, Ellis ve ark 1991). DNA'nın taşıdığı şifre bozulduğundan, hem DNA ve hem de RNA'da mutasyonların şekillenebileceği ileri sürülmektedir (Haworth ve ark 1989, Iwaki ve ark 1990, Gradelet ve ark 1998).

Aflatoksinlerin karsinojenik etkileri

AF'ler özellikle karaciğer ve böbrek kanserlerine neden oldukları bilinen en güçlü doğal karsinojenlerdir. Nitekim Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) aflatoksinleri 1B grubu karsinojenler içinde değerlendirmektedir (IARC 1993).

Aflatoksinlerin primer ajan olarak insanlarda kansere yol açtıkları henüz gösterilememiştir. Bununla birlikte; epidemiyolojik çalışma sonuçları, aflatoksinle kontamine besinlerin fazla miktarda tüketildiği Afrika, Güneydoğu Asya Ülkeleri ve Hindistan'da yaşayanlarda hepatokarsinoma insidansının oldukça yüksek olduğunu göstermektedir (Hsieh ve ark 1977, Aksoy 1984).

Aflatoksinlerin immünosüpressif etkileri

Farklı mikotoksin türlerinin önemli direkt ve indirekt immünosupresif etkilerinin olduğu, çeşitli laboratuar hayvanlarının (Reddy ve ark 1987, Reddy ve Sharma 1989, Cukrova ve ark 1991) yanı sıra yumurtacı (Thaxton ve ark 1974, Giambrone ve ark 1978) ve broiler tavuklar (Campbell ve Tomenson 1983, Steward ve ark 1985), genç horozlar (Mohiuddin ve ark 1986), ördek palazları (Slowik ve ark 1985) ve hindilerde (Batra ve ark 1991) yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur.

Aflatoksinlerin direkt immünosüpressif etkilerinin, hücresel bağışıklık sistemi üzerinde daha belirgin olduğu kabul edilmektedir (Corrier 1991). Özellikle düşük dozlarda toksine uzun sürelerle maruz kalınması sonucu ortaya çıkan bu durumdan (Giambrone ve ark 1985b, 1985c, Corrier 1991) makrofajların fagositik ve mikrobisidal kapasitelereinde meydana gelen önemli düşüşler sorumlu tutulmaktadır (Neldon-Ortiz ve Qureshi 1992a, Çelik ve ark 1996, Dugyala ve Sharma 1996). Ayrıca kemik iliği (Dugyala ve ark 1994), timus (Sur 2001) ve bursa Fabricii (Campbell ve Tomenson 1983, Ram ve ark 1988, Çelik ve ark 2000b, Sur ve Çelik 2003) gibi merkezi lenfoid organlarda meydana gelen hasarlarla bu hasarların sonucu

olarak lenfosit popülasyonlarında ortaya çıkan azalma (Campbell ve Tomenson 1983, Keçeci ve ark 1995, Sur 2001) da aflatoksinlerin immünosüpressif etkilerinin ortaya çıkışında önemli rol oynamaktadır. Total lenfosit popülasyonundaki düşüşlerin özellikle T-lenfositlerin sayılarında meydana gelen düşüşlerden kaynaklanması (Mc Loughin ve ark 1984, Çelik ve ark 2000b, Oğuz ve ark 2000a, Sur 2001), aflatoksinlerin hücresel bağışıklık sistemi üzerindeki baskılayıcı etkisinin daha belirgin olduğunu destekleyen önemli bulgulardır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda (Çelik ve ark 2000a, Sur 2001) AFB_1'in, sitotoksik etkileri yanında hücre diferansiyasyonu üzerinde de zararlı etkilerinin olabileceği ileri sürülmüştür. AFB_1'in, hücre diferansiyasyonu üzerindeki zararlı etkisinin, embriyonik dönemde gelişmekte olan kas dokusu üzerindeki olumsuz etkileri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

1.2. Hücre Çekirdeğinin Yapısı

Hücre çekirdeği, hücrenin temel genetik materyali olan DNA'yı bulundurması nedeniyle hücredeki tüm yaşamsal olayları kontrol eden merkezdir. Çift birim membrandan oluşan çekirdek zarfıyla (nuclear envelope) çevrelenen hücre çekirdeği; kromatin, çekirdekçik (nükleolus) ve çekirdek sıvısından (karyolenf) oluşur (Aydın 2004).

Nükleoluslarda ribozomal alt birimlerin öncülleri sentezlenir. Ribozomal RNA (rRNA) genleri farklı türlerde farklı kromozomlarda bulunurlar. Nükleolusları oluşturan yapılar ise bu kromozomların rRNA genleri taşıyan kısımlarıdır. Bu nedenle, rRNA genlerini taşıyan ve nükleolusu oluşturan kromozom bölgeleri nükleolus organizer bölgeler (Nucleolar Organizer Regions, NOR'lar) olarak adlandırılır. Çekirdekçikler, ışık mikroskobuyla aktif protein sentezi yapan hücrelerin çekirdeklerinde iri, yuvarlak yapılar halinde görülür. İnterfazdaki hücrelerdeki nükleolus sayısı 1-4 arasında değişir. Çekirdekçikte RNA ve bununla ilişkili

proteinler bulunur. Nükleoluslar, buradaki RNA ve bazik proteinlerin miktar ve oranlarının değişmesi nedeniyle hücre siklusunun farklı evrelerinde değişen derecelerde asidofili veya bazofili gösterirler (Schwarzacher ve Wachtler 1993).

1.2.1. Nükleolusların Elektron Mikroskopik Yapısı

Protein sentezi, hücre sitoplazmasında bulunan ribozomlarda yapılır (Schwarzacher ve Wachtler 1993). Ökaryotik hücrelerde ribozomlar, 60S ve 40 S'lik iki alt birimden oluşurlar. Ribozomların yapısına giren ribozomal RNA'lar (rRNA), bu genleri taşıyan kromozomlardan (rDNA), RNA Polimeraz I (RP I) ve RNA Polimeraz III (RP III) enzimleri tarafından transkripte edilmektedir. Ribozom biyosentez hızının düşük olduğu hücrelerde nükleoluslar da küçüktür (Rose ve ark 1988, Aydın 2004).

Nükleolusların yapıları, farklı hücre tiplerinde büyük değişiklikler gösterir. Yüksek hızda ribozom üreten hücrelerde nükleoluslar iri ve kompleks yapılıyken, düşük aktiviteli hücrelerin nükleolusları genellikle küçük ve daha basit yapılıdır. Bununla birlikte, nükleoluslarda, elektron mikroskobunda daha detaylı ayırt edilebilen üç temel yapısal komponent bulunmaktadır (Jordan 1979). Bunlar; fibriler merkezler (fibrillar centers, FC), diffüz fibriler komponent (diffuse fibrillar component, DFC) ve granüler komponent (granular component, GC)'dir (Jordan 1979, Aydın 2004).

Fibriller merkezler (FC)

Elektron mikroskobunda, düşük yuğunluklu, 4-8 nm kalınlığındaki ince iplikçiklerden kurulan bir ağdan oluşurlar. Düşük aktiviteli hücrelerin nükleoluslarının merkezinde bu bölge bulunur ki, bu tip nükleoluslara "yüzük şekilli nükleolus" adı verilir. Yüksek sentez aktivitesi gösteren ve "kompakt nükleolus" olarak da isimlendirilen iri çekirdekçiklere sahip olan hücrelerde ise, büyüklükleri

farklı birkaç adet FC vardır (Knibiehler ve ark. 1982, Ploton ve ark 1986, Aydın 2004). Hızlı bölünen fibroblastlarla antijenle uyarılan lenfositlerin çekirdekçiklerinde yüzden fazla FC bulunurken; FC içermeyen çekirdekçiğe sahip olan hücreler de bulunur (Ploton ve ark 1986). FC'leri diffüz fibriler komponent çevrelerse de bu yapılar bazı bölgelerde, kromatin iplikleri ve en periferde yerleşmiş olan granüler komponentlerle (GC) de direk bağlantı halinde olabilmektedirler. FC'ler, belirli şartlar altında gümüş tuzlarıyla boyanırlar (Ellinger ve Wachtler 1980, Aydın 2004).

Diffüz fibriler komponent (diffuse fibrillar component, DFC)

DFC, elektron mikroskobunda nükleolusta koyu boyanan ve yoğun biçimde paketlenmiş olan ince (3-5 nm kalınlığında) iplik demetleri halinde gözlenir. DFC'ler genellikle, nükleolonema denilen 0,05-0,1 μm genişliğinde bir ağ oluştururlar. Yüzük şekilli çekirdekçiklerde, DFC tek olan FC'yi çevrelerken; kompakt çekirdekçiklerde her bir FC, bunlar arasında uzanan DFC ağının içersine gömülmüştür. FC'ler bazen GC veya kromatinle direk temas halinde olabildikleri gibi bazı çekirdeklerde çekirdekçiğin merkezi bölgesi tamamen DFC'lerden oluşan bir ağla doldurulmuştur. FC'ler ise ara bölgeleri doldurur. Bu tip çekirdekçikler "ağımsı (retiküler)" ya da "nükleolonemalı" çekirdekçiklerdir (Jordan 1979, Aydın 2004). DFC'ler, uygulanan boyama tekniğe bağlı olarak gümüş tuzlarıyla değişen tonlarda boyanırlar. Hem FC'ler ve hem de DFC'ler gümüşleme boyamalarından sonra iyi boyandıklarından, bu ikisini ışık mikroskobuyla birbirinden ayırmak oldukça güçtür (Jordan 1979, Aydın 2004).

Granüler komponent (GC)

GC çoğunlukla, çapları 10-15 nm arasında olan granüler yapılardan oluşursa da, zaman zaman kısa zincirler de oluştururular. GC, çekirdekçiğin periferinde lokalize olmuştur ve bu yüzden genellikle DFC'nin dışında yer alır (Aydın 2004). GC, gümüşleme metoduyla ya hiç boyanmaz ya da çok zayıf boyanır. Bununla

birlikte, pH'nın dikkatle kontrol edildiği bazik boyalarla yapılan boyamalarda kuvvetli biçimde boyandığı bildirilmiştir (Pischinger 1926).

1.2.2. Nükleolus Proteinleri

Ribozomal RNA'nın transkripsiyonu ve ribozom alt birimlerinin yapımı spesifik nükleolar proteinler tarafından gerçekleştirilir.

Gümüşle boyanan nükleolar proteinler (AgNOR proteinler)

Çekirdekçiklerin belli bölgelerinin gümüş tuzlarıyla boyandığı uzun zamandır bilinmekle birlikte, gümüşleme yöntemiyle boyanan kesitlerde çekirdekçiğin ışık mikroskobik görünümü hakkındaki detaylı tanımlar ilk defa 1889'da Ruzicka tarafından yapılmıştır (Aydın 2004). Elektron mikroskobik incelemelerde FC ve DFC'lerin, gümüşle değişik derecelerde pozitif reaksiyon verdikleri belirlenmiştir. Nükleolustaki gümüşle boyanan materyallerin, asidik proteinlerden oluştuğu gösterilmiştir. Bu proteinlere AgNOR proteinleri denir. AgNOR'larda, C23, B23, AgNOR-proteini (Hubbell ve ark 1979) ve RP I'in bulunduğu bildirilmiştir (Ochs ve ark 1983). Aktif olarak çoğalan hücrelerde NOR bölgelerindeki genlerin ekspresyonlarında önemli bir artış oluşur. Gümüş pozitif reaksiyon veren nükleolar proteinlerin büyük çoğunluğu mitoz sırasında NOR'lara yapışık olarak bulunurlar ve mitotik kromozomlardaki AgNOR'ların gümüşle boyanmasından sorumludurlar (Aydın 2004). Türler arasında kromozom sayısı bakımından farklar olduğu gibi NOR'ları taşıyan kromozom sayısı bakımından da farklar vardır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. İnsan ve bazı hayvan türlerinin kromozom ve NOR kromozomu sayılarıyla, NOR taşıyan kromozom numaraları (Aydın 2004'ten alınmıştır).

Tür	Kromozom sayısı	NOR sayısı	NOR'a sahip kromozom sayısı	NOR taşıyan kromozom numaraları
İnsan	46	10	5	13, 14, 15, 21 ve 22 numaralı kromozom çiftleri (Henderson ve ark 1973, Goodpasture ve ark 1976, Pathak 1979, Schwarzacher ve Wachtler 1993).
Koyun	54	10	5	1, 2, 3, 4, ve 25 numaralı kromozom çiftleri (Hansen, 1973, Henderson ve Bruere 1977, Henderson ve Bruere 1980).
Sığır	62	10	5	2, 3, 6, 11 ve 27 numaralı kromozom çiftleri (Di Berardino ve ark 1985) ya da 2, 3, 4, 11 ve 28 (Mayr ve ark 1987).
At	64	6	3	1, 25 ve 30 numaralı kromozom çiftleri (Kopp ve ark 1981) veya 1, 26, 30 (Kopp ve ark 1988) numaralı kromozom çiftleri.
Eşek	62	16	8	22, 23, 24, 26, 27, 28, 29 ve 30 (Kopp ve ark 1988).
Domuz	40	4	2	8 ve 10 numaralı kromozom çiftleri (Arroyo-Nombela ve ark 1990).
Tavşan	44	8	4	13, 16, 20 ve 21 numaralı kromozom çiftleri (Arruga 1989).
Fare	42	10	5	12, 15, 16, 18 ve 19 (Kurihara ve ark 1994) numaralı kromozom çiftleri.
Tavuk	9 çift makro kromozom ve 30 çift mikro kromozomdan oluşan 78 adet	2	1	16 numaralı küçük mikro kromozom numaralı kromozom çifti (Masabanda ve ark 2004).
Köpek	78 hepsi de akrosentrik			Dişide 4-7. kromozomlarda, erkekte 5-8.kromozomlarda(Howard-Peebles ve Howell 1983).

Bir bireyin farklı hücrelerinin AgNOR sayıları farklıdır. Smith ve Crocker (1988), nükleus başına düşen AgNOR sayısı, AgNOR kümesi sayısı ve her kümedeki ortalama AgNOR sayısının kesin olarak belirlenebileceğini ileri sürmüşlerse de Giri ve ark (1989), kümelerdeki AgNOR sayısının kesin olarak tespitinin zor olması nedeniyle her kümeyi tek bir AgNOR olarak kabul etmektedirler (Aydın 2004). Bu durum özellikle, aktif olarak çoğalan tümör hücreleri için geçerlidir.

rDNA transkripsiyonu ve ribozomal biyogeneziste önemli rol oynayan gümüş-pozitif proteinlerin bir hücredeki miktarı, hücredeki ribozom senteziyle ilişkili olduğundan, hücrenin protein sentez aktivitesinin iyi bir göstergesidir. Gümüşle boyanan proteinlerin FC'lerdeki ve bunlara komşu DFC'lerdeki özel lokalizasyonları, gümüşle boyanan nükleolusların lekeli görünmesini açıklayabilir. Bu yolla, lekelerin sayısının aktif rRNA sayısı ile ilişkili olabileceği veya rRNA genlerinin gruplaşmalarıyla ilişkili olabileceği sonucuna varılabilir.

AgNOR'ların hücre çekirdeğindeki lokalizasyonları

Manuelidis (1984), olgun merkezi sinir sistemi hücrelerindeki AgNOR'ların çekirdekte genellikle sabit lokalizasyon gösterdiklerini bildirmiştir. İri nöronlarda daima merkezi yerleşimli ve tek bir AgNOR varken, beyinciğin Stratum granulozum'undaki küçük nöronlarda birkaç küçük ve periferal yerleşimli AgNOR bulunmaktadır. Bu olgu, ileri derecede diferensiye durumdaki hücrelerde AgNOR'ların kesinlikle nükleolusta yerleştiklerini, çekirdek içindeki lokalizasyonlarında farklı türlerdeki NOR'ların farklı kromozomlarda lokalize olmasının önemli olmadığını göstermektedir. Tümör hücrelerinde AgNOR'ların çekirdek içindeki lokalizasyonlarının değişmesi, bu hücrelerde çekirdeğin yapısında çok köklü değişikliklerin oluştuğunu ve bunun da neoplastik transformasyonun bir parçası olduğunu ortaya koymaktadır (Aydın 2004).

AgNOR'ların sayı, büyüklük ve şekillerini etkileyen faktörler

Farklı dokuların hücrelerdeki AgNOR sayıları farklıdır. Bir nükleustaki AgNOR sayısı ve her bir AgNOR'un alanının, çekirdek alanıyla bağıntılı olduğu da saptanmıştır (Aydın 2004). Zaczek ve ark (1992), AgNOR parametrelerinin epitelin proliferasyon aktivitesiyle ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Farklı organizmaların hücrelerinin veya bir organizmanın farklı hücrelerinin genomlarında bulunan aktif

NOR'ların sayıları arasında belirgin farklılıklar bulunduğuna ve NOR sayılarının, hücrenin protein sentez ihtiyacı ve çevre şartlarına göre değişiklik gösterdiğine dair ortak bir görüş bulunmaktadır (Alberts ve ark 1989, Aydın 2004). Çoğalan hücrelerde, AgNOR'ların sayılarından ziyade büyüklüklerinin arttığı saptanmıştır (Leek ve ark 1991). Farklı sıcaklıklar nispi AgNOR alanını etkilemektedir. Hücre siklusu üzerinde etkili olan faktörlerin değerlendirilmesi ve hücredeki ribozom yapım mekanizması üzerinde çevresel etkenlerin rolünün araştırılmasında nisbî AgNOR alanının önemli bir gösterge olabileceği de ileri sürülmüştür (Canet ve ark 2001, Aydın 2004).

Bir hücredeki AgNOR sayısının, hücrenin transkripsiyonal aktivitesiyle ilişkili olduğu, bu nedenle de proliferatif aktivitesini yansıttığı (Hall ve ark 1988, Dervan ve ark 1989, Hoyo ve ark 1993) ve tümörlerin belirlenmesinde bir indikatör olabileceği ileri sürülmüştür (Kacerovska ve ark 1981, Crocker ve Nar 1987, Howat ve ark 1989). Aynı zamanda, çoğalan hücrelerde artan nükleolus dağılmasının derecesi de, sayılabilen AgNOR'ların sayılarında artışla sonuçlanabilir. Zira bu durumda, doku kesitlerindeki AgNOR'lar daha iyi görülebilir (Underwood ve Giri 1988). Nitekim, uyarılan lenfositlerde FC'lerin sayılarının arttığı ve bu bölgelerin küçüldükleri tespit edilmiştir (Raśka ve ark 1983).

1.3. İskelet Kasının Embriyonik Gelişimi

Nöroektodermden köken alan iris kasları hariç, kas sistemi mezodermden gelişmektedir. Embriyonik gelişme boyunca miyoblastlar mezodermal orjinli olan miyojenik prekürsör hücrelerden gelişmektedirler (Hassa ve Aştı 1997, Pas ve ark 2004). Gövdenin iskelet kaslarını şekillendiren miyoblastlar, somitlerin miyotom bölgelerindeki mezodermden köken almaktadır. Ventral vücut duvarı ve ekstremite kaslarını oluşturacak olan miyoblastlar, miyotom ile dermotom arasındaki geçiş bölgesinden tek tek göç etmektedirler (Brand Saberi ve ark 1996).

İskelet kaslarını meydana getirmek üzere, mezenşim hücreleri uzantılarını kaybeder ve mekik şekilli hücrelere farklılaşırlar. Bunlar miyoblast adını alırlar. Kas primordiyumunda miyoblastlar, proliferasyonu durdurarak birbirleriyle kaynaşıp uzun, çok çekirdekli ve silindirik biçimli, içerisinde miyofibrilleri bulunduran miyotüpleri (Şekil 1.1) şekillendirirler (Latshaw 1987, Schultz ve McCormick 1994, Drews 2000, Moore ve ark 2005). Bu aşamada muskarinik asetilkolin reseptörleri kaybolur ve nikotinik reseptörler yapılır. Miyogenezis boyunca kas telleri iki farklı populasyondan gelişmektedir. Miyoblast füzyonunun başlangıç aşaması boyunca şekillenen teller primer miyofibrillerdir (Rehfeldt ve ark 2000). Yeni kas tellerinin oluşması iki periotta gerçekleştiği için kas telinin şekillenmesi bifazik olarak tanımlanmaktadır. İlk göç dalgasıyla şekillenen kas telleri primer kas telleridir. Miyogenezisin erken dönemlerinde şekillenirler ve iskelet bölgesindeki kasları şekillendirmek için bu bölgelere gelirler (Wigmore ve Dunglison 1998). Primer kas telleri daha küçük sekonder kas telleri ile birlikte bir populasyon oluştururlar. Primer kas tellerinin çapları hızlı bir şekilde artmaktadır. Primer kas telleri daha sonra şekillenecek kas tellerinin oluşmasında önemli rol oynarlar (Wigmore ve Dunglison 1998).

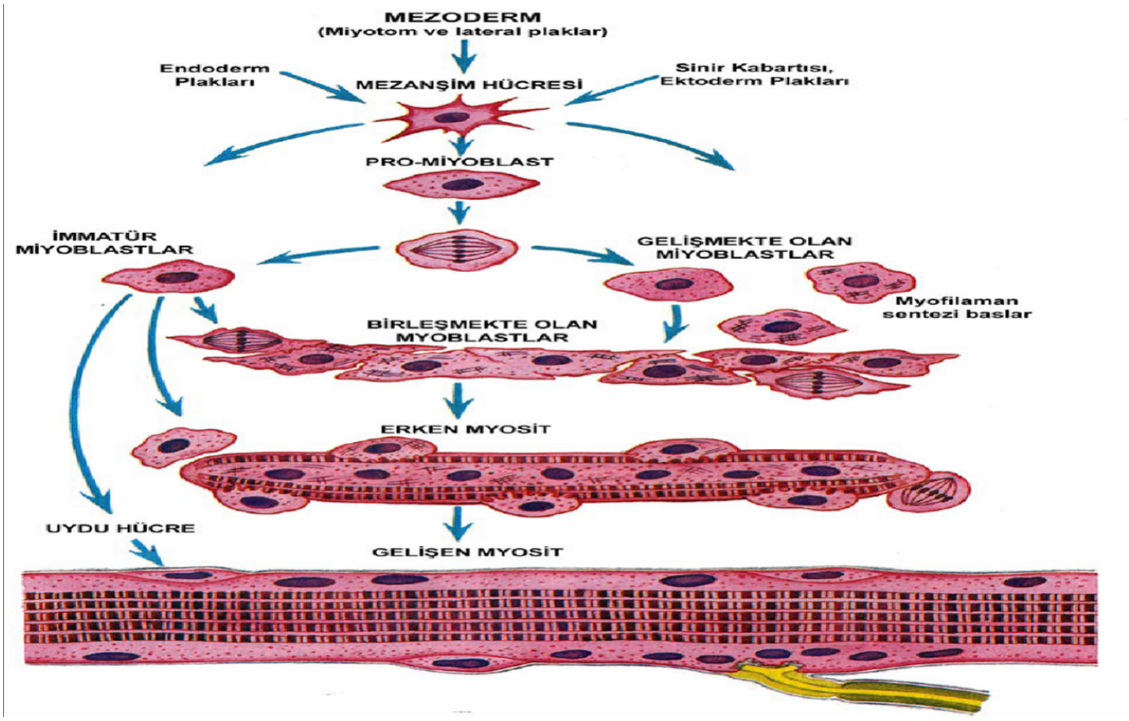
Primer kas tellerinin şekillenmesi durduktan sonra, her bir primer kas telinin yüzeyinde yeni küçük kas tellerinin oluştuğu görülmektedir. Bu kas telleri sekonder kas telleri olarak isimlendirilir. Sekonder kas telleri, yeni kas telleri için miyojenik hücrelerin füzyonu ve düzenlenmesinde bir çatı olarak primer kas tellerinin yüzeyinde kullanılırlar. Kısa bir periyod sonrasında, sekonder kas telleri primer kas tellerinin yüzeyinden ayrılırlar. Her primer kas teli çok sayıda sekonder kas telleriyle sarılır (Wigmore ve Dunglison 1998, Rehfeldt ve ark 2000) ve bunların sayısı küçük memelilerde (fare, rat) 5-9 arasında, daha büyük türlerde ise 20'nin üzerinde olmaktadır (Rehfeldt ve ark 2000).

Miyoblastların diğer populasyonu kas tellerini şekillendirmez; ancak miyofibrillere yakın kalır. Bu hücreler satellit hücreler olarak adlandırılır. Satellit hücreler miyofibril boyunca bazal laminasının hemen altında yerleşmiştir (Rehfeldt

ve ark 2000, Moore ve ark 2005). Asakura ve ark (2001), kas satellit hücrelerinin multipotansiyel mezenşimal köken hücre aktivitesi gösterdiğini belirtmişlerdir (Şekil 1.1). Bu hücreler bölünebilme yeteneğine sahiptir ve postnatal kas büyümesinde boyunca yeni miyonükleusların kaynağı olarak görev yapmaktadırlar. Ayrıca bu hücreler rejenerasyon sürecinde görev alırlar (Rehfeldt ve ark 2000). Satellit hücrelerin mitotik aktiviteleri, kas gelişiminin bir göstergesi olarak kabül edilmektedir (Moore ve ark 2005).

Miyoblastların hangi kasları oluşturacağını belirleme işlevinden düzenleyici genler sorumludur, bunlardan ilk keşfedileni Myo D genidir (Pin ve ark 1997). Myo D'nin mezenşimal hücrelerde oluşturduğu miyojenik indüksiyon, bu hücrelerin farklılaşma derecelerine bağlıdır. Düzenleyici bir gen olan Myf-5, miyotomlardaki miyoblastların özelliklerini kazanmasında, Myo-D geni ise kas tüplerinin terminal farklılaşmasında rol oynamaktadır. Myf-5, Myo-D geninin aktive olmasında etkilidir. Myo-D açıldığında Myf-5 kapanmaktadır. Miyotomda bulunan ve göç etmekte olan miyoblastlar muskarinik asetilkolin reseptörleri oluştururlar. Bu reseptörlerin uyarılması, InsP3 üzerinden, hücre içi kalsiyumun açığa çıkmasına yol açmakta ve açığa çıkan bu kalsiyum aktin-miyozin filamanlarının ameboid hareket sırasındaki kasılımını düzenlemektedir (Carlson 1981, Pin ve ark 1997).

Tavukta embriyolojik çalışmalar, Hamburger-Hamilton skalasına (1951) göre 17. safhada (HH-17) , somitik myojenik prekürsör hücrelerin arka iskelet tomurcuklarına göç ettiklerini (Hagashi ve Ozawa 1991), sonra bu hücrelerin birleştiklerini ve dorsal-ventral kas kitlelerine diferensiye olduğunu göstermektedir (Kardon 1998).



Şekil 1.1. Mezodermden Myoblast, myosit ve uydu hücre oluşumu.

1.3.1. Prenatal Kas Gelişimi ve Büyümesi

Kanatlılarda kuluçka döneminde miyofibriller şekillenmekte ve iskelet kasındaki büyüme miyofibril sayısındaki artışla değil, miyofibril hacmindeki artışla olmaktadır (Remignon ve ark 1995). Miyofibril sayısı normalde postnatal büyüme boyunca artmaz, çünkü miyonükleus bölünemez ve DNA sentezleyemez. Miyofibril çapındaki artış direkt olarak miyonükleus sayısındaki bir artışla ilişkilidir. Miyofibriller bölünebilme yeteneğine sahip olmadıkları için nükleusa dış hücre kaynağı sağlanmıştır. Yeni miyofibril DNA'sı için dış hücre kaynağı satellit hücrelerdir (Moore ve ark 2005).

Bir miyotüpün büyüyüp bir kas teline dönüşmesi iki yolla gerçekleşir: Asıl büyüme miyotüpe etraftan yeni yeni miyoblastların eklenmeleri ile olur; ancak bu sırada, miyotüpler kas proteinlerini (miyozin, aktin, tropomiyozin, troponin)

sentezlemeye başladıklarından, bu proteinlerin organizasyonu ile miyofibriller gelişmeye başlarlar ve bunlar da kas tellerinin büyümelerine neden olurlar. Bu sırada çekirdekler miyotüpün periferine itilirler (Moore ve ark 2005).

Kas teli sarkoplazmasının miyofilamanlarla dolması ve çekirdeklerinin perifere kayması, hücrenin olgulaşmasının tamamlandığını göstermez. Kas teli olgunlaşmasındaki diğer bir önemli adım, kas telinin motor sinirle bağlantı kurmasıdır ki, bunu takip eden evrede kas telinin enzimatik ve fonksiyonel farklılaşması gerçekleşir. Bu aşamada sinirin sağladığı bilgilerle mitokondriyon ve kontraktil filamanlarda meydana gelen farklılaşmalar sonucunda, fonksiyonel açıdan indifferent bir dönemden başlayarak hızlı ve yavaş kontraksiyon yapan kaslarla ara kas telleri oluşur. Bu son ve sinirlerin elektriksel uyarımı ve kimyasal uyarıcılarıyla başlatılan evre doğumdan ya da kuluçkadan çıkıştan sonra başlar ve yaşam boyu devam eder (Moore ve ark 2005).

1.3.2. Postnatal Dönemde Kas Gelişimi ve Büyümesi

Kaslar longitudinal büyüme için, kemiğin büyüme plağı gibi, özel bir bölgeye sahip değildir. Postnatal büyüme boyunca, iskelet kasının büyümesi kas tellerinin hiperplazisinden çok hipertrofisi yoluyla gerçekleşir ve bu gelişim genetik faktörler, beslenme ve fiziksel aktivite ile belirlenir. Bu süreç satellit hücrelerin proliferatif aktivitesi ile birlikte olmaktadır. Kasların postnatal büyümeleri, kas teli artışı ile değil de, mevcut kas tellerindeki miyofibrillerin enine ve boyuna büyümeleri ile gerçekleşir. Gençlerde kas tellerinde az miktarda miyofibril bulunur. Böyle kas telleri serbest ribozomlardan zengindir. Bu ribozomlar kas proteinleri sentezlerler ve bu proteinler, yeni filamanlar halinde mevcut miyofibrillere eklenirler. Fibriller belli bir kalınlığa ulaşınca boyuna yarılırlar ve böylece de kas telindeki fibril sayısı, buna bağlı olarak da kas telinin kalınlığı artar. Kas tellerinin boyuna büyümeleri ise, miyofibrillerin uç kısımlarına yeni sarkomerler eklenmesi şeklinde olur (Carlson 1981, Latshaw 1987, Rehfeldt ve ark 2000, Junqueira ve Carneiro 2006).

Doğumdan sonra total kas teli sayısının ratta (Brown 1987), farede (Nimmo ve Snow 1983), domuzda (Fiedler 1983), sığırda (Wegner ve ark 2000), tavukta (Smith 1963) ve bıldırcında (Fowler ve ark 1980) değişmeden kaldığı bildirilmektedir. Balıklarda ise kas teli sayısı yaşam boyu artmaktadır. Postnatal dönemdeki kas teli hipertrofisi, bir kas içerisindeki total kas teli sayısına bağlıdır (Rehfeldt ve ark 2000).

1.3.3. Kas Teli Sayısı ve Çapı Arasındaki İlişki

Kas telinin büyüme ve gelişmesinde, kas teli sayısının postnatal kas büyüme kapasitesini belirlediği ortaya konulmuştur. Yani, postnatal kas teli hipertrofisi temelde postnatal büyüme oranını belirlemektedir. Postnatal kas teli hipertrofisi, bir kas içinde kas tellerinin total sayısı ile ters bağıntılıdır (Rehfeldt ve ark 2000). Tek bir kas telinin postnatal büyüme oranı, içerisinde fazla sayıda kas teline sahipse düşük, az sayıda kas teline sahipse yüksektir. Sonuç olarak, kas teli sayısı kas teli kalınlığı ile ters bağıntılıdır. (Rehfeldt ve ark 2000).

1.3.4. Kas Teli Sayısı ve Çapını Etkileyen Faktörler

Aynı türün bireyleri içerisinde, bir kasın kompozisyonu; özellikle kasın tipine bulunduğu yere ve fonksiyonuna bağlıdır. Genetik ve çevresel faktörler de iskelet kaslarının yapısal özelliklerini önemli derecede etkilemektedir (Rehfeldt ve ark 2000).

Hayvanlar arasında, vücut ağırlığı ve büyüklüğü bakımından oldukça büyük farklılıklar vardır. Kaslardaki farklılık, kas teli sayısı ve kalınlığıyla ilişkilidir. Kaslardaki türe özgü faklılıklar kas tellerinin total sayısındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır (Çizelge 1.2) (Rehfeldt ve ark 2000, Delmann ve Eurell 1998).

Çizelge 1.2. Farklı türlerde longissimus kasının kas teli çapları (μm) (Pas ve ark 2004).

Tür	Kas teli çapı (μm)
Tavuk	20
Keçi	22
Kır faresi	19
Tavşan	35
Koyun	25-50
Domuz(yabani)	58-85
Domuz(evcil)	40-80
Ala geyik	19
Ren geyiği	45
Kedi	55-67
Manda	26
Hint öküzü	78
Tibet öküzü	70
Fil	51
Balina	55

Cinsiyetler arasında kas teli sayısı bakımından farklılıklar bulunmaktadır. Genellikle, erkekler dişilere göre daha fazla sayıda ve daha kalın kas teline sahiptirler. Kas teli sayısında cinsiyetle ilişkili farklılıklar farede rectus femoris (Rehfeldt ve ark 2000), ratda levator ani (Rehfeldt ve ark 2000), sığırda longissimus (Papstein ve ark 1999) ve kanatlıda extensor hallucis longus (Henry ve Burke 1998) kaslarında yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Kas teli sayısı ve çapında cinsiyetler arasındaki farklılık testesteron hormonundan kaynaklanmaktadır. Postnatal dönemde testesteron uygulaması, satellit hücrelerin proliferasyonunu ve kas proteini sentezini uyararak kas teli hipertrofisini stimüle etmektedir (Rehfeldt ve ark 2000).

Kas tellerinin çapı yaşla beraber değişmektedir. Genellikle, kas teli çapı doğumdan sonra artarak erişkin dönemde zirveye ulaşmaktadır (Rehfeldt ve ark 2000, Karahan ve Erol 2004).

Çiftlik hayvanlarında hayvanın performansını artırmak için yapılan seleksiyon ve yetiştirme şekli kas teli sayısı ve çapını etkileyen önemli faktörlerdendir. Genetik çeşitlilik ve kalıtsal faktörler de iskelet kaslarının yapısal özelliklerini önemli derecede etkilemektedir (Rehfeldt ve ark 2000).

Hayvanlarda canlı ağırlık artışı veya büyüme hızını artırmak için uygulanan yemleme programları kas teli sayısı ve çapını etkilemektedir (Yenice 2004, Rehfeldt ve ark 2000). Fiziksel aktivitenin kas tellerinin çapındaki artışla kas yapısını geliştirdiği görülmektedir (Paker 1990, Rehfeldt ve ark 2000, Karahan ve Erol 2004).

Ergin kanatlı iskelet kası tellerinin çekirdekleri uzun-oval yuvarlak şekillidirler. Çoğunlukla sarkolemin hemen altındaki subsarkolemma denilen dar sitoplazmik alanda lokalize olurlarsa da, kas telinin derinliklerinde yerleşmiş durumdaki az sayıda çekirdeğe de rastlanmaktadır.

1.4. İskelet Kası Histolojisi

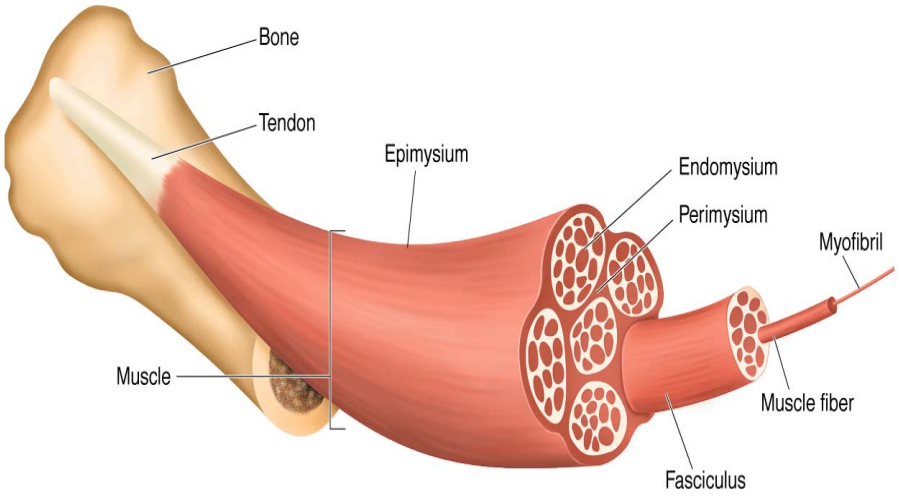
İskelet kaslarını oluşturan kas telleri enine çizgilenme gösterdiklerinden çizgili kas telleri diye de isimlendirilirler. Şekillerinden ötürü de bu hücrelere, kas hücresi (myocyte) yerine, daha çok kas teli (fibra muskularis) adı verilir. Bunun gibi, kas tellerinin sitoplazmaları sarkoplazma, plazma membranları da sarkolemma diye isimlendirilir (Sağlam ve ark 1997, Delmann ve Eurell 1998, Gartner ve Hiatt 2001).

İskelet kası tellerinin uzunluk ve kalınlıkları, canlı türlerine ve kasların organizmadaki yerlerine göre büyük farklar gösterir. Uzunluk genelde 1-5 cm arasında değişir. Fakat özellikle hayvanlarda 12-15 cm kadar uzun olanları da az değildir. Kalınlıkları memelilerde 10-150 mikrometre (insanda 10-100 μm) arasındadır. Sürüngen ve balıkların kas telleri memelilerinkinden daha kalın, kuşlarınki ise daha incedir. İskelet kası telleri silindir biçimlidirler; sıkı bir şekilde paketlenmişlerse köşeli olabilirler. Bu tür kas telleri çok çekirdekli olan hücrelerdir.

Uzun-oval şekilli olan çekirdekler sarkoplazmanın periferinde, sarkolemin hemen altında yerleşirler. İnsektlerde çekirdekler orta kısımda yerleşip bir sütun oluştururlar. Kuşlarda da bazen ortada yerleşmiş çekirdek bulunabilir (Sağlam ve ark 1997, Delmann ve Eurell 1998).

1.4.1. İskelet Kasının Düzenlenişi

Değişik tiplerdeki kasları oluşturan kas teli kütleleri gelişigüzel değil, düzenli demetler halinde dizilirler ve epimisyum (Yun. epi, üst + mys, kas) adı verilen bağ dokusu bir kılıf ile dıştan tümüyle sarılırlar. Epimisyumdan içeriye doğru ince bağ dokusu bölmeleri uzanarak bir kasın içindeki kas teli demetlerini sarar. Kas tellerinden oluşan her bir demetin etrafındaki bağ dokusuna perimisyum (Yun. peri, çevre + mys, kas) denir. Her kas teli ise bazal lamina ve retiküler ipliklerden oluşmuş ince bir bağ dokusu tabakası olan endomizyum (Yun.endon içinde, + mys) ile sarılıdır (Şekil 1.2) (Junqueira ve Carneiro 2006).



Şekil 1.2. İskelet kasının enine kesitinde epimizyum, perimizyum ve endomisyum (Gartner ve Hiatt 2001).

Bağ dokusunun en önemli görevlerinden biri, kasılan kas hücrelerinin oluşturduğu güçleri mekanik olarak iletmektir. Çünkü çoğu kez kas hücreleri tek başına kasın bir ucundan diğer ucuna uzanmaz. Kan damarları kasa bağ dokusunun oluşturduğu bölmeler içinde girer ve kas telleri arasında zengin bir kılcal damar ağı oluşturur. Kılcal damarların endoteli kesintisiz tiptedir ve bağ dokusunda lenfatikler de bulunur (Sağlam ve ark 1997).

1.4.2.İskelet Kası Tellerinin Düzenlenişi

İskelet kası tellerinin enine çizgili görünmelerine yol açan unsurlar, miyofibrillerdir. Kas tellerinde boydan boya uzanan ve genellikle 1-3 µm kalınlıkta olan miyofibriller, birbirini izleyen açık ve koyu görünen bölgelerden oluşmuşlardır. Bir kas telinde bulunan bütün miyofibrillerde aynı tonda olan bölgeler aynı hizada bulunurlar. Işık mikroskobuyla fazla ayrıntı görülemediğinden, kas telinin kendisi karşıdan karşıya enine çizgili olarak görünür (Sağlam ve ark 1997, Dellmann ve Eurell 1998, Gartner ve Hiatt 2001).

Miyofibriller üzerinde açıklı koyulu görülen bölgeler "band" olarak isimlendirilirler. Bunlardan ışık mikroskoplarında açık renkte görünenlere "izotrop" bandlar, koyu görünenlere ise "anizotrop" bandlar denir. Birinciler kısaca I bandları, ikinciler de A bandları diye isimlendirilirler. İstirahat halinde iken her iki bandın kalınlığı birbirine yakındır; kasılma sırasında ise, A bandlarının kalınlığı değişmezken, I bandlarının kalınlığı, kasılma ilerledikçe azalır; tam kontraksiyon halinde ise I bandları ortadan kalkarlar. Bu durumda komşu A bandları birbirlerine değerler. Kas gevşemeye başlayınca, I bandları tekrar belirmeye başlarlar. Söz konusu bandlar miyofibrillerin ana bandlarıdır; bunların içinde ayrıca ikinci derecede bandlar da vardır. Işık mikroskobuyla bakıldığında I bandlarının tam ortalarında enine seyreden ince fakat koyu görünen birer çizgi ile karşılaşılır ki, bu çizgiler Z bandları ya da membranları diye isimlendirilirler. A bandlarının ortalarında da, açık renkli bir band görülür. Z bandından daha geniş olan bu banda da H bandı denir. Elektron mikroskopunda, H bandının tam ortasında ince ve orta koyulukta bir band daha bulunduğu fark edilir ki, bu da M bandı adını alır. Miyofibrillerde iki Z bandı arasındaki kısım bir kontraksiyon ünitesi oluşturur ki, buna sarkomer denir (Cireli 1997, Sağlam ve ark. 1997, Dellmann ve Eurell 1998, Gartner ve Hiatt 2001).

Miyofibriller, kendilerinden çok daha ince olan iplikçiklerden oluşurlar. Bu iplikçiklere miyofilaman adı verilir. İskelet kası tellerinde iki türlü miyofilaman vardır. Bunlardan 5-7 nm kalınlıkta ve 1 μm uzunlukta olanlara aktin filamanları, 16 nm kalınlıkta ve 1,5 mikron uzunlukta olanlara da miyozin filamanları denir (Paker 1990, Sağlam ve ark 1997). Miyofibriller kas teli içinde bir uçtan öteki uca kadar uzarlar. Buna karşılık miyofilamanlar kısa boyludurlar. Bunlardan miyozin filamanları sadece A bandlarında bulunurlar; komşu I bandlarına taşmazlar. Aktin filamanları ise Z bandından başlayıp A bandlarına doğru uzarlar ve A bandlarında bir süre devam ederler. Böylece A bandlarının uç kısımları hem miyozin hem de aktin filamanları içerirler; orta kısımları ise sadece miyozin filamanlarından yapılmıştır ve H bandı olarak isimlendirilir. Bu bandın tam orta yerinde, 4 nm'lik ve kontraktil olmayan filamanlar (miyomezin filamanları) miyozin filamanlarını sıkı bir biçimde bağlayarak bunların düzenli bir birlik oluşturmalarını sağlarlar. Bu bağlanma yerleri, koyu tonda ve ince bir band halinde görünür ki, bu

M bandıdır. M bandından daha koyu görünen Z membranları, I bandlarının tam ortalarından geçerler. Z bandları, iki taraftan gelen aktin filamanlarının, bu bölgede dallanarak α-aktinin denen ince ipliksel protein molekülleri aracılığı ile birbirlerine bağlanmaları sonucu meydana gelen, ağ manzarasında oluşumlardır. Bu bandda bulunan α-aktinin, ayrıca aktin filamanlarının birbirlerine paralel durmalarını da sağlar (Dellmann ve Eurell 1998, Gartner ve Hiatt 2001).

Bir kas telindeki tüm miyofibrillerde aynı türdeki bandların aynı hizada kalabilmeleri için, bu miyofibrillerin birbirlerine bağlanıp sıkı bir birlik oluşturmaları gerekmektedir. Bu görevi dezmin filamanları üstlenmektedir. Aktin ve miyozin filamanlarının tersine, kontraktil olmayan bu intermedyer filamanlar, komşu miyofibrilleri Z membranları hizalarında birbirlerine bağlarlar (Junqueira ve Carneiro 2006).

Kas tellerinin kontraksiyonu, miyozin filamanlarının aktin filamanlarını kendi aralarına doğru çekip kaydırmaları sonucu gerçekleşir. Bunun sonucunda kas tellerinin boyu kısalır (Sağlam ve ark 1997, Junqueira ve Carneiro 2006).

Çizgili kas filamanları birkaç protein içerir; başlıca 4 protein aktin, tropomiyozin, troponin ve miyozindir. İlk üçü ince filamanları oluştururken, miyozin kalın flamanı yapar. Aktin ve miyozin çizgili kasın toplam proteininin %55'ini oluşturur (Paker 1990, Junqueira ve Carneiro 2006).

Aktin, çift sarmal şekilde birbiri etrafına dolanmış 5-6 nm çapında 2 sıra globüler monomerden (G aktin) oluşan uzun filaman oluşturan polimerlerden (F aktin) ibarettir. G-aktin moleküllerinin önemli bir özelliği de yapısal asimetri göstermesidir. G-aktin molekülleri F-aktini oluşturmak üzere polimerize olduğunda, belirgin kutupsallık gösteren filamanlar oluşturarak arkadan öne bükülürler . Her bir G-aktin monomeri miyozin için bağlanma bölgesi içerir. Z çizgisi üzerinde dik açıyla

tutunan aktin filamanları çizginin her iki tarafında karşıt kutupsallık gösterir. Z çizgisinin ana bileşeni olan a-aktinin proteininin, aktin filamanlarına bu bölgede tutunduğu düşünülmektedir (Gartner ve Hiatt 2001).

Tropomiyozin 2 polipeptid zincir içeren 40 nm uzunluğunda ince uzun bir moleküldür. Bu moleküller birbirine dolanmış iki aktin uzantısı arasındaki oluğun dış kenarları boyunca aktinin alt birimleri üzerinde filamanlar oluşturarak baştan sona kadar uzanan moleküllerdir (Sağlam ve ark 1997).

Troponin, tropomiyozine güçlü bir şekilde tutunan TnT, kalsiyum iyonlarını bağlayan TnC ve aktin-miyozin ilişkisini bozan Tnl olmak üzere 3 alt birimden oluşan bir komplekstir. Bir troponin kompleksi her tropomyozin molekülü üzerinde belirli bir noktaya tutunur (Sağlam ve ark 1997).

Miyozin çok daha büyük bir komplekstir. (MA-500.000). Miyozin, birbirine eş iki ağır zincir ve iki çift hafif zincire ayıştırılabilir. Miyozinin ağır zincirleri birbirine sarmalanmış iki ağır zincirden meydana gelen ince, çubuğa benzer moleküllerdir. Her ağır zincirin bir ucundaki küçük globüler uzantılar, ATP bağlamanın yanı sıra ATP'yi hidrolize edecek enzimatik kapasiteye sahip başları oluşturur ve aktin bağlama özelliği sergiler. Bu 4 hafif zincir baş ile ilişkilidir. Her bir kalın filamandaki yüzlerce miyozin molekülü çomağa benzer kısımları üst üste gelecek ve globüler başları bir diğerinin ucuna yönelecek şekilde düzenleniş gösterir (Sağlam ve ark 1997, Gartner ve Hiatt 2001, Junqueira ve Carneiro 2006).

Bu çalışmada broier civcivlerde iskelet kasının embriyonik gelişimi ve aflatoksin B_1 etkisinin histolojik metotlarla incelenmesi amaçlanmıştır. Hayvansal üretim içinde hızlı bir gelişme gösteren broiler yetiştiriciliği, çok kısa bir zamanda bol miktarda üretim yapılması, broilerin yemi ete dönüştürme yeteneğinin diğer büyük ve küçükbaş hayvanlara göre fazla olmasından dolayı oldukça önemli yer

tutmaktadır. Broiler yetiştiriciliği ülkemizin kanatlı sektöründe de önemli bir yere sahiptir. Kanatlı endüstrisinin temel amaçlarından biri et kalitesini koruyarak artan büyüme hızı ve artan kas kütlesi için hayvan yetiştirmek olduğundan dolayı kasın embriyonik ve kuluçka sonrası gelişimi oldukça önem kazanmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Yumurta Materyali:

Bu amaçla, yemlerinde düzenli olarak aflatoksin kontrolleri yapılan ve ölçülebilir düzeyde (<1 ppb) aflatoksin içermeyen yemle beslenen *Ross* ırkı broiler damızlıklara ait toplam 420 adet kuluçkalık yumurta kullanıldı.

2.2. Metotlar

2.2.1. Aflatoksin B_1 Solüsyonlarının Hazırlanması

Kristalize haldeki saf aflatoksin B_1 (AFB_1) standardı (Makor Chemical Co., Israel), benzen içinde çözdürülmek suretiyle 20 µg/ml konsantrasyonunda AFB_1 içeren stok solüsyon hazırlandı. Bu solüsyondan çalışmada kullanılacak olan her bir konsantrasyon grubu için gerekli olan AFB_1'i içeren miktarlarda farklı tüplere aktarılarak; karanlıkta bekletildi ve benzenin tamamen uçması sağlandı. AFB_1 içeren tüplere önceden belirlenen miktarlarda %99.9'luk etil alkol ilave edilerek AFB_1'in tamamen çözünmesi sağlandı. Takiben etil alkol (ETOH) konsantrasyonunu %30'a düşürmek amacıyla, solüsyonlara steril bidistile su ilavesi yapılarak; enjekte edilen 20 µl hacmindeki çözeltide istenilen konsantrasyonlarda AFB_1 içeren çalışma solüsyonları hazırlandı. Bu solüsyonların, istenilen konsantrasyonlarda AFB_1 içerip içermedikleri, standart aluminyum plakalar (Merck) kullanılmak suretiyle İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Chromotography, TLC) ve Floresans Spektrofotometre (Camag II. Basel, Switzerland; emisyon dalga boyu 425 nm, eksitasyon dalga boyu 365 nm) ile kontrol edildi ve istenilen konsantrasyonlarda

oldukları doğrulandı. Çalışma solüsyonları bulunan tüpler alüminyum folyo ile sarılarak, kullanılıncaya kadar buzdolabında +4 ºC'de muhafaza edildi.

2.2.2. Enjeksiyonlar ve Kuluçka İşlemleri

Enjeksiyonlar Prelusky ve ark (1987) ile Çelik ve ark (2000a)'nın bildirdikleri yöntemle hava kamarası yoluyla yapıldı. Bu amaçla steril uçlu özel mikropipet (Sealpette, Jencons) kullanıldı. Yumurtanın küt ucunun dezenfeksiyonunu takiben özel yumurta delicisi ile açılan delikten girilerek 20 µl'lik test solüsyonu hava kamarasına enjekte edildi ve delik derhal sıvı parafinle kapatıldı. Bu işlemlerden sonra yumurtalar Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalındaki kuluçka makinesinde (VGS, 108 Kap) optimal koşullarda kuluçka işlemine tabi tutuldu.

2.2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve AFB_1 Solüsyonlarının Yumurtalara Verilmesi

I. Grup: Bu gruptaki (kontrol grubu) yumurtalara hiçbir işlem uygulanmadı,
II. Grup**:** Bu gruptaki yumurtalara 20 µl hacminde %30 ETOH içinde çözünmüş 5 ng aflatoksin B1(AFB_1) hava kamarası yoluyla verildi.
III. Grup: Bu gruptaki yumurtalara 20 µl hacminde %30 ETOH içinde çözünmüş 15 ng AFB_1, hava kamarası yoluyla verildi.
IV. Grup: Bu gruptaki yumurtalara 20 µl hacminde %30 ETOH içinde çözünmüş 40 ng AFB_1, hava kamarası yoluyla verildi.
Yumurtaya verilecek olan toksin dozlarının belirlenmesinde daha önce yapılan çalışma bulguları, yemden yumurtaya geçiş oranı dikkate alındı (Hamilton 1982, Prelusky ve ark. 1987, Çelik ve ark 2000a).

2.2.4. Yumurtaların Açılması ve Doku Örneklerinin Alınması:

Bu amaçla kuluçkanın 11, 13, 17 ve 21. günlerinde, her gruptan rasgele seçilen 5'er yumurta açılarak, embriyoların Hamburger-Hamilton Skalası'na (Hamburger ve Hamilton 1951) göre gelişim evreleri belirlendi ve takiben hassas teraziyle tartıldı. Yumurta ağırlıkları, embriyo ağırlıkları ve göğüskası ile bacak kası ağırlıkları verilerinden yararlanılarak her dönem için nispi embriyo ağırlığı[(embriyo ağırlığı/yumurta ağırlığı)x100] ile nispi göğüs kası ve bacak kası ağırlığı [(kas ağılığı/embriyo ağırlığı)x100] hesaplandı.

Embriyolardan bacak kası (muskulus fibularis longus) ve göğüs kasıından (muskulus sternocoracoideus pectoralis) doku örnekleri alındı. Alınan doku örnekleri, % 10'luk tamponlu (0,1 M, pH: 7,4) formal salin solüsyonunda tespit edildi ve doku örnekleri bilinen histolojik yöntemlerle, yıkama, dehidrasyon ve parlatma işlemlerini takiben parafinde bloklandı. Bloklardan alınan 5 μm kalınlığındaki kesitler; normal histolojik yapının belirlenmesi amacıyla Crossman'nın üçlü boyama yöntemi (Culling ve ark 1985) ve AgNOR'ların belirlenmesi amacıyla da gümüşleme boyama yöntemi ile boyandı (Aydın 2004).

2.2.5. AgNOR Boyaması ve AgNOR Parametrelerinin Belirlenmesi

AgNOR boyama solüsyonu hazırlanırken önce Jelatin-formik asit solüsyonu, 2 gr jelatin (Merck), 100 ml %1'lik formik asit (Merck) içinde çözdürelerek hazırlandı. Bu işlem; jelatinin formik asitte tamamen çözünmesini sağlamak amacıyla, çözeltinin bir etüvde 58-60ºC'de ısıtılmasıyla gerçekleştirildi. Solüsyon oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Gümüş nitrat çözeltisi ise, 50 g kristal gümüş nitrat (Botafarma Laboratuarı, Ankara, Türkiye) 100 ml distile suda çözdürülerek hazırlandı. Boyama solüsyonu, taze hazırlanan jelatin-formik asit solüsyonu ile gümüş nitrat çözeltisinin kullanımdan hemen önce karıştırılmasıyla hazırlandı. Bu amaçla, 1 hacim jelatin-formik asit solüsyonuyla 2 hacim %50'lik gümüş nitrat solusyonu karıştırıldı. Deparafinize edilen kesitler taze hazırlanan boyama solusyonunda, etüvde (37 ºC) ve karanlıkta 30 dakika bekletildi (Aydın 2004). Süre

sonunda kesitler distile suda yıkandıktan sonra dehidre edilerek sentetik resinle (Entelın, Merck) kapatıldı.

Hücre çekirdeğindeki farklı şekilli ve kahverengi siyah lekeler halinde boyanan yapılar AgNOR'lar olarak kabul edildi. Her örnekte 10 adet hücre incelenerek her hücrenin çekirdek alanı, çekirdekteki AgNOR sayısı ve AgNOR alanı belirlendi. Elde edilen verilerden, bir çekirdekteki AgNOR alanının çekirdek alanı içindeki yüzdesi (nisbi AgNOR alanı) hesaplandı.

2.2.6. Preparatların İncelenmesi ve Dijital Görüntülerin Analizi

Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu (Nikon Eclipse, E-400) ile incelenerek, gerekli görülen bölgelerin dijital görüntüleri aynı mikroskoba takılı dijital fotoğraf makinesi (Nikon DS Camera Control Unit DS-L1 with DS Camera Head DS-5M) ile kaydedildi. Elde edilen görüntülerin analizi, bir görüntü analiz programı (BS200 PRO) kullanılarak gerçekleştirildi.

2.2.7. İstatistiksel Analizler

Elde edilen veriler her grup için grup ortalaması ± standart sapma (±SD) olarak ifade edildi. Veriler, SPSS 10.0 istatistik programı yardımıyla One-Way AOVA testi ve ardından çoklu karşılaştırma testlerinden Duncan testiyle analiz edilerek grupların ortalama değerleri arasındaki farkların önem dereceleri beirlendi. $P<0,05$ değeri önemli kabul edildi.

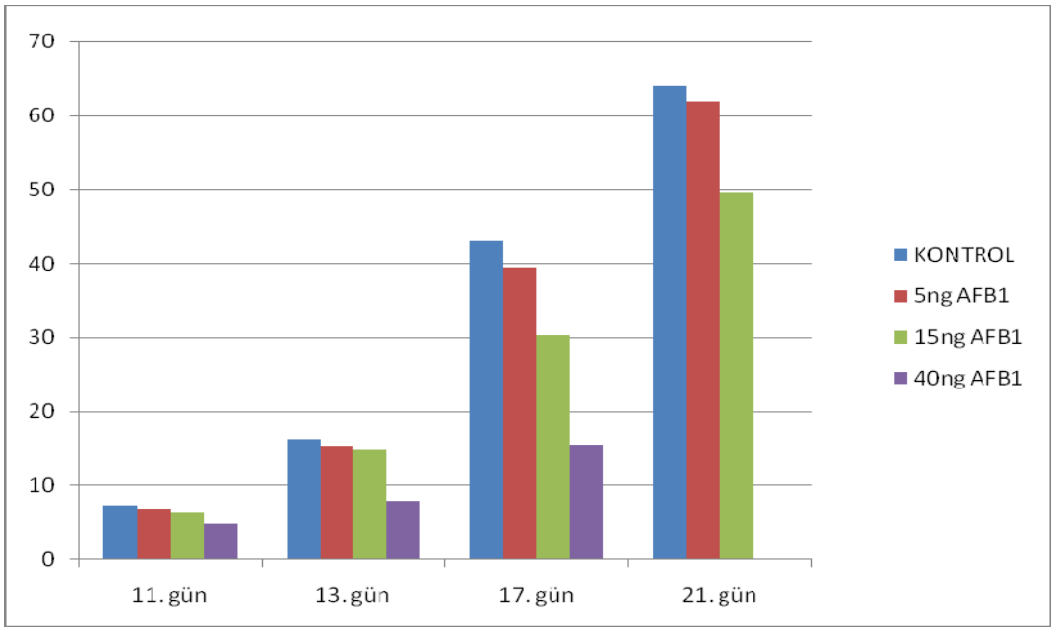
3. BULGULAR

3.1. Rölatif Embriyo, Göğüs ve Bacak Kası Ağırlıkları

Çalışmada, kontrol grubunda embriyonik gelişim Hamburger-Hamilton (1951) (H-H) skalasına uygun bir seyir izlediği halde; AFB_1 gruplarında, doza bağlı olarak artan oranlarda embriyonik gelişme geriliği olduğu dikkati çekti.

Kontrol ve deney gruplarındaki embriyoların ortalama rölatif canlı ağırlıklarının kuluçka günlerine göre dağılımları grafik 3.1.'de verilmiştir. AFB_1 gruplarındaki embriyonik gelişimin oldukça baskılanmış olduğu (Şekil 3.1 ve 3.2) ve bu grupların rölatif ağırlıklarının, verilen AFB_1'in dozuna bağlı olarak belirgin bir şekilde düştüğü tespit edildi (Çizelge 3.1, Grafik 3.1). Rölatif ağırlıklara paralel olarak göğüs kası ve bacak kası gelişiminde de AFB_1 gruplarında belirgin bir gerileme olduğu dikkati çekti (Şekil 3.3 ve 3.4). Kuluçkanın 11, 13, 17 ve 21. günlerinde, AFB_1 gruplarının göğüs kası ve bacak kası ağırlığı kontrol grubundan önemli derecede ($P<0.05$) daha düşük bulundu (Çizelge 3.1). Kuluçkanın 21. günü 40 ng AFB_1 grubunda canlı civciv çıkışı olmadı (Çizelge 3.1).

Grafik 3.1. Kontrol ve deney gruplarında günlere göre ortalama rölatif embriyo ve civciv ağırlığı.



Çizelge 3. 1. Kuluçkanın farklı dönemlerinde tespit edilen ortalama rölatif embriyo ağırlıkları (%) ve çıkış günü civciv ağırlığı (%) ile rölatif göğüs kası (%) ve bacak kası ağırlıkları (%) (g).

Gruplar	11.gün (x±Sd)			13 .gün (x±Sd)			17.gün (x±Sd)			21.gün (x±Sd)		
n=5	RGK	RBK	REA	RGK	RBK	REA	RGK	RBK	REA	RGK	RBK	CA
Kontrol	5,22±0,62[a]	7,04±0,46[a]	7,36±0,94[a]	5,72±0,32[a]	7,29±0,50[a]	16,12±0,90[a]	4,67±0,36[a]	7,45±1,08[a]	43,01±2,35[a]	3,08±0,52[a]	6,90±0,25[a]	37,10±1,47[a]
5ng AFB_1	4,35±0,24[b]	5,95±0,75[b]	6,78±0,36[ab]	5,18±0,53[ab]	6,72±0,21[ab]	15,25±0,92[ab]	3,98±0,37[b]	6,64±1,0[ab]	39,47±3,51[a]	2,81±0,33[ab]	6,14±0,39[b]	31,9±3,26[b]
15ng AFB_1	3,12±0,54[c]	5,66±0,24[bc]	6,25±0,81[b]	4,71±0,37[b]	6,15±0,50[b]	14,85±0,95[b]	3,55±0,62[b]	5,84±1,49[b]	30,35±8,04[b]	2,38±0,25[b]	4,51±0,60[c]	30,34±4,53[b]
40ng AFB_1	2,80±0,38[c]	4,92±0,63[c]	4,72±0,85[c]	3,17±0,63[c]	4,98±0,45[c]	7,96±1,39[c]	2,64±0,51[c]	3,64±0,63[c]	15,36±2,24[c]	Civiciv çıkışı olmadı	Civiciv çıkışı olmadı	Civiciv çıkışı olmadı
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

[a-c] Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar istatistiki öneme sahiptir (P<0,05).
RGK: Rölatif göğüs kası ağırlığı, RBK: Rölatif bacak kası ağırlığı, REA:Rölatif embriyo ağırlığı, CA: Civciv ağırlığı.



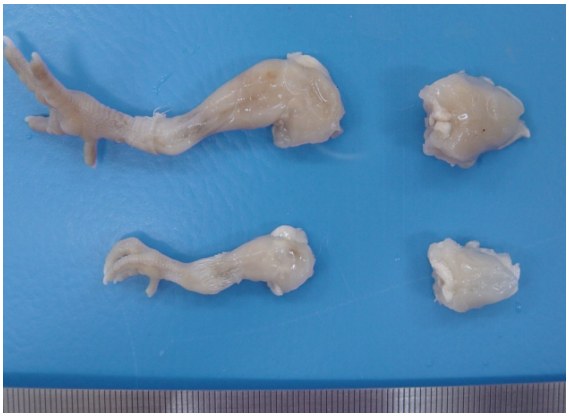
Şekil 3.1. Kuluçkanın 11. gününde kontrol ve 40 ng AFB_1 grubuna ait embriyolar görülmektedir. AFB_1 verilen embriyodaki gelişme geriliği oldukça belirgindir.



Şekil 3.2. Kuluçkanın 17. gününde, 15 ng, 40 ng AFB_1 ve kontrol grubuna ait embriyolar görülmektedir. AFB_1 verilen embriyolardaki gelişme geriliği oldukça belirgindir.



Şekil 3.3. Kuluçkanın 13. gününde kontrol ve 40 ng AFB_1 grubuna ait embriyoların göğüs ve bacak kasları görülmektedir. AFB_1 grubuna ait göğüs ve bacak kasının daha küçük olduğu dikkati çekmektedir.



Şekil 3.4. Kuluçkanın 17. gününde kontrol ve 40 ng AFB_1 grubuna ait embriyoların göğüs ve bacak kasları görülmektedir. AFB_1 grubuna ait göğüs ve bacak kasının daha küçük olduğu dikkati çekmektedir.

3.2. AgNOR Bulguları

Çekirdekteki AgNOR'lar göğüs kası ve bacak kası hücrelerinde genellikle eksantrik ve en az biri nükleer zarfa komşu durumda lokalize olan koyu, oval-yuvarlak şekilli, kahverengi-siyah yapılar halinde görüldü (Şekil 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19 ve 3.20). AgNOR'ların şekil ve lokalizasyonlarında dönemler arasında belirgin farklar gözlenmedi.

Kuluçkanın 11. gününde bacak kasınının boyuna ve enine kesitlerinde çekirdek alanı ve NOR alanı değerlerinin kontrol grubuna göre AFB_1 gruplarında düştüğü ($P<0,05$) tespit edildi. NOR sayısı ve nispi AgNOR alanı (NOR alanının çekirdek alanına oranı) oranında gruplar arasında istatistiki açıdan bir farklılık bulunmadı ($P>0,05$) (Çizelge 3.2).

Göğüs kasının boyuna kesitinde ise çekirdek alanı kontrol grubunda AFB_1 gruplarına oranla daha yüksek iken ($P<0,05$), NOR alanı arasındaki fark istatistiki açıdan önemli değildi ($P>0,05$). Göğüs kasının enine kesitlerinde çekirdek alanı ve NOR alanı değerlerinin kontrol grubuna göre AFB_1 gruplarında düştüğü ($P<0,05$) tespit edildi. Hem enine ve hem de boyuna kesitlerde, grupların NOR sayısı arasındaki fark istatistiki açıdan önemli değildi ($P>0,05$) (Çizelge 3.3).

Kuluçkanın 13. gününde bacak kası boyuna kesitinde ise çekirdek alanı kontrol grubunda deney gruplarına oranla daha yüksek bulunurken ($P<0,05$), enine kesitlerde önemli bir fark yoktu ($P>0,05$). NOR alanı, NOR sayısı ve nispi AgNOR alanı oranında gruplar arasında istatistiki açıdan önemli fark tespit edilmedi ($P>0,05$) (Çizelge 3.4). Göğüs kasının boyuna ve enine kesitlerinde hem çekirdek alanı hem de NOR alanlarının, deney gruplarında kontrol grubuna göre önemli ölçüde düştüğü ($P<0,05$), NOR sayısı ve nispi AgNOR oranının önemsiz olduğu dikkati çekti($P>0,05$) (Çizelge 3.5).

Kuluçkanın 17. gününde bacak kası boyuna kesitinde çekirdek alanı ve NOR alanı kontrol grubunda deney gruplarına oranla daha yüksek iken ($P<0,05$), enine

kesitlerde ise belirgin düşüşe rağmen istatistiki açıdan fark tespit edilmedi (P>0,05). Enine ve boyuna kesitlerde NOR sayısı ve NOR alanının çekirdek alanına oranının istatistiki açıdan önemsiz olduğu dikkati çekti (P>0,05) (Çizelge 3.6). Göğüs kasının boyuna kesitinde çekirdek alanı kontrol grubunda AFB_1 gruplarına oranla daha yüksek olduğu belirlendi (P<0,05). NOR alanı arasındaki farkın ise istatistiki açıdan önemli olmadığı tespit edildi (P>0,05). Enine kesitlerde ise çekirdek alanı ve NOR alanında belirgin düşüşe rağmen istatistiki açıdan önemli fark tespit edilmedi (P>0,05) (Çizelge 3.7).

Kuluçkanın 21. gününde bacak kasının boyuna ve enine kesitlerinde çekirdek alanı ve NOR alanı kontrol grubunda deney gruplarına oranla önemli derecede (P<0,05) daha yüksek iken, NOR sayısı ve nispi AgNOR oranı arasındaki farkın istatistiki açıdan önemsiz olduğu dikkati çekti (P>0,05) (Çizelge 3.8) . Göğüs kasının boyuna ve enine kesitlerinde hem çekirdek alanı hem de NOR alanlarının deney gruplarında kontrol grubuna göre önemli ölçüde düştüğü (P<0,05), NOR sayısı ve nispi AgNOR oranı arasındaki farkın önemsiz olduğu dikkati çekti (P>0,05) (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.2 . Kuluçkanın 11. gününde bacak kası kesitlerinde belirlenen hücre çekirdeği alanı, NOR alanı, NOR sayısı ve nispi AgNOR alanı (%).

Gruplar	Kuluçkanın 11. günü Bacak Kası Boyuna Kesit				Kuluçkanın 11. günü Bacak Kası Enine Kesit			
n=5	Çekirdek Alanı (x±Sd)	NOR Alanı (x±Sd)	NOR sayısı (x±Sd)	Nispi AgNOR alanı(%) (x±Sd)	Çekirdek Alanı (x±Sd)	NOR Alanı (x±Sd)	NOR sayısı (x±Sd)	Nispi AgNOR alanı(%) (x±Sd)
Kontrol	27,64±4,24[a]	1,55±0,37[a]	1,72±0,16	5,57± 0,7	23,81±4,42[a]	1,59±0,26[a]	1,70±0,09	6,76±0,88
5ng AFB_1	20,11±4,79[b]	1,16±0,39[ab]	1,62±0,32	5,97± 0,22	14,86±1,93[bc]	0,98±0,24[bc]	1,42±0,26	6,62±0,16
15 ng AFB_1	19,69±2,67[bc]	0,94±0,18[bc]	1,56±0,21	4,79±0,68	18,00±2,17[b]	1,03±0,18[b]	1,52±0,22	5,84±0,11
40ng AFB_1	14,82±2,61[c]	0,63±0,23[c]	1,96±0,25	4,15± 0,94	12,96±1,04[c]	0,70±0,19[c]	1,69±0,24	5,33±0,12
	*	*	-	-	*	*	-	-

[a-c] Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar istatistiksel öneme sahiptir ($P<0,05$).

Çizelge 3.3. Kuluçkanın 11. gününde göğüs kası kesitlerinde belirlenen hücre çekirdeği alanı, NOR alanı, NOR sayısı ve nispi AgNOR alanı oranı (%).

Gruplar	Kuluçkanın 11. günü Göğüs Kası Boyuna Kesit				Kuluçkanın 11. günü Göğüs Kası Enine Kesit			
n=5	Çekirdek Alanı (x±Sd)	NOR Alanı (x±Sd)	NOR sayısı (x±Sd)	Nispi AgNOR alanı(%) (x±Sd)	Çekirdek Alanı (x±Sd)	NOR Alanı (x±Sd)	NOR sayısı (x±Sd)	Nispi AgNOR alanı(%) (x±Sd)
Kontrol	22,49±2,77[a]	1,42±0,33	1,56±0,15	6,28±0,9	25,68±3,50[a]	1,60±0,32[a]	1,64±0,20	6,18±0,55[a]
5ng AFB_1	19,78±3,31[a]	0,92±0,36	1,72±0,15	4,55±0,11	17,63±2,90[bc]	1,08±0,21[b]	1,60±0,07	6,13±0,61[a]
15 ng AFB_1	20,44±2,86[a]	1,04±0,12	1,68±0,25	5,14±0,71	19,48±4,50[b]	0,93±0,18[b]	1,66±0,11	4,84±0,32[b]
40ng AFB_1	15,10±2,13[b]	0,98±0,53	1,96±0,39	6,44±0,32	14,41±2,57[c]	0,82±0,24[b]	1,86±0,18	5,69±0,88[a]
	*	-	-	-	*	*	-	*

[a-c] Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar istatistiksel öneme sahiptir ($P<0,05$).

Çizelge 3.4. Kuluçkanın 13. gününde bacak kası kesitlerinde belirlenen hücre çekirdeği alanı, NOR alanı, NOR sayısı ve nispi AgNOR alanı oranı (%).

Gruplar n=5	Kuluçkanın 13. günü Bacak Kası Boyuna Kesit				Kuluçkanın 13. günü Bacak Kası Enine Kesit			
	Çekirdek Alanı (x±Sd)	NOR Alanı (x±Sd)	NOR sayısı (x±Sd)	Nispi AgNOR alanı(%) (x±Sd)	Çekirdek Alanı (x±Sd)	NOR Alanı (x±Sd)	NOR sayısı (x±Sd)	Nispi AgNOR alanı(%) (x±Sd)
Kontrol	24,05±3,88[a]	1,56±0,24	1,64±0,21	6,61±0,12	22,24±5,52	1,62±0,59	1,60±0,14	7,28±0,12
5ng AFB_1	19,42±4,08[a]	1,61±0,28	1,64±0,16	8,40±0,13	17,63±2,54	1,71±0,33	1,68±0,30	9,69±0,32
15 ng AFB_1	20,1±92,30[a]	1,54±0,54	1,74±0,27	7,73±0,28	17,78±2,35	1,33±0,50	1,54±0,16	7,48±0,20
40ng AFB_1	13,06±4,03[b]	0,87±0,64	1,84±0,20	6,26±0,24	15,59±6,43	1,08±0,53	1,92±0,26	6,92±0,15
	*	-	-	-	-	-	-	-

[a-b]Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar istatistiksel öneme sahiptir (P<0,05).

Çizelge 3.5. Kuluçkanın 13. gününde göğüs kası kesitlerinde belirlenen hücre çekirdeği alanı, NOR alanı, NOR sayısı ve nispi AgNOR alanı oranı (%).

Gruplar	Kuluçkanın 13. günü Göğüs Kası Boyuna Kesit				Kuluçkanın 13. günü Göğüs Kası Enine Kesit			
n=5	Çekirdek Alanı (x±Sd)	NOR Alanı (x±Sd)	NOR sayısı (x±Sd)	Nispi AgNOR alanı(%) (x±Sd)	Çekirdek Alanı (x±Sd)	NOR Alanı (x±Sd)	NOR sayısı (x±Sd)	Nispi AgNOR alanı(%) (x±Sd)
Kontrol	18,28±5,58^{ab}	1,52±0,45^{a}	1,64±0,25	8,83±0,38^{ab}	20,91±3,13^{a}	1,81±0,35^{a}	1,72±0,30	8,65±0,34
5ng AFB_1	17,29±2,25^{ab}	1,62±0,51^{a}	1,68±0,22	9,47±0,34^{a}	19,48±3,25^{a}	1,77±0,37^{a}	1,56±0,16	9,09±0,11
15 ng AFB_1	21,92±3,69^{a}	1,58±0,26^{a}	1,62±0,14	7,34±0,13^{ab}	16,99±3,76^{a}	1,78±0,65^{a}	1,42±0,14	10,47±0,28
40ng AFB_1	13,19±3,76^{b}	0,73±0,23^{b}	1,80±0,23	5,56±0,66^{b}	12,04±2,07^{b}	0,82±0,41^{b}	1,72±8,36	6,60±0,21
	*	*	-	-	*	*	-	-

$^{a-b}$Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar istatistiksel öneme sahiptir ($P<0,05$).

Çizelge 3.6. Kuluçkanın 17. gününde bacak kası kesitlerinde belirlenen hücre çekirdeği alanı, NOR alanı, NOR sayısı ve nispi AgNOR alanı oranı (%).

Gruplar	Kuluçkanın 17. günü Bacak Kası Boyuna Kesit				Kuluçkanın 17. günü Bacak Kası Enine Kesit			
n=5	Çekirdek Alanı (x±Sd)	NOR Alanı (x±Sd)	NOR sayısı (x±Sd)	Nispi AgNOR alanı(%) (x±Sd)	Çekirdek Alanı (x±Sd)	NOR Alanı (x±Sd)	NOR sayısı (x±Sd)	Nispi AgNOR alanı(%) (x±Sd)
Kontrol	30,76±3,39[a]	2,09±0,41[a]	2,00±0,80	6,75±0,78	25,65±5,80	1,88±0,53	1,98±0,83	7,77±0,37
5ng AFB_1	30,91±4,77[a]	1,66±0,71[a]	1,80±0,31	5,20±0,15	21,70±5,01	1,87±0,75	1,42±0,26	8,60±0,24
15 ng AFB_1	28,38±3,26[a]	1,63±0,60[a]	1,88±0,34	5,67±0,16	22,29±6,10	1,84±0,78	1,58±0,43	8,25±0,27
40ng AFB_1	19,94±3,33[b]	0,90±0,24[b]	1,92±0,17	4,53±0,96	17,52±3,92	0,94±0,38	1,78±0,22	5,40±0,21
	*	*	-	-	-	-	-	-

[a-b] Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar istatistiksel öneme sahiptir (P<0,05).

Çizelge 3.7. Kuluçkanın 17. gününde göğüs kası kesitlerinde belirlenen hücre çekirdeği alanı, NOR alanı, NOR sayısı ve nispi AgNOR alanı oranı (%).

Gruplar	Kuluçkanın 17. günü Göğüs Kası Boyuna Kesit				Kuluçkanın 17. günü Göğüs Kası Enine Kesit			
n=5	Çekirdek Alanı (x±Sd)	NOR Alanı (x±Sd)	NOR sayısı (x±Sd)	Nispi AgNOR Alanı(%) (x±Sd)	Çekirdek Alanı (x±Sd)	NOR Alanı (x±Sd)	NOR sayısı (x±Sd)	Nispi AgNOR alanı(%) (x±Sd)
Kontrol	26,01±2,10[a]	1,58±0,53	1,70±0,22	6,23±0,24	16,79±3,37	1,41±0,70	1,86±0,26	8,01±0,28
5ng AFB_1	24,10±7,63[a]	1,51±0,61	1,76±0,28	6,33±0,14	16,60±4,45	1,32±0,55	1,68±0,36	7,81±0,22
15 ng AFB_1	21,50±4,12[ab]	1,14±0,32	2,06±0,71	5,37±0,14	15,05±2,86	1,17±0,54	1,66±0,40	7,58±0,28
40ng AFB_1	16,85±4,82[b]	0,84±0,34	2,02±0,33	4,96±0,13	13,44±2,90	0,76±0,18	1,80±0,24	5,86±0,12
	*	-	-	-	-	-	-	-

[a-b] Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar istatistiksel öneme sahiptir (P<0,05).

Çizelge 3.8. Kuluçkanın 21. gününde bacak kası kesitlerinde belirlenen hücre çekirdeği alanı, NOR alanı, NOR sayısı ve nispi AgNOR alanı oranı (%).

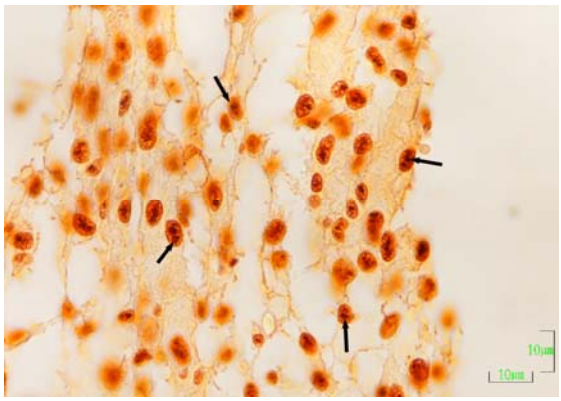
Gruplar n=5	Kuluçkanın 21.günü Bacak Kası Boyuna Kesit				Kuluçkanın 21.günü Bacak Kası Enine Kesit			
	Çekirdek Alanı (x±Sd)	NOR Alanı (x±Sd)	NOR sayısı (x±Sd)	Nispi AgNOR alanı(%) (x±Sd)	Çekirdek Alanı (x±Sd)	NOR Alanı (x±Sd)	NOR sayısı (x±Sd)	Nispi AgNOR alanı(%) (x±Sd)
Kontrol	31,18±2,14[a]	1,46±0,23[a]	1,81±0,15	4,69±0,60	27,29±3,34[a]	1,34±0,27[a]	1,68±0,14	4,87±0,49
5ng AFB_1	20,02±8,17[b]	0,80±0,43[b]	2,02±0,17	3,89±0,50	12,76±4,62[b]	0,67±0,31[b]	1,58±0,14	5,17±0,81
15 ng AFB_1	23,50±6,77[ab]	1,20±0,12[ab]	1,80±0,15	5,39±0,12	13,59±5,36[b]	0,66±0,16[b]	1,58±0,34	4,84±0,20
40ng AFB_1	Civiciv çıkışı olmadı	Civiciv çıkışı olmadı	Civiciv çıkışı olmadı	Civiciv çıkışı olmadı	Civiciv çıkışı olmadı	Civiciv çıkışı olmadı	Civiciv çıkışı olmadı	Civiciv çıkışı olmadı
	*	*	-	-	*	*	-	-

[a-b] Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar istatistiksel öneme sahiptir (P<0,05).

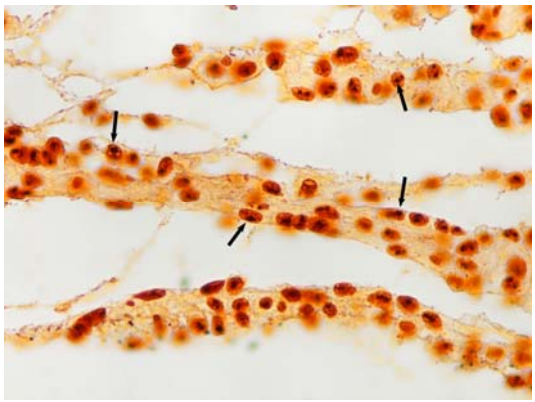
Çizelge 3.9. Kuluçkanın 21. gününde göğüs kası kesitlerinde belirlenen hücre çekirdeği alanı, NOR alanı, NOR sayısı ve nispi AgNOR alanı oranı (%).

Gruplar	Kuluçkanın 21. günü Göğüs Kası Boyuna Kesit				Kuluçkanın 21. günü Göğüs Kası Enine Kesit			
n=5	Çekirdek Alanı (x±Sd)	NOR Alanı (x±Sd)	NOR sayısı (x±Sd)	Nispi AgNOR alanı(%) (x±Sd)	Çekirdek Alanı (x±Sd)	NOR Alanı (x±Sd)	NOR sayısı (x±Sd)	Nispi AgNOR alanı(%) (x±Sd)
Kontrol	25,58±2,75[a]	1,35±0,53[a]	1,82±0,33	5,18±0,16	18,45±1,69[a]	1,15±0,23[a]	1,48±8,36[b]	6,25±0,11
5ng AFB_1	16,61±2,27[b]	0,72±8,74[b]	1,92±0,25	4,43±0,79	12,51±1,40[b]	0,63±9,85[b]	1,86±0,21[a]	5,13±0,10
15 ng AFB_1	13,10±5,68[b]	0,51±0,23[b]	2,06±0,13	3,96±0,44	10,79±3,48[b]	0,60±0,20[b]	1,66±0,26[ab]	5,61±0,92
40ng AFB_1	Civiciv çıkışı olmadı	Civiciv çıkışı olmadı	Civiciv çıkışı olmadı	Civiciv çıkışı olmadı	Civiciv çıkışı olmadı	Civiciv çıkışı olmadı	Civiciv çıkışı olmadı	Civiciv çıkışı olmadı
	*	*	-	-	*	*	*	-

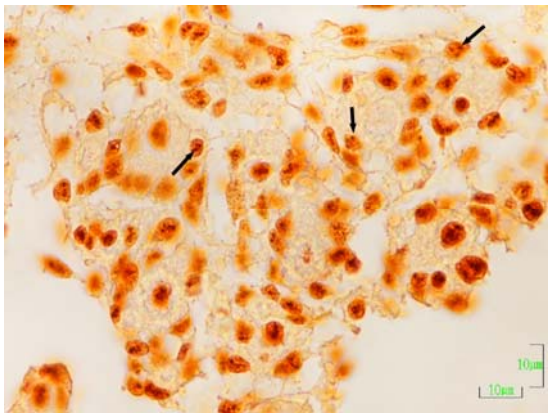
[a-b] Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar istatistiksel öneme sahiptir (P<0,05).



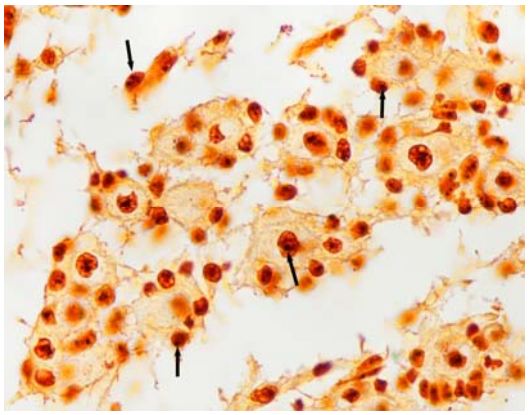
Şekil 3.5. Kontrol grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 11. günündeki göğüs kası boyuna kesiti görülmektedir. Oklar: Kahverengi-siyah lekeler halindeki AgNOR'lar. AgNOR boyaması, büyütme çizgisi: 10 µm.



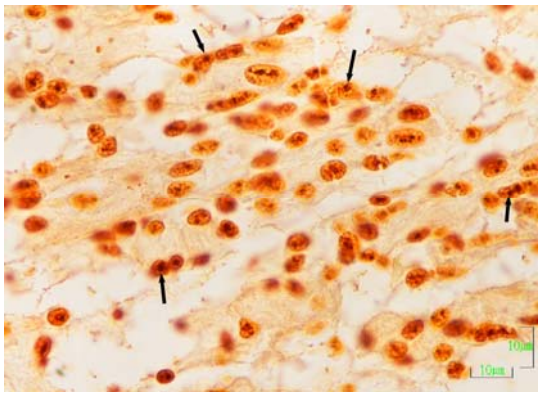
Şekil 3.6. 40 ng AFB_1 grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 11. günündeki göğüs kası boyuna kesiti görülmektedir. Oklar: Kahverengi-siyah lekeler halindeki AgNOR'lar. AgNOR boyaması, büyütme çizgisi: 10 µm.



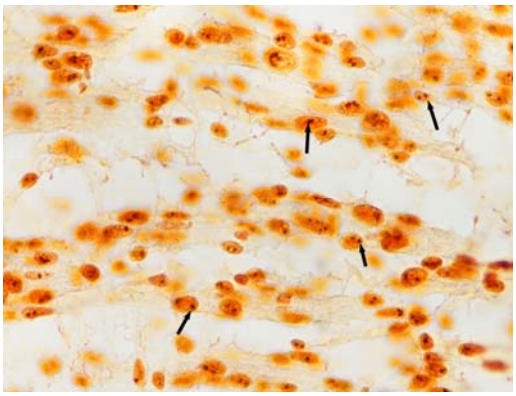
Şekil 3.7. Kontrol grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 11. günündeki göğüs kası enine kesiti görülmektedir. Oklar: Kahverengi-siyah lekeler halindeki AgNOR'lar. AgNOR boyaması, büyütme çizgisi: 10 µm.



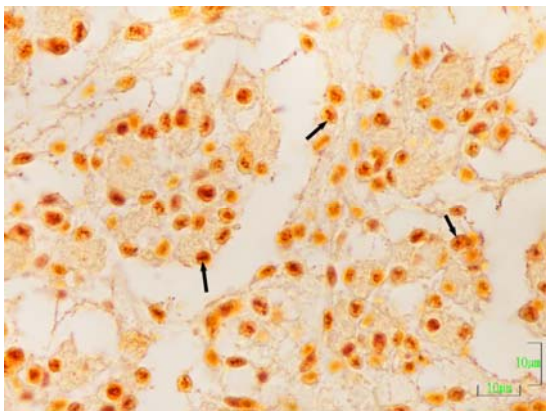
Şekil 3.8. 40 ng AFB_1 grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 11. günündeki göğüs kası enine kesiti görülmektedir. Oklar: Kahverengi-siyah lekeler halindeki AgNOR'lar. AgNOR boyaması, büyütme çizgisi: 10 µm.



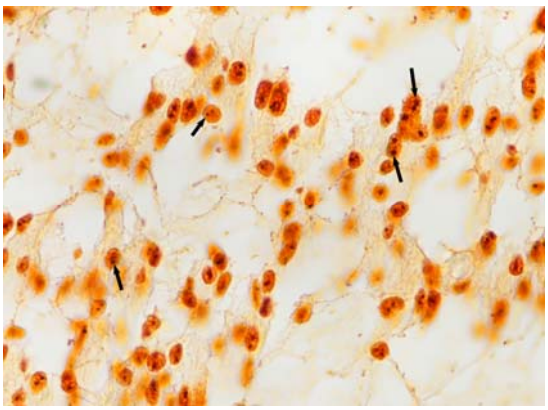
Şekil 3.9. Kontrol grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 11. günündeki bacak kası boyuna kesiti görülmektedir. Oklar: Kahverengi-siyah lekeler halindeki AgNOR'lar. AgNOR boyaması, büyütme çizgisi: 10 µm.



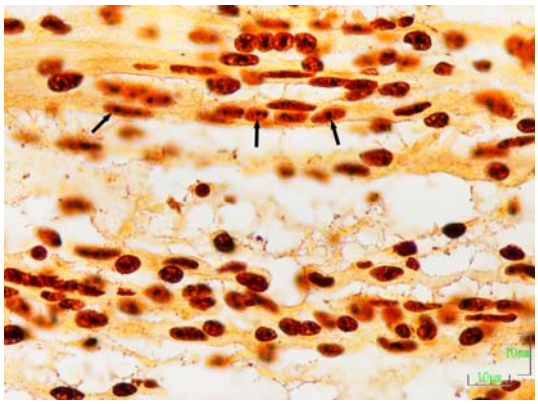
Şekil 3.10. 40 ng AFB_1 grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 11. günündeki bacak kası boyuna kesiti görülmektedir. Oklar: Kahverengi-siyah lekeler halindeki AgNOR'lar. AgNOR boyaması, büyütme çizgisi: 10 µm.



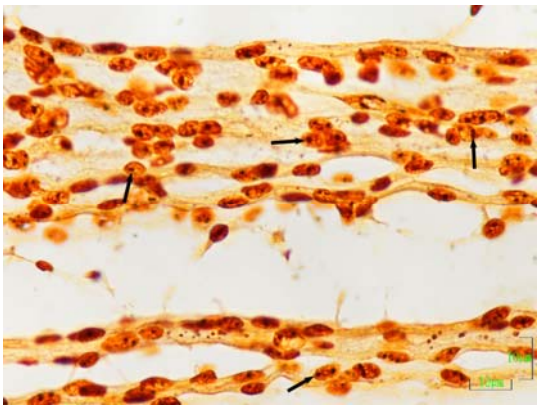
Şekil 3.11. Kontrol grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 11. günündeki bacak kası enine kesiti görülmektedir. Oklar: Kahverengi-siyah lekeler halindeki AgNOR'lar. AgNOR boyaması, büyütme çizgisi: 10 µm.



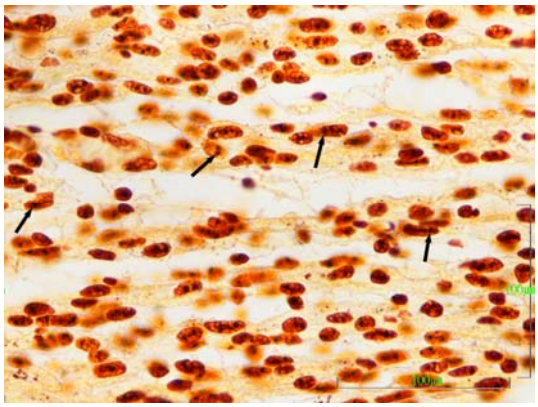
Şekil 3.12. 40 ng AFB_1 grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 11. günündeki bacak kası enine kesiti görülmektedir. Oklar: Kahverengi-siyah lekeler halindeki AgNOR'lar. AgNOR boyaması, büyütme çizgisi: 10 µm.



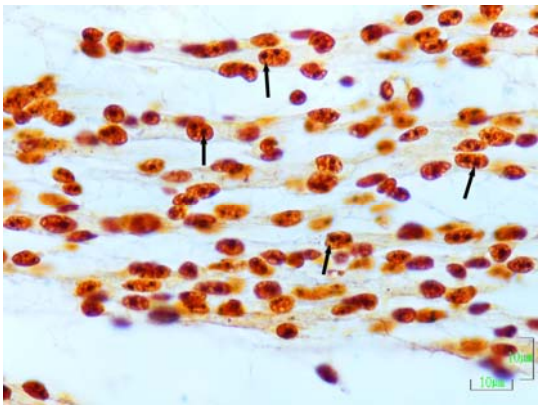
Şekil 3.13. Kontrol grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 13. günündeki bacak kası boyuna kesiti görülmektedir. Oklar: Kahverengi-siyah lekeler halindeki AgNOR'lar. AgNOR boyaması, büyütme çizgisi: 10 µm.



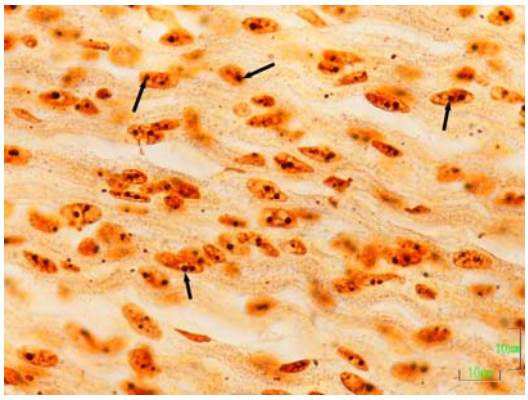
Şekil 3.14. 40 ng AFB_1 grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 13. günündeki bacak kası boyuna kesiti görülmektedir. Oklar: Kahverengi-siyah lekeler halindeki AgNOR'lar. AgNOR boyaması, büyütme çizgisi: 10 µm.



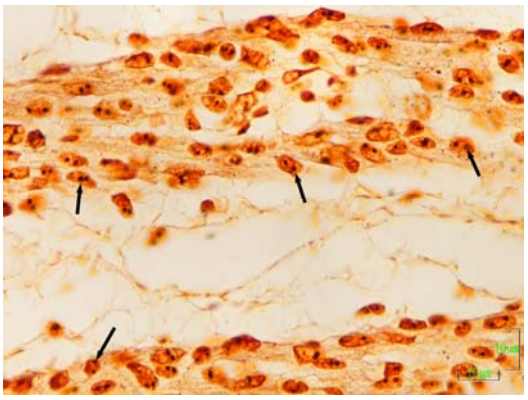
Şekil 3.15. Kontrol grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 13. günündeki göğüs kası boyuna kesiti görülmektedir. Oklar: Kahverengi-siyah lekeler halindeki AgNOR'lar. AgNOR boyaması, büyütme çizgisi: 10 µm.



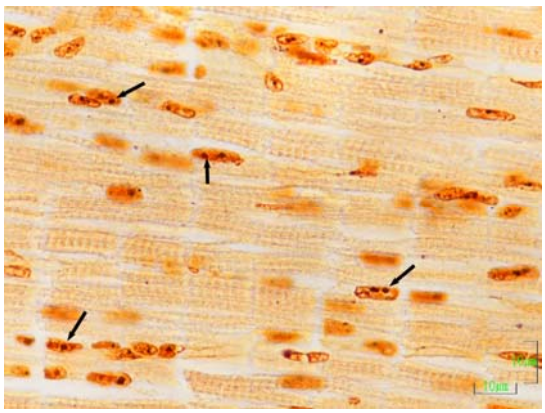
Şekil 3.16. 40 ng AFB_1 grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 13. günündeki göğüs kası boyuna kesiti görülmektedir. Oklar: Kahverengi-siyah lekeler halindeki AgNOR'lar. AgNOR boyaması, büyütme çizgisi: 10 µm.



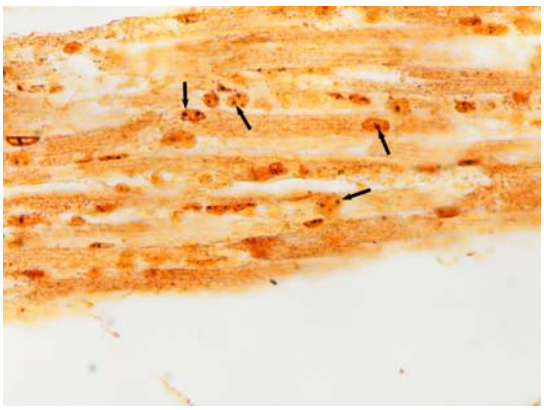
Şekil 3.17. Kontrol grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 17. günündeki bacak kası boyuna kesiti görülmektedir. Oklar: Kahverengi-siyah lekeler halindeki AgNOR'lar. AgNOR boyaması, büyütme çizgisi: 10 µm.



Şekil 3.18. 40 ng AFB_1 grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 17. günündeki bacak kası boyuna kesiti görülmektedir. Oklar: Kahverengi-siyah lekeler halindeki AgNOR'lar. AgNOR boyaması, büyütme çizgisi: 10 µm.



Şekil 3.19. Kontrol grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 21. günündeki göğüs kası boyuna kesiti görülmektedir. Oklar: Kahverengi-siyah lekeler halindeki AgNOR'lar. AgNOR boyaması, büyütme çizgisi: 10 µm.

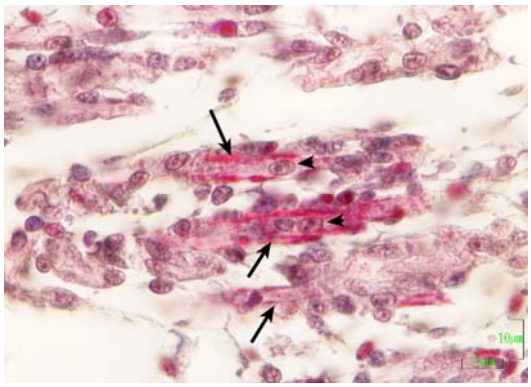


Şekil 3.20. 40 ng AFB_1 grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 21. günündeki göğüs kası boyuna kesiti görülmektedir. Oklar: Kahverengi-siyah lekeler halindeki AgNOR'lar. AgNOR boyaması, büyütme çizgisi: 10 µm.

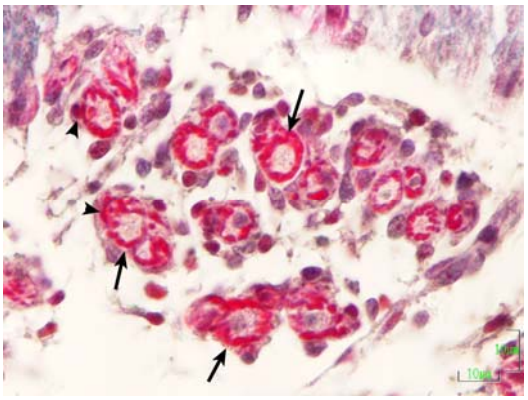
3.3. Göğüs Kası ve Bacak Kasının Embriyonik Gelişimi

Kuluçkanın 11. gününde hem bacak kasın ve hem de göğüs kasının longitidunal kesitlerinde miyoblastların miyotüpleri şekillendirmek için bir araya gelip birleştikleri görüldü. Miyotüpleri oluşturan miyoblastların çekirdekleri oval ve miyotüpün merkezinde yerleşim göstermekteydi (Şekil 3.21 ve 3.23). Enine kesitlerde ise primer fibriller ve bunların çevrelerinde yerleşmiş olan sekonder fibriller dikkati çekti (Şekil 3.22 ve 3.24). Özellikle 40 ng AFB_1 grubuna ait

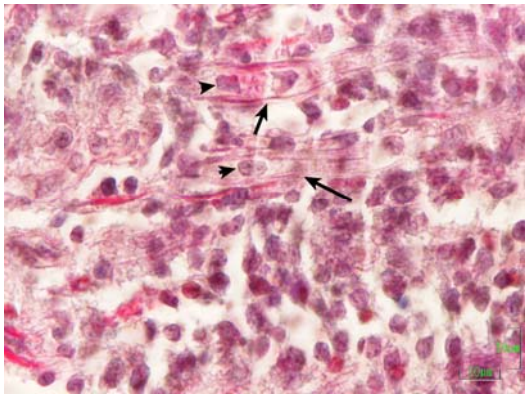
embriyolardan alınan kesitlerde miyotüplerin şekillendiği, ancak miyotüp içindeki çekirdek sayısının azlığı dikkati çekti (Şekil 3.25 ve 3.27). Enine kesitlerde ise primer fibriller görülürken, sekonder fibrillerin oldukça az olduğu gözlendi (Şekil 3.26 ve 3.28).



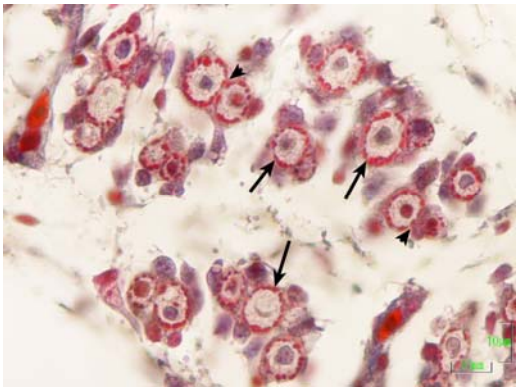
Şekil 3.21. Kontrol grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 11. günündeki bacak kası boyuna kesiti görülmektedir. Oklar: Oluşmakta olan miyotüpler, Ok Başları: Miyotüp içindeki çekirdekler,üçlü boyama, büyütme çizgisi: 10 µm.



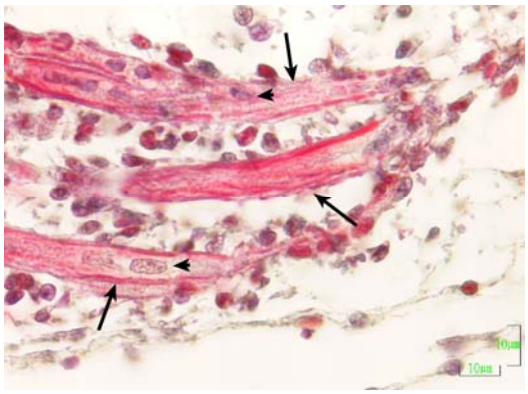
Şekil 3.22. Kontrol grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 11. günündeki bacak kası enine kesiti görülmektedir. Oklar: Primer fibriller, Ok Başları: Sekonder fibriller, üçlü boyama , büyütme çizgisi: 10 µm.



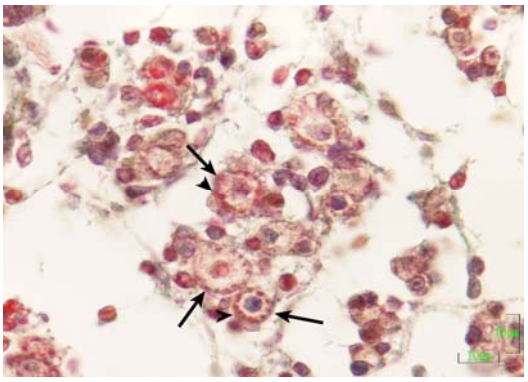
Şekil 3.23. Kontrol grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 11. günündeki göğüs kası boyuna kesiti görülmektedir. Oklar: Oluşmakta olan miyotüpler, Ok Başları: Miyotüp içindeki çekirdekler, üçlü boyama , büyütme çizgisi: 10 µm.



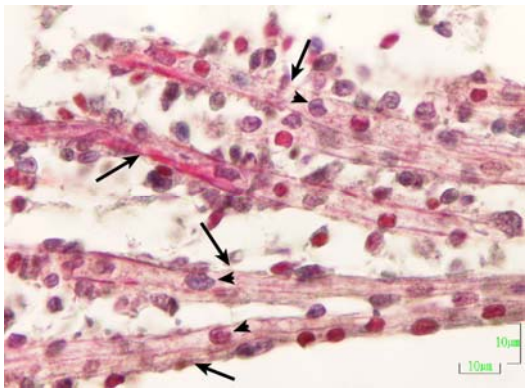
Şekil 3.24. Kontrol grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 11. günündeki göğüs kası enine kesiti görülmektedir. Oklar: Primer fibriller, Ok Başları: Sekonder fibriller, üçlü boyama , büyütme çizgisi: 10 µm.



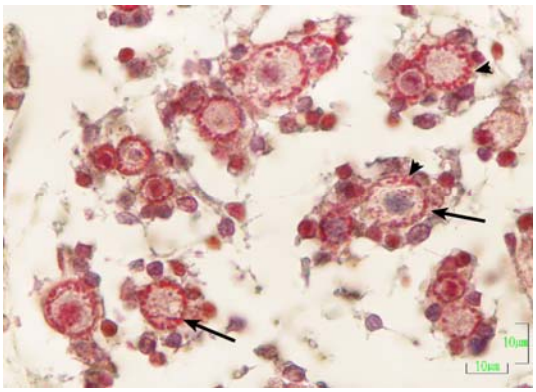
Şekil 3.25. 40 ng AFB_1 grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 11. günündeki bacak kası boyuna kesiti görülmektedir. Oklar: Oluşmakta olan miyotüpler, Ok Başları: Miyotüp içindeki çekirdekler, üçlü boyama , büyütme çizgisi: 10 µm.



Şekil 3.26. 40 ng AFB_1 grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 11. günündeki bacak kası enine kesiti görülmektedir. Oklar: Primer fibriller, Ok Başları: Sekonder fibriller, üçlü boyama , büyütme çizgisi: 10 µm.



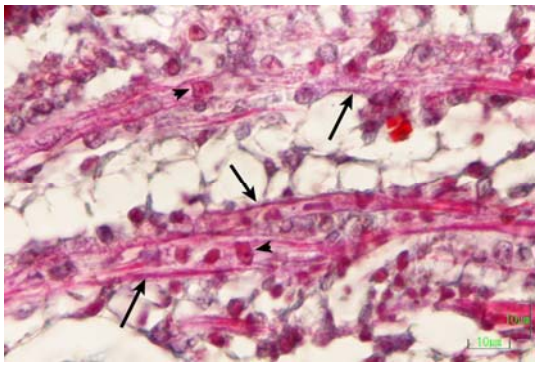
Şekil 3.27. 40 ng AFB_1 grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 11. günündeki göğüs kası boyuna kesiti görülmektedir. Oklar: Oluşmakta olan miyotüpler, Ok Başları: Miyotüp içindeki çekirdekler, üçlü boyama , büyütme çizgisi: 10 µm.



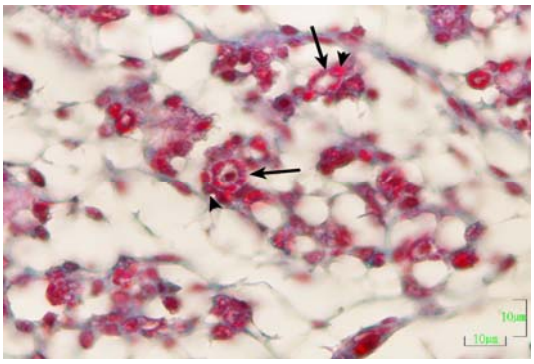
Şekil 3.28. 40 ng AFB_1 grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 11. günündeki göğüs kası enine kesiti görülmektedir. Oklar: Oluşmakta olan miyotüpler, Ok Başları: Miyotüp içindeki çekirdekler, üçlü boyama , büyütme çizgisi: 10 µm.

İnkübasyonun 13. gününde boyuna kesitlerde primer ve sekonder fibrillerin oluşumu daha belirgindi. 40 ng AFB_1 grubuna ait embriyolardan alınan kesitlerde miyotüplerin kontrol grubundakine göre daha düzensiz şekillendiği ve miyotüp içindeki çekirdek sayısının azlığı dikkati çekti (Şekil 3.29 ve 3.31). Enine kesitlerde ise primer fibrillerin çaplarının kontrol grubuna göre daha küçük olduğu, şekillenen

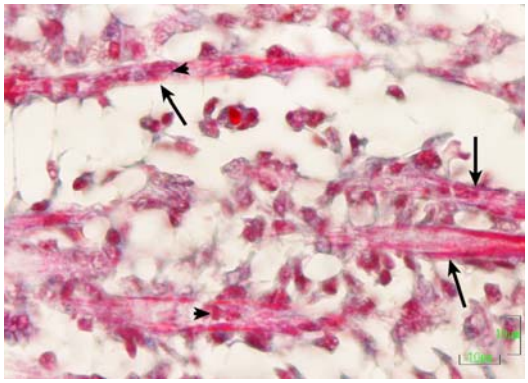
primer fibril sayısının azlığı ve içlerinde vakuoler dejenerasyonlar göze çarptı (Şekil 3.30 ve 3.32).



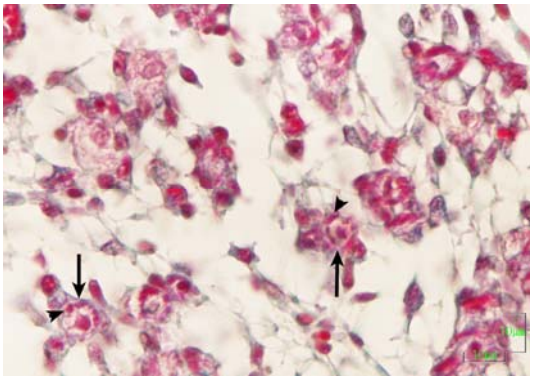
Şekil 3.29. Kontrol grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 13. günündeki bacak kası boyuna kesiti görülmektedir. Oklar: Oluşmakta olan miyotüpler, Ok Başları: Miyotüp içindeki çekirdekler, üçlü boyama, büyütme çizgisi: 10 µm.



Şekil 3.30. Kontrol grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 13. günündeki bacak kası enine kesiti görülmektedir. Oklar: Primer fibriller, Ok Başları: Sekonder fibriller, üçlü boyama , büyütme çizgisi: 10 µm.

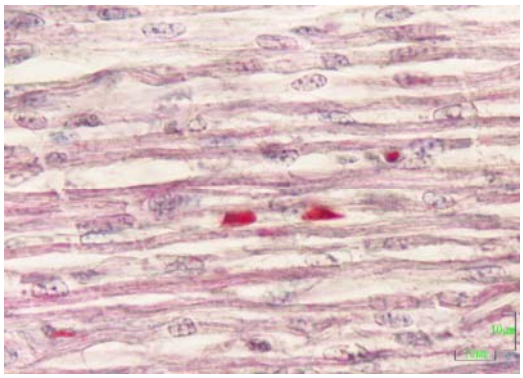


Şekil 3.31. 40 ng AFB_1 grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 13. günündeki bacak kası boyuna kesiti görülmektedir. Oklar: Oluşmakta olan miyotüpler, Ok Başları: Miyotüp içindeki çekirdekler, üçlü boyama , büyütme çizgisi: 10 µm.

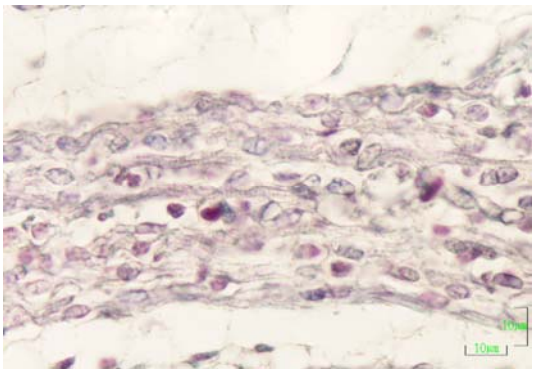


Şekil 3.32. 40 ng AFB_1 grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 13. günündeki bacak kası enine kesiti görülmektedir. Oklar: Primer fibriller, Ok Başları: Sekonder fibriller, üçlü boyama , büyütme çizgisi: 10 µm.

Kuluçkanın 17. gününde kontrol grubunda enine bantlaşmalar ve çekirdeklerin perifere doğru itilmeye başladığı görüldü (Şekil 3.33). 40 ng AFB_1 grubuna ait embriyolardan alınan kesitlerde ise enine bantlaşma çok zayıf şekillenmeye başlamıştı. Miyotüplerin çok düzensiz bir seyir gösterdiği dikkati çekti (Şekil 3.34).

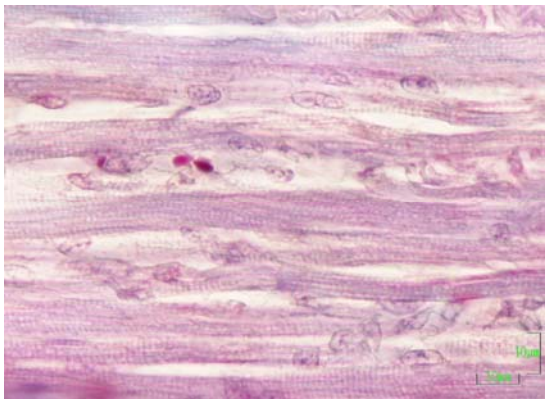


Şekil 3.33. Kontrol grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 17. günündeki bacak kası boyuna kesiti görülmektedir. Enine bantlaşmaların başladığı dikkati çekmektedir , üçlü boyama , büyütme çizgisi: 10 µm.

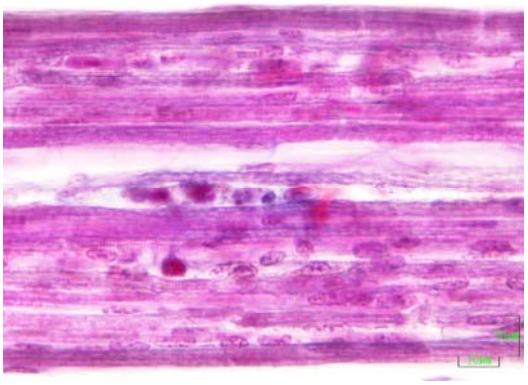


Şekil 3.34. 40 ng AFB_1 grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 17. günündeki bacak kası boyuna kesiti görülmektedir. Düzensiz seyreden miyotüpler dikkati çekmektedir. üçlü boyama , büyütme çizgisi: 10 µm.

Kuluçkanın 21. gününde enine bantlaşma oldukça belirgindi, çekirdekler sarkolemin hemen altında görüldü (Şekil 3.35). 40 ng AFB_1 grubunda canlı hayvan çıkışı olmadı. 15 ng AFB_1 grubunda miyofilaman oluşumu zayıftı (Şekil 3.36).



Şekil 3.35. Kontrol grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 21. günündeki bacak kası boyuna kesitinde enine bantlaşmaların oldukça belirgin olduğu görülmektedir, üçlü boyama , büyütme çizgisi: 10 µm.



Şekil 3.36. 15 ng AFB_1 grubuna ait bir embriyonun kuluçkanın 21. günündeki bacak kası boyuna kesitinde zayıf olarak şekillenmiş olan enine bantlaşmalar dikkati çekmektedir. üçlü boyama , büyütme çizgisi: 10 µm.

4. TARTIŞMA

Tavuk yemlerinde bulunan aflatoksinler (AF) tavukçuluk sektöründe, birden fazla aşamada etkilerini göstermektedir. Broiler sektöründe en iyi bilinen doğrudan etkileri, kronik aflatoksikozisli hayvanların canlı ağırlık kazancı ve yemden yararlanma oranlarının düşmesidir (Kubena ve ark 1998, Oğuz ve ark 2000b). Bu şekilde ortaya çıkan önemli ekonomik kayıplara (Şanlı 1995) ek olarak, hayvanların immün sistemlerinin baskılanması nedeniyle hastalıklara daha duyarlı hale gelmeleri de ilaç ve tedavi giderlerini arttırmaktadır.

Gerek yedirme denemeleri ve gerekse de saha taramaları sonuçları, yemle alınan aflatoksinlerin önemli bir kısmının kanatlı dokularına ve yumurtaya geçebildiğini ortaya koymaktadır (Ağaçdelen ve Acet 1993, Aldemir 1992, Jacobson ve Wiseman 1974, Trucksess ve ark 1983, Sudhakar 1992, Oliveira ve ark 2000). Yapılan çalışma sonuçları dikkate alınarak yapılan hesaplamalar, aflatoksinin yemden yumurtaya geçiş oranının 1/2000-1/2500 arasında olduğunu ortaya koymaktadır (Hamilton 1982).

Tarım, Orman ve Köy İşleri Bakanlığı'nın konuyla ilgili tebliği (1997) ile ülkemizde karma yemlerde bulunmasına izin verilen total aflatoksin düzeyinin 50 μg/kg (50 ppb) yem ve AFB_1 düzeyinin de 20 μg/kg yem (20 ppb) olduğu dikkate alınarak; bu düzeylerde AFB_1 ve total aflatoksinle kontamine olan yemden günde 130 gr tüketerek gün aşırı yumurtladığı varsayılan bir tavuğun yumurtasında, yumurtaya geçiş oranı 1/2000 olarak kabul edilmek suretiyle yapılan teorik hesaplama sonuçları, yumurtada bulunması muhtemel olan toplam AF düzeyinin de 6,5 ng/yumurta olduğunu göstermektedir (Hamilton 1982, Çelik ve ark 2000a). Ayrıca, doğal aflatoksinlerin %87,4'ünün AFB_1 (Oğuz 1997) olduğu dikkate alındığında müsaade edilen 50 ppb'lik total AF düzeyi, yumurtaya muhtemelen 5,68 ng AFB_1'in geçmesine neden olacaktır. Eğer yemde bulunmasına müsaade edilen AFB_1 düzeyi olan 20 μg/kg yem (20 ppb) dikkate alınılırsa, yukarıdaki şartlarda yem yiyen ve yumurtlayan bir tavuğun yumurtasında ise 2,6 ng AFB_1 bulunacaktır.

Broiler yemlerinde yapılan tarama sonuçları (Kaya 1990,Nizamlıoğlu 1996, Oğuz ve Kurtoğlu 2000), AF düzeyinin 5-100 μg/kg yem (5-100 pbb) arasında değiştiğini, çoğunlukla da 50 μg/kg'ın (50 ppb) altında olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, AF'in hayvansal dokular ve hayvansal kökenli gıda maddeleriyle, insanlara geçtiği, AF kendisinin değil etkilerinin kümülatif olmasıyla , pratikte bu seviyelerin bile insan sağlığı açısından önem arz edebileceği ortaya çıkmaktadır. Nitekim yapılan bir tarama çalışmasında (Tuncer 1987) Ankara'da tüketime sunulan yumurta örneklerinde 120 ng/yumurta düzeyine ulaşan AFB_1 tespit edilmiştir. Yumurtaya geçen aflatoksinlerin büyük çoğunluğunu AFB_1'in aktif metobolitlerinin oluşturduğu dikkate alındığında, olayın ciddiyeti artmaktadır.

Bu çalışmada, uygulama kolaylığı, yumurtaların enfekte olma riskinin en düşük düzeyde olması, verilen solüsyonun homojen ve hızlı bir şekilde diffüze olmasının yanı sıra, diğer yöntemlerde söz konusu olan yumurta içi basıncın artışına neden olmadığından (Stoloff ve ark 1972, Kemper ve Luepke 1986, Çelik ve ark. 2000a, Sur ve Çelik 2003), ideal hacim olan 20 μl'lik farklı dozlarda AFB_1 solüsyonlarının hava kamarasına enjeksiyonu tercih edilmiştir.

Aflatoksinlerin etki mekanizması üzerinde yapılan çalışmalarda, doğada en yaygın olarak bulunan ve en tehlikeli olan aflatoksin türünün AFB_1 olduğu belirlendiğinden, etki mekanizması en detaylı biçimde aydınlatılmış olan aflatoksin de AFB_1'dir (Busbee ve ark 1990, Leeson ve ark 1995). Genel olarak DNA, RNA ve protein sentezini inhibe ederek etkiyen bir toksin olup, metabolize edilmesi sonucu oluşan metabolitleri daha toksiktir (Jeffery ve ark 1984, Leeson ve ark 1995, Kaya 1998). AFB_1, karaciğerde sitokrom p-450'ye bağlı karma işlevli oksidaz (cyto chrome p-450 dependent mixed function oxydases, MFO) enzim sistemiyle metabolize edilerek epoksit türevlerine (AFB_1-8,9 epoksit) dönüştürüldükten sonra sitotoksik, karsinojenik, mutajenik ve teratojenik aktiviteleri güçlenir (Leeson ve ark 1995, Mayura ve ark 1998). Bununla birlikte, kanatlı embriyosunda metabolik reaksiyonun gerçekleşmesi, karaciğer ve böbreklerin aktive oldukları, embriyonik

dönemin 5-6. günlerinden sonra mümkündür (Hamilton 1982). Daha önce yapılan çalışmalarda (Çelik ve ark 2000a, Sur ve Çelik 2003) ve bu çalışmada, kuluçkanın başlangıcında verilen AFB_1'in metabolize olmadan da şiddetli embriyotoksik etkisi gözlenmiş ve ölümlerin erken embriyonik dönemlerde yoğunlaştığı dikkati çekmiştir. Bu sonuçlar, AFB_1'in doğal halinde de şiddetli derecede embriyotoksik bir madde olduğunu göstermektedir.

AFB_1'in embriyonik hücreler üzerindeki etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte, Çelik ve ark (2000a) ile Sur ve Çelik (2003), nispeten orta dozda AFB_1 verilen yumurtalarda gelişen embriyolarda, diskus embriyonalisin area pellucidasının dışa doğru fıtıklaşmasıyla karakterize olan bir anomali tespit etmişlerdir. Bu bulgulara dayanarak araştırıcılar (Çelik ve ark 2000a, Sur ve Çelik 2003), AFB_1 molekülünün, embriyonik hücrelerin diferansiyasyonu bozmak suretiyle söz konusu anomaliye neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada da benzer erken embriyonik gelişim anomalileri yanında, değişen oranlarda embriyonik gelişme geriliği de tespit edilmiştir. Öznurlu ve Çelik (2004) yumurtaya farklı dozlarda enjekte ettikleri AFB_1'in genel gelişme geriliğine sebep olduğunu ve kemik gelişimi özellikle tibial büyüme plağının gelişimi üzerinde önemli zararlı etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada özellikle embriyonik dönemin 11, 13, 17 ve 21. günlerinde, kontrol ve deney gruplarının rölatif embriyo ağırlıkları arasında önemli ($P<0,05$) farklar tespit edilmiştir (Çizelge 3.1). Bu durum, genel vücut gelişiminde oluşan gerilemenin bir sonucu olarak, hayvanların iskelet ve kas sisteminin gelişiminin de yavaşlamasından kaynaklanmaktadır. Nitekim, etkilenen embriyoların göğüs ve bacak kası ağırlıkları deney gruplarında kontrol gruplarınınkinden önemli derecede ($P<0,05$) daha düşük bulunmuştur (Çizelge 3.1).

Broiler sektöründe besleme süresinin kısa, yem tüketimi hızının da yüksek olması nedeniyle yemde düşük düzeyde AF bulunsa bile hayvanların kısa sürede yüksek miktarda AF almaları sonucunu doğurmaktadır. AF, hem doğrudan

toksikasyona sebep olmaları ve hem de immün sistemi baskılayarak dolaylı yoldan sürünün hastalıklara karşı duyarlılığını arttırmaları nedeniyle de önemli sorunlara yol açmaktadırlar. Aflatoksikozisli broilerlerde dikkati çeken ilk belirtiler, yem tüketimi ile canlı ağırlık kazancının ve yemden yararlanma oranının düşmesidir (Diener ve Davis 1985, Oğuz ve Kurtoğlu 2000). Hepatoksik etkisinin bir sonucu olarak; bir yandan karaciğer yağlanması gelişirken, diğer yandan da protein sentezi önemli ölçüde aksamaktadır. Pıhtılaşma proteinleri sentezinin azalması ve kapillar damarlarda oluşan çatlamalar sonucu hayvanlarda peteşiyel kanamalar ve anemi şekillenir. Karkas kalitesi bozulur, karkasta oluşan kanamalar nedeniyle çürüme ve esmerleşme gözlenir. Bu durumun kesimden 2 hafta öncesinde AF'li yem tüketen piliçlerde bile görülebildiği bildirilmektedir (Huff ve ark 1986, Demet ve ark 1995, Şanlı 1995). Toksinin yem içindeki dağılımı, yemdeki diğer mikotoksinler, yemin bileşimi, kümesteki sağlık problemleri, aşılamalar, stres faktörleri ve toksine maruz kalma süresi, hayvanların AF'e duyarlılığını etkilemektedir.

Beyaz etin yetiştiricilikte büyük ekonomik öneme sahip olması, damızlık broilerlerde göğüs kası verimini artırmak için yoğun genetik seleksiyonlar yapılmasına sebep olmuştur. Genetik seleksiyon programları broilerlerde et verimini önemli ölçüde artırmıştır.Kastaki bu artışla fizyolojik olarak tamamen anlaşılamamasına rağmen, çoğunlukla miyofibrillerin hacim ve sayısındaki artışla ilişkilidir (Scheurmann ve ark 2004). Stickland ve Handel (1986) domuzlarda hızlı büyüme ile miyofibril sayısı arasında pozitif bir ilişki olduğunu bildirmiştir. Burke ve Henry (1997) yaptıkları çalışmada yumurtadan çıkışta, ticari piliçlerde Bantam tavuklarına göre semimembranozus kasının iki kat daha fazla miyofibril sayısına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Remignon ve ark (1995) ise hızlı büyüyen tavuk türlerinde, yavaş büyüyen tavuk türlerine göre anterior latissimus dorsi kasında %15-20 daha fazla miyofibril bulunduğunu tespit etmişlerdir.

İskelet kası hayvan kütlesinin en büyük oranını oluşturur. Kas temel gıda ürünüdür. Kanatlı endüstrisinin temel amaçlarından biri et kalitesini koruyarak artan büyüme hızı ve artan kas kütlesi için hayvan seçmek olmuştur. Kanatlı yetiştiricileri

için büyümenin bu azami dereceye çıkması, karkasın en değerli parçası olan göğüs kası için yağsız karkas gelişimine odaklanmıştır.

İn vitro ve in vivo çalışma sonuçları, broilerlerde protein sentez ve yıkım hızındaki dengenin, protein yapımı yönünde değişmiş olduğunu göstermektedir (Klasing ve ark 1987). Hücresel düzeyde büyüme ve protein sentez hızının artması, sitoplazmik ribozomların sayılarının artmasını gerektirir. rDNA genlerinin transkripsiyonunun ve ribozom yarılanma ömrünün artışının, hücredeki ribozom düzeylerinin artışında önemli katkıları vardır (Larson ve ark 1991). Bununla birlikte, tek yönlü seleksiyon yapılan sürülerde özel bir organ sistemi (broylerlerde kas dokusu ve yumurtacıların da ovidukt dokusu) hücrelerindeki rDNA kopya sayısında artış olup olmadığı hakkında yeterli veri bulunmamaktadır.

Embriyonik kas büyümesi miyotüplerdeki miyoblastların diferensiyasyonu ve proliferasyonu arasındaki dengenin sonucudur. Miyoblastlardaki proliferasyon oranındaki artış, kas büyümesinin uyarılması ve kasın hacmindeki artışla sonuçlanan miyofibril sayısındaki artışı düşündürmektedir. (Thomas ve ark 2000). Kas hücresi proliferasyonu, göçü, adhezyonu ve füzyonu multinükleer miyotüblerin formasyonunu içeren süreçtir (Swartz ve ark 1994).

Bütün kas lifleri kas gelişmesini doğum öncesi dönemde eşzamanlı bir şekilde tamamlamaz. Embriyonik kas fibrillerinin şekillenmesinde ilk süreç primer fibrillerin oluşmasıdır ki, bu fibrillerde çekirdek merkezde lokalize olmuştur. Primer fibrilleri çevreleyen hücreler mononükleer miyojenik hücrelerdir ve bunlar sekonder fibrillere diferensiye olurlar. Sekonder kas fibrilleri şekillendikten sonra sarkomerin Z bandı, yani kasın kontraktil ünitesi şekillendiğinde, olgun bir kas fibrilinin oluşması tamamlamış olacaktır. Kanatlılarda kas fibrilinin oluşumu büyük oranda kuluçka döneminde tamamlanır (Velleman 2007).

Embriyonik periyotta kas gelişmesi, miyoblastın çoğalması, multinükleer miyotüplere ve kas liflerine farklılaşmasıyla karakterizedir. Kas fibrillerinin kuluçkadan çıkış öncesi şekillenmesinden sonra fibril sayısı sabit kalır. Daha önceki çalışmalarda kuluçka dönemi kas büyümesinin kuluçka sonrası kas büyümesini nasıl

etkilediği dikkate alınmamıştır. Kuluçka sonrası kas büyümesi; DNA transkripsiyon ve translasyonunun artarak direk protein sentezindeki artışıyla olur. Daha fazla DNA elde edebilmek için çekirdek sayısında artışa gerek vardır. Miyoblastlardan kaynaklanan çekirdek sayısı kuluçkada sabitlendiği için, yeni çekirdekler başka hücre tiplerinden köken alırlar. Mauro (1961)'de iskelet kası bazal membranı ile plazma membranı arasında sıkışmış hücrelerin olduğunu tanımlamıştır. Sitoplazmaları az olduğundan için bu hücreler satellit hücreler olarak isimlendilmiştir. Kuluçkadan sonra, satellit hücreler mevcut kas fibrilleriyle kaynaşarak kas fibrilinin hacminde artış ya da hipertrofiye sebep olur (Velleman 2007). Büyüme faktörleri miyoblast ve satellit hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasında güçlü uyarıcı veya engelleyicidirler. Kanatlı sektöründe seleksiyonda büyük ölçüde hayvanların fenotipik büyüme hızları esas alınarak hiperplaziden ziyade hipertrofi temel alınmıştır (Velleman 2007).

Fischman (1967) 12 günlük tavuk embriyosu bacak kasının miyofibril gelişimini elektron mikroskobuyla incelemiştir. Araştırıcı, iskelet kasının şekillenme aşamalarını aşağıdaki gibi sınıflamıştır;

1. Farklılaşmamış mezenşim hücrelerinin mononükleer myoblastlara dönüşümü,
2. Miyoblastların sitoplazmik füzyonu sonucunda multinükleer kas tellinin şekillenmesi,
3. Miyofibril proteinlerinin sentezinin başlaması ve düzenli devam etmesi,
4. Miyofibril proteinlerinin organizasyonu ile karakteristik enine çizgili miyofibrillerin şekillenmesi,
5. Sarkoplazmik retikulum ve enine tubuler sistemin biçimlenmesi,
6. Kasılma faaliyetinin innervasyonu ve kas telinin fonksiyonel özellikler kazanması.

Henry ve Burke (1998) ile Kikuchi (1971) tavuk embriyolarında inkübasyonun 7 ile 16. günleri arasında çalışmışlardır. Araştırıcılar kuluçkanın 12 ve 16. günlerinde sekonder miyofibrillerin var olan primer miyofibrillerin çevresinde kümelenen ve farklılaşan miyoblastlardan şekillendiğini bildirmişlerdir.Sekonder miyofibrillerin kuluçka sonrasında da varlıklarını sürdürdükleri miyofibril sayısının kuluçkanın 10. gününden 16. gününe kadar hızlı bir şekilde arttığını; fakat daha

sonra miyofibrillerin sayısının değişmediğini belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışmada da kuluçkanın 11. gününde multinükleer miyotüplerin şekillenmiş olduğu ve primer fibrillerin çevresinde sekonder fibrillerin yerleştiği görüldü (Şekil 3.25 ve 3.26). Primer fibrillerde çekirdeğin merkezde lokalize olduğu belirlendi (Şekil 3.27 ve 3.28). Daha sonraki günlerde çekirdeğin perifere, yani sarkolemin altına doğru yer değiştirdiği görüldü(Şekil 3.33). Kuluçkanın 17. gününde enine bantlaşmaların belirmeye başladığı, 21. günde bantlaşmanın oldukça belirgin olduğu gözlendi (Şekil 3.33 ve 3.35). Aflatoksin verilen gruplardan özellikle 40 ng AFB_1 grubunda miyotüplerin düzensiz şekillendiği ve miyotüplerdeki çekirdek sayısının azlığı dikkati çekti(Şekil 3.34). Primer fibrillerin çaplarının kontrol grubuna göre daha küçük olduğu ve sekonder fibrillerin oluşumunun daha az olduğu göze çarptı (Şekil 3.32). Ayrıca enine bantlaşmaların çok zayıf şekillenmiş olduğu dikkati çekti (Şekil 3.36).

Tavuk karyotipi, 9 çift makro kromozom ve 30 çift de mikro kromozomdan oluşan toplam 78 kromozomdan oluşmaktadır. Kanatlılarda metafaz kromozomları üzerinde yapılan ilk çalışmalarda, makro ve mikro kromozomlar olmak üzere iki tip kromozom tanımlanmıştır. İlk yıllarda gerçek kromozom olarak nitelelenen makro kromozomlardan ayırmak için mikro kromozomlar "kromozoid" olarak da isimlendirilmiş, daha sonraları ise "mikro kromozom" olarak adlandırılmıştır. Kanatlı genlerinin yaklaşık % 50'si mikro kromozomlarda bulunur. Yapılan çalışmalar (Habermann ve ark 2001), fibroblast ve nöronlarda mikro kromozomların çekirdeğin ortasında, makrokromozomların ise periferinde lokalize olduğunu göstermektedir. Tavukta rRNA genleri 16 numaralı kromozom üzerinde bulunduğundan, bu kromozom çifti NOR kromozomu olarak bilinmektedir. Bu nedenle, diploid bir tavuk hücresinde 2 adet NOR ve 2 adet nükleolus bulunabileceği düşünülebilir (Miller ve ark 1996, Masabanda ve ark 2004).

Schmid ve ark (1982), NOR'ların gümüşle boyanma özelliklerinin ribozomal RNA genlerinin transkripsiyonel aktivitesinin bir göstergesi olduğunu ileri sürmektedir. Bu nedenle, farklı dokuları oluşturan hücrelerin AgNOR sayıları da farklılık göstermektedir. Nitekim, Zaczek ve ark (1992), sağlıklı sıçanların sindirim

kanalı epitel hücrelerinin AgNOR paremetrelerini inceledikleri çalışmalarında, farklı hayvanların sindirim kanalının farklı bölgelerindeki AgNOR sayıları ile bunların alanları ve AgNOR alanının çekirdek alanına oranları arasında önemli farklar tespit etmişlerdir. Araştırıcılar (Zaczek ve ark 1992), AgNOR parametrelerinin, epitelin proliferasyon aktivitesiyle ilişkili olduğunu, hücrenin lokalizasyonuna bağlı olarak tipik özellikler gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Bir nükleustaki AgNOR sayısı toplam AgNOR alanının, çekirdek alanıyla bağıntılı olduğu da saptanmıştır. Bir organizmanın farklı dokularındaki benzer hücrelerinin veya farklı organizmaların hücrelerinin genomlarında bulunan aktif NOR'ların sayıları arasında belirgin farklılıklar bulunduğuna ve aktif NOR sayılarının hücrenin protein sentez ihtiyacı ve çevre şartlarına göre değişiklik gösterdiğine dair ortak bir görüş bulunmaktadır (Goodpasture ve ark 1976, Mikelsaar ve ark 1977, Alberts ve ark 1989).

Tavuklarda, AgNOR'ların normal dokulardaki sayı, lokalizasyon ve büyüklükleriyle çekirdek büyüklüğü ve AgNOR paremetreleri arasındaki ilişkiler hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Su ve Delany (1998), büyüme performansının geliştirilmesi yönünde seleksiyona tabi tutulan etçi tavuk ırkları üzerinde çalışmışlardır. Araştırıcılar (Su ve Delany 1998), hem saf hatlar içinde ve hem de bu hatlar arasında NOR sayıları ile tiplerinde önemli farklılıklar olduğunu ve bu NOR tiplerinde farklı sayılardaki nükleolus oluşturabilme kapasitesine sahip olan rRNA genlerinin bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Ticari broyler saf hatları; ana ve baba tarafı olmak üzere iki ayrı hat halindeki popülasyonlara uygulanan seleksiyon kriterleri çerçevesinde, önce grand parentler elde edilmesi, bunların da farklı kombinasyonlar halinde çaprazlanması suretiyle elde geliştirilir. Üreticilere satılan ticari hatlar ise dört genotipik kökenli grand parentin kombinasyonuyla elde edilir. Böylece özel bakım, besleme ve üretim teknikleri uygulanmak suretiyle hızlı büyüyen ve daha iri etçi tavuklar elde edilir. Su ve Delany (1998), inceledikleri 13 yüksek verimli broyler hattında hücrelerin nükleolus büyüklüğünde yüksek oranda polimorfizm bulunduğunu saptamışlardır. Araştırıcılar

(Su ve Delany 1998), broylerle de aynı hat içindeki hayvanlarda ve hatlar arasında rRNA geni kopya sayısındaki varyasyona bağlı olarak yüksek oranda nükleolus büyüklüğü polimorfizmi bulunan bireylerin bulunması nedeniyle, ticari broyler hatlarında çok sayıda farklı NOR tipinin bulunduğunu ve bunlarda da farklı sayıda rRNA geni ve nükleolus oluşturma kapasitesi bulunduğunu ileri sürmüşlerdir. Aydın (2004), kuluçka ve kuluçka sonrası dönemin farklı evrelerinde yumurta ve et verimleri yönünden geliştirilmiş olan iki farklı tavuk ırkının farklı dokularında gümüşleme ile boyanan AgNOR bölgelerinin sayıları, lokalizasyonları, büyüklükleri ve alanlarını karşılaştırmıştır. Her iki ırk arasında bacak kası ve göğüs kası kas tellerinin çekirdek alanı, AgNOR sayısı, AgNOR alanı ve AgNOR alanının çekirdek alanına oranında değerlerin istatistiki açıdan önemli olmadığını ($P>0,05$), ancak broilerlerde bu parametrelerin daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Sunulan bu çalışmada embriyonik dönemin 11, 13, 17 ve 21. günlerinde bacak kası ile göğüs kasının boyuna ve enine kesitlerinde çekirdek alanı ve NOR alanının kontrol grubunda AFB_1 gruplarına oranla daha yüksek olduğu ($P<0,05$), ancak NOR sayısı ve NOR alanının çekirdek alanına oranında gruplar arasında istatistiki açıdan önemli fark olmadığı tespit edilmiştir. AFB_1'in RNA ve protein sentezini inhibe ederek etkiyen bir toksin olması bu grupların değerlerinde önemli bir düşüşe sebep olmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, AFB_1 verilen gruplarda, rölatif civciv ağırlıklarında oluşan düşüşlerin de gösterdiği gibi, ortaya çıkan genel gelişme geriliğinin bir sonucu olarak, iskelet ve kas sisteminin gelişimi de aksamış ve rölatif bacak kası ile göğüs kası ağırlıklarında önemli düşüşler meydana gelmiştir. AFB_1 verilen gruplarda bacak kası ile göğüs kasının boyuna ve enine kesitlerinde çekirdek alanı ve NOR alanının kontrol grubuna göre önemli oranda düştüğü tespit edilmiştir. NOR sayısı ve NOR alanının çekirdek alanına oranında ise önemli farklılıklar gözlenmemiştir. Bu bulgular AFB_1'in embriyonik hücrelerde protein ve DNA sentezini önemli oranda inhibe ettiğini bildiren çalışma bulgularını desteklemektedir.

Broiler yetiştiriciliğinde, hayvanların kısa bir süre içerisinde tüketim ağırlığına ulaşması amaçlandığından; embriyonik dönemde esnasında ortaya çıkabilecek olan her türlü olumsuz faktör, gelişmeyi engellemekte ve sonuç olarak, ileriki dönemlerde verimi ve kârlılığı önemli oranda düşürmektedir. Yemlerde bulunmasına müsaade edilen AFB_1 düzeylerinde dahi yumurtaya geçen aflatoksinden etkilenen embriyolarda gelişme geriliğinin görülmesi, bu konunun önemini artırmaktadır. Broiler yetiştiriciliğinde amaç, belli bir gidere karşılık en yüksek ve en ekonomik verim elde etmek olduğu için, embriyonik dönemde kas gelişiminde meydana gelecek aksamalar oldukça önemlidir.

Bu nedenle özellikle anaç tavukların beslenmesinde çok daha titiz olunmalı, gerek aflatoksin gerekse diğer olumsuz faktörler yanında yemler sıkı kontrollere tabi tutulmalıdır.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yumurtaya Verilen Aflatoksin B_1'in Broiler Civcivlerde Kas Gelişimi Üzerindeki Etkilerinin Histolojik Metotlarla İncelenmesi

Nimet GÜNDÜZ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı (Vet.)

YÜKSEK LİSANS TEZİ/KONYA-2010

Bu çalışmada, kuluçka başlangıcında yumurtaya farklı dozlarda verilen AFB_1'in, iskelet kaslarının embriyonik gelişimi üzerindeki etkileri histolojik yöntemlerle belirlenmiştir.

Materyal olarak ticari bir işletmeden elde edilen Ross ırkı broiler damızlıklara ait toplam 420 adet yumurta kullanıldı. Yumurtalar aşağıdaki gruplara ayrıldı; 1) kontrol grubu, 2) 5ng AFB_1/yumurta, 3) 15ng AFB_1/yumurta, 4) 40 ng AFB_1/yumurta grubu. İnkübasyonun hemen öncesinde, her yumurtaya 20 µl test solüsyonu, hava kamarası yoluyla enjekte edildi, takiben optimal koşullarda (37.8°C ve %65±2 nispi nem) kuluçka işlemine tabi tutuldu.

Kuluçkanın 11, 13, 17 ve 21. günlerinde, her gruptan rasgele seçilen 5'er yumurta açılarak, embriyoların Hamburger-Hamilton Skalası'na göre gelişim evreleri belirlendi ve takiben embriyolar hassas teraziyle tartıldı. Embriyolardan bacak (muskulus fibularis longus) ve göğüs kasından (muskulus sternocoracoideus pectoralis) doku örnekleri alındı. Alınan doku örnekleri, % 10'luk tamponlu (0,1 M, pH: 7,4) formol salin solüsyonunda tespit edildi ve bilinen histolojik yöntemlerle parafinde bloklandı. Kesitler; normal histolojik yapının belirlenmesi amacıyla Crossman'nın üçlü boyama yöntemi ve AgNOR'ların belirlenmesi amacıyla da gümüşleme boyama yöntemi ile boyandı.

Kuluçka dönemi boyunca açılan yumurtalardan elde edilen embriyoların rölatif embriyo ağırlıkları hesaplanarak, gruplar arasındaki farkların önem dereceleri belirlendi. Sonuçlar; AFB_1 verilen grupların rölatif embriyo ağırlıklarının kontrol grubuna göre yumurtadaki AF derişimine bağlı olarak önemli derecede ($P<0.05$) düşük bulundu. Verilen AFB_1'in dozundaki artışa paralel olarak, rölatif bacak kası ve göğüs kası ağırlığında da önemli derecede bir azalma olduğu tespit edildi ($P<0.05$).

Göğüs kası ile bacak kasının enine ve boyuna kesitlerinde çekirdek alanı ile NOR alanının kontrol grubuna göre AFB_1 gruplarında oldukça düştüğü; grupların ortalama NOR sayısı ve nispi NOR alanı arasındaki farkların önemli olmadığı ($P>0.05$) tespit edildi.

Broilerlerde, embriyonik dönemde maruz kaldıkları aflatoksin B1'in kas gelişimini olumsuz yönde etkilemesi bu hayvanların ileriki yaşamlarında iskelet ve kas sistemi hastalıklarına predispoze olabileceklerini, ayrıca önemli oranda ekonomik kayıplara sebep olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: AFB_1; AgNOR; İskelet kası.

7.SUMMARY

Determination of the effects of aflatoxin B_1 given in ovo on the muscle development in broiler chickens by means of histologic methods.

In this study, detrimental effects of aflatoxin B_1 (AFB_1) on the embryonic development of skeletal muscle were determined by means of histological methods.

For this purpose, 420 eggs of Ross parent stocks were used. The eggs were divided into the groups as follows: 1) control, 2) 5 ng AFB_1/egg group, 3) 15 ng AFB_1/egg group, 4) 40 ng AFB_1/egg group. Test solutions were injected via air-sac, just prior to the settlement of the eggs into the incubator. Eggs were maintained under optimal conditions (37.8°C and 65±2% relative humidity) during the whole incubation period. Five eggs from each group were opened on different days of the incubation (11, 13, 17 and 21) and developmental stages of embryos were determined according to the Hamburger-Hamilton scale and embryos were weighed. Muscle tissue samples (musculus fibularis longus and musculus sternocoracoideus pectoralis) were taken and fixed 10 % in buffered-formal saline and immersed in paraffin. The sections were stained with Crossman's trichrome and AgNOR staining methods. Relative embryo weights were calculated and displayed as percentages, through the incubation period. Significance of the differences between mean values of the groups were determined statistically. The results have revealed that mean relative embryo weights of those of the AFB_1 treated groups were significantly ($P<0.05$) lower than control group depending on the AF level in the eggs. Depends on AF levels relative leg muscle and breast muscle weight were also found to decrease significantly ($P <0.05$). Also nucleus area and NOR area of those of the AFB_1 treated groups was lower than control groups. There was no significant difference in NOR numbers and NOR area/nucleus area between the groups ($P >0,05$) amony the treament groups.

It was assumed that in ovo administrated aflatoxin B_1 adversely affected embryonic development of muscle and consequently, the affected animals might be more susceptible to the skeletal and muscle disorders at feding period. This situation might result in serious economic losses.

Key words: AFB_1; AgNOR; skeletal muscle.

8. KAYNAKLAR

1. Ağaçdelen HH and Acet HA. Experimental studies on aflatoxin B_1 and M_1 deposition and clearance times in eggs. Veterinarium. 1993;4.36-43.

2. Aksoy M, Erdem S, Dinçol G, Bakioğlu I, Kutlar A. Aplastic anemia due to chemicals and drugs: a study of 108 patients. Sex Transm Dis. 1984 ;Oct–Dec;11(4 Suppl):347–350.

3. Aldemir C . Aflatoksinlerin yumurta tavuklarının dokularına dağılım düzeyleri ve atılım sürelerinin tespiti üzerine araştırma, Doktora Tezi, S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1992;Konya.

4.Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD. Molecular biology of the cell. Garland Publishing. ; Newyork. London.1989;401-418.

5.Arroyo-Nombela JJ, Rodriguez Murcia C, Abaigar T and Vericad JR. Cytogenetic analysis (GTG, CBG, and NOR bands) of a wild boar population (sus scrofa scrofa) with chromosomal polymorphism in the south-east of spain. Genet Sel.Evol. 1990;12,1-9.

6.Arruga MV. Differences in NOR activity levels of the chromosome pairs in spanish common rabbit. Edited by; Halnan. C.R.E. Wallingford, UK.1989;297-300.

7.Asakura A, Komaki M and Rudnick MA. Muscle satelite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic ,osteogenic and adipogenic differentiation. Diff. 2001;68:245-253.

8.Aydın MF. Yumurta ve Et Tavuklarının Farklı Dokularında Gümüşleme Metoduyla Boyananan Nükleolus Organizer (AgNOR)Bölgelerin Dağılımının Belirlenmesi. Doktora tezi, S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2004; Konya.

9. Batra SK., Kern HF, Worlock AJ, Metzgar RS. and Hollingsworth MA. Transfection of the human Muc1 mucin gene into a poorly differentiated human pancreatic tumor cell line Panc1: integration, expression, and ultrastructural changes. J. Cell Sci, 1991; 100: 841-849.

10.Brand-Saberi B, Gamel AJ, Krenn V, Müller TS, Wilting J, Christ B. N-Cadherin is involved in myoblast migration and muscle differentiation in the avian limb bud. Dev Biol. 1996; 178, 160-173.

11. Brown M.Change in fibre size ,not number, in againg skeletal muscle. Age Ageing, 1987;16,244-248.

12. Burke WH and Henry MH. Characteristics of the Pectoralis superficialis and semimembranosus of Broiler Strain Chickens, Bantam Chickens, and the Reciprocal Crosses 1. Poult. Sci. 1997;76:767–773.

13. Busbee DL, Norman JO and Ziprin RL . Comparative uptake, vascular transport and cellular internalization of aflatoxin B_1 and benzo(a)pyrene, Arch. Toxicol. 1990; 64, 285-290.

14. Campbell NA and Tomenson JA. Canonical variate analysis for several sets of data. Biometrics. 1983; 39, 425-435.

15. Canet V, Montmasson MP, UssonY, Giroud F, Brugal G. Correlation between silverstained nucleolar organizer region area and cell cycle time. Cytometry. 2001; 43:110-11611.

16. Carlson BM. Patten's Foundations of Embryology, Fourth Edition, McGraw-Hill Book Company. 1981; Newyork.

17. Chattopadhyay AB, Bose, A, Chattopadhyay AK. Improvements in grinding steel by cryogenic

cooling. Precis. Eng, Vol. 1985; 7, No. 2, pp 93-98.

18. Cilievici O,Gordos I, Ghidus E and Moldovan A. The toxic and teratogenic effect of aflatoxin B_1 on the chick embryo development. Morphol. Embryol. (Bucur), 1980; 4, 309–314.

19. Cireli E. Genel Histoloji, 5. Baskı, İzmir.1997;251-274.

20. Corrier DE. Mycotoxicosis: Mechanismus of immunosuppression. Veterinary İmmunology and Immunopathology. 1991;30,73-87.

21. Crocker J and Nar P. Nucleolar organiser regions in lymphomas. J Pathol. 1987; 151:111-119.

22. Culling CFA, Allison RT and Barr WT. Cellular pathology technique. Butterworths and Co Ltd, London.1985;652-680.

23. Cukrova V,Longrova E, and Akao M. Effects of aflotokxin B_1 on myelopoies in vivo. Toxicology. 1991;70(2): 203-11.

24.Çelik İ , Demet Ö, Dönmez HH.Boydak M. Dtermination of phagocytic and candidacidal activities of peritoneal macrophages isolated from chikens feed with aflatoxin and an aflatoxin adsorbing agent , polyvinyl polypyrolidone (PVPP) containing feed . Vet. Bil. Derg.1996; 12,145-151.

25.Çelik I, Oguz, H, Demet O, Boydak M, Donmez HH, Sur E, Nizamliogu F. Embryotoxicity assay of aflatoxin produced by Aspergillus parasiticus NRRL 2999 Brit. Poult.Sci. 2000a; 41,401-409.

26.Çelik İ, Oğuz H, Demet Ö, Dönmez HH, Boydak M, Sur E.Efficacy of polyviylpolyprrolidone in reducingth immunotoxicity of aflatoxin in growing broilers. Br.Poult. Sci. 2000b**;**41,430-439.

27.Çobanoğlu F, Konak K, Bozkurt M. Türkiye Etlik Piliç Sektörünün Mevcut Durumu ve Dünya Genelindeki Gelişmeler.Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 2003;16(2),127-133.

28. Dafalla R, Yagi AI and Adam SEI. Experimental aflatoxicosis in hybro type chicks: sequential changes in growth and serum constituents and histopathological changes. Veterinary and Human Toxicology. 1987; *29*, 222-226.

29. Dellmann HD and Eurell JA. Textbook of Veterinary Histology, Fifth Edition, Lippincott Williams &Wilkins, Baltimore, USA.1998;80-90.

30. Demet Ö, Oğuz H, Çelik I and Nizamlioğlu F. Production of aflatoxin on rice. Veteriner Bilimleri Dergisi. 1995;11, 19-23.

31. Dervan P,Gilmartin L, Loftus B and Carney D . Breast carcinoma kinetics: argyrophilic nucleolar organiser region counts correlate with ki-67 scores. Am j Clin Pathol. 1989;92:401-407.

32.Di Berardino D Lioi MB and Iannuzzi L. Identification of nucleolus organizer chromosomes in cattle (bos taurus l.) by sequential silver staining+rba banding. Carylogia,1985 ; 38:95-102.

33.Diener UL and Davis ND. Effects of aflatoxin on young turkeys and broiler chickens. Poult. Sci. 1985, 64, 1678-1684.

34. Dietert RR, Qureshi MA, Nanna UC, and Bloom SE. Embryonic exposure to aflatoxin B_1: Mutagenicity and influence on development and immunity. Environ. Mutagen. **7.** 1985; 715–725.

35. Drews U. Renkli Embriyoloji Atlası, Çeviri editörleri: Aytekin Y, Gürsoy E, Nobel Matbaacılık, 2000**;** İstanbul.

36. Dugyala RP, Kim YP, and Sharma RP. Effects of aflatoxin B1 and T-2 toxin on the granulocyte - macrophage progenitor cells in mouse bone marrow cultures. Immunopharmacol. 1994; 27, 57-65.

37. Ellinger A and Wachtler F. Über eine Methode zur Darstellung des Nucleolus im Licht und Electronmikroskop,Mikroskopie . 1980;36,330-335.

38. Ellis J and Dipaolo. JA.Aflatoxin B1: induction of malformations. Arch. Pathol. 1967; 83:53-57.

39. Ellis WO, Smith JP and Simpson BK . Aflatoxins in food: occurence, biosynthesis, effects on organisms, datection, and methods of control.Critical. Rev. Food Sci. and Nutr.1991;30, 3, 403-439.

40. Erensayın C .Yeni Tavukçuluk Bilimi ,1. Basım, Ankara, Nobel Yayın Dağıtım,2001.

41. Fernandez C, Cobos A ,and Fraga MJ. The effect of fat inclusion on diet digestibility in growing rabbits. J. Anim Sci. 1994; 72: 1508-1515.

42.Fiedler I. Postnatal growth of muscle fibres in pigs. Tagungsber. Akad. Landwirtschaftswissenschaften, Berlin,Germany ,1983;209,87-94.

43.Fischman AD. An Electron Microscope Study Of Myofibril Formation in Embryonic Chick Skeletal Muscle, Cell Biol. 1967;1; 32(3): 557–575.

44.Fowler SP,Campion DR,Marks HL,Reagen JO.An analysis of skelatal muscle response to selection for rapid growth in quail (Coturnix coturnix japonica). Growth 44. 1980;235-225.

45.Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology, Second Edition, W.B. Saunders Company, USA.2001;155-182.

46.Geissler F,and Faustman, EM.Developmental toxicity of aflatoxin B_1 in the rodent embryo in vitro: Contribution of exogenous biotransformation systems to toxicity. Teratology 37. 1988;101–111.

47.Giambrone J J, Partadiredja M , Eidson CS, Kleven SH, and Wyatt RD. Interaction of aflatoxin with infectious bursal disease virus infection in young chickens. Avian Dis. 1978; 22:431–439.

48.Giambrone JJ, Diener UL, Davıs ND, Panangala YS, and Noerr FJ. Effects of aflatoxin on young turkeys and broiler chickens. Poultry Science. 1985b ;64, 1678-1684.

49.Giambrone JJ, Diener UL, Davi ND, Panangala VS, and Hoerr FJ . Effect of purified aflatoxin on turkeys, Poult. Sci. 1985c,64, 859-865.

50.Giri DD, Nottingham JF, Lawry J, Dundas SAC and Underwood JCE. Silver- binding nucleolar organizer regions (AGNORs) in benign and malignant breast lesions: correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. Journal of Pathology. 1989;157;307-313.

51.Goodpastura C, Bloom SE, Hsu TC, and Arrighi FE. Human Nucleolus Organizers:The Satellites or the Stalks?Am. J. Hum. Genet. 1976; 28:559-566.

52.Gradelet S, Le Bon AM, Berges R, Suschetet M and Astorg P. Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B_1- induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: role of the modulation of aflatoxin B1 metabolism.Carcinogenesis .1998;19(3):403-411.

53. Gürler Ş, Poyraz Ö, Orman MN. Ticari koşullarda üretilen etçi piliçlerde mevsim ve yörenin verim özellikleri üzerine etkileri. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2004; 51,143-150.

54. Habermann FA, Cremer M, Walter J, Kreth G, Von Hasse J, Bauer K, Weinberg J, Cremer C,

Cremer T, Solovei I. Arrangements of macro- and micro chromosomes in chicken cells. Chromosome Research, 2001;9:569-584.

55. Hagashi K and Ozawa E. Vital labeling of somite-derived myogenic cells in the chicken limb bud. Roux's Arch. Dev. Biol. 1991; 200, 188-192.

56. Hall P, Crocker J, Watts A, and Stansfeld A .A comparison of nucleolar organiser region staining and ki-67 immuno staining in non-hodgkins lymphoma. Histopathology. 1988;12: 373-381.

57. Hamburger V and Hamilton HL . A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morphol. 1951;88,1,49-92.

58. Hamilton PB, Huff WE, Harris JR and Wyatt RD. Natural occurrence of ochratoxicosis in poultry. Poul. Sci. 1982; 61:1832-1841.

59.Hansen KM. The Karyotype of the domestic sheep (ovis aries) ıdentified by quinacrine mustard staining and fluorescense microscopy. Hereditas,1973; 75:233-240.

60. Harvey RB, Phillips TD, Ellis JA , Kubena LF , Huff WE and Peterson HD . Effects on aflatoxin M_1 residues in milk by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to aflatoxin-contaminated diets of dairy cows, Am. J. Vet. Res.1991;52(9), 1556-1559.

61. Hatch RC .Poison causing abdominal distress of liver or kidney damage , In "Veterinary Pharmacology and Therapeutics" Eds. By NH Both and Le McDonald, Sixth edition, The Iowa State University Press,1988;1102-1125.

62. Hassa O, Aştı RN . Embriyoloji, 3. Baskı, Yorum Matbaacılık Sanayii, Ankara,1997;98-135.

63. Haworth SR, Lawlor TE, Zeiger E, Lee LS and Park DL. Mutagenic potential of ammonia-related aflatoxin reaction products in a model system, JAOCS.1989; 66, 1, 102-104.

64.Henderson AS, Warburton D and Atwood KC. Ribosomal DNA connectives between human acrocentric chromosomes. Nature,1973; 245, 14, 95-97.

65.Henderson KM and Bruere AN. Association of nucleolus organizer chromosomes in domestic sheep (ovis aries) shown by silver staining. Cytogenet. Cell Genet, 1977;19: 326-334.

66.Henderson LM and Bruere AN. Nucleolus organizer region location and 'ring' chromosomes in the bharal. Experientia.1980; 36:176-178.

67. Henry MH and Burke WH. Sexual dimorphism in broiler chick embryos and embryonic muscle development in late ıncubation. Poultry Science , 1998;77:728-736.

68.Howard- Peebles PN und Howell WM. Nucleolus Organisator Regionen der Eckzahn Karyotyp. 1. Cytogenet . Cell Genet .1983; 35:293-294 .

69. Howat AJ,Gili DD, Cotton DWK, and Slater DN. Nucleolar organiser regions in spitz nevi and malignant melanomas. Cancer. 1989; 63:474-478.

70. Hoyo E, Kanitakis J, Euvrard S, and Thivolet J.Proliferiation characteristic of cutaneous sqoamaus cell carcinomas developing in organ graft recipients. Arch Dermatol. 1993;129:324-327.

71. Hsieh DPH, Wong ZA, Wong JJ, Michas C and Rueber BH. Comparative Metabolism of Aflatoxin in:Mycotoxin in Human and Animal Health, Pathotox Publ, Inc, Pork Forest South, Illinois. 1977;pp: 37-50.

72.Hubbell HR, Rothblum LI, and Hsu TC.Identification of a silver binding protein association with the cytological silver staining of actively transcribing nucleolar regions. Cell Biol Int Rep. 1979;3:615-622.

73. Huff WE,KubenaRB, HarveyRH, Corrier DE, and Mollenhaur HH.Progression of aflatoxicosis in broiler chickens. Poult. Sci. 1986;65:1891-1899.

74. Huff WE, Harvey RB , Kubena LF, and Rottinghaus GE . Toxic synergism between aflatoxin and T-2 toxin in broiler chicken, Poult. Sci.1988;67, 1418-1420.

75.IARC. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines, and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 56. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 1993;571 pp.

76. Iwaki T, Kume-Iwaki A,Goldman JE. Cellular distribution of alpha B-Crystallin in non-lentcular tissues. J Histochem Cytochem .1990; 38, 31-9.

77. Jacobson WC, and Wiseman HG. The transmission of aflatoxin B, into eggs. Poult. Sci. 1974; 53:1743-1745.

78. Jeffery FH, Morton JG and Miller JK . Effects of some clinically significant mycotoxins on The incorporation of DNA, RNA and protein precursors in cultured mammalian cells, Res. Vet. Sci. 1984;37, 30-38.

79.Jelinek R, Peterka M and Rychter Z . Chick embryotoxicity screening test-130 substances tested, Indian J. Exp. Biol,1985;23, 588-595.

80. Jordan EG. The nucleolus at Weimer,Nature, 1979;281:529-530.

81. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji, Çeviri Editörleri: Aytekin Y, Solakoğlu S, Nobel Matbaacılık, İstanbul. 2006.

82. Kacerovska H, Likovsky Z and Smetana K . Nucleolar silver stained granules in rat yoshida sarcoma cells after rna synthesis inhibition. Neoplasma. 1981; 28:513-516.

83.Karahan M. Ve Erol B. Çocukluk ve ergenlik döneminde kas ve tendon yaralanmaları.Acta Orthop. Traumatol . Turc. 2004;1:37-46.

84. Kardon G. Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb .Development . 1998;125, 4019-4032.

85. Kaya S. Süt yemi ve çiğ sütte aflatoksin kalıntılarının kromatografik yöntem ile araştırılması, AÜ Vet.Fak Derg. 1982; 29(3-4), 443-457.

86.Kaya S, Yavuz H ,ve Akar F . Bazı yağlı tohum küspelerinde mikotoksin kalıntıları, A.Ü. Vet. Fak. Derg,1990;37, 173-180.

87.Kaya S .Mikotoksinler ve mikotoksin zehirlenmeleri, Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji, Eds. S.Kaya, İ.Pirinçci ve A.Bilgili, Medisan Yayınevi, Ankara,1998;35, 348-354.

88.Keçeci T, Demet Ö, Oğuz H. Single and combination effets of dietary aflatoxin and adsorbent (Mycofix Plus) on some hematological and serum biochemical paremeters of broiler chikens. J.Vet.Sci. 1995;11,95-101.

89.Kemper FH and Luepke NP . Toxicity testing by the hen's egg test (HET), Fd. Chem. Toxic. 1986; 24(6-7), 647-648.

90. Kikuchi, T. Studies on development and differentiation of muscle III. Especially on the mode of increase in the number of muscle cells. Tohoku J. Agric. Res.1971;22:1–15.

91. Klasing, KC, Calvert CC and Jarrell VL. Growth characterises, protein synthesis, and protein degradation in muscles from fast and slow-growing chicks. Poult. Sci. 66. 1987; 1189-1196.

92. Knibiehler B, Mirre C and Rosset R. Nucleolar organizer structure and activity in a nucleolus without fibrillar centers: The nucleolus in an estabilshed Drosophila cell line. J Cell Sci. 1982;57:351-364.

93.Kopp E, Mayr B, Czaker R and Schieger W. Nucleolus organizer regions in the chromosomes of the domestic horse. J Heredity,1981; 72: 357-358.

94. Kopp E, Mayr B, Kalat M and Schleger W. Polymorphisms of NORs and heterochromatin in the horse and donkey. J Heredity,1988; 79: 332-337.

95.Kubena LF, Harvey RB, Bailey RH, Buckley SA, and Rottinghaus GE. Effects of hydrated sodium Calcium aluminosilicate (T- Bind TM) on my cotoxicosis in young broile chickens. Poultry Science. 1998; 77, 1502-1509.

96.Kurihara Y, Suh DS, Suzuki H and Moriwaki K. Chromosomal locations of ag-nors and clusters of ribosomal DNA in laboratory strains of mice. Mammalian –Genoma, 1994;5, 4, 225-228.

97. Larson DE, Zahradka P, and Sells BH. Control points in eukaryotic ribosome biogenesis. Biochem.Cell Biol. 1991; 69:5022.

98.Latshaw WK . Veterinary Developmental Anatomy, Toronto, Philadelphia.1987;184-204.

99.Leek RD, Alison MR, Sarraf CE. Variations in the occurrence of silver – staining nucleolar Organizer regions (AgNORs) in non -proliferating and proliferating tissues. J Pathol. Sep. 1991;165(1):43-51.

100.Leeson S, Diaz G and Sumers JD . Aflatoxins, In "Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins", Eds. by S Leeson, JDG Gonzala and JD Summers, Published by: University Books,Guelph, Ontario, Canada.1995; 249-298, PO Box 1326.

101.Manuelidis L.Active nucleolus organiser regions are precisely positioned in adult central nervous system cell but not in neuroectodermal tumour cells. Journal of Neuropathol and Exp Neurol. 1984;43(3):225-241.

102.Masabanda JS, Burt DW, O'Brien PCM, Vignal A, Fillon V, Walsh PS, Cox H, Tenpest HG, Smith J, Habrmann F, Schimid M, Matsuda Y, Ferguson-Smith MA, Crooijmans RPMA, Groenen MAM, Griffin DK. Molecular cytogenetic definition of the chicken genome: The first complete avian karyotrpe. Genetics. 2004; 166;1367-1373.

103. Mauro A. Satellite cells of skeletal muscle fibres. J. Biophys. Biochem. Cyto.1961;9: 493-495.

104.Mayr B, Schleger W and Auer H. Frequency of ag-stained nücleolus organizer regions in the chromosomes of cattle. The J Heredity,1987; 78:206-207.

105. Mayura K, Abdel-Wahhab MA, Mckenzie KS, Sarr AB. Edwards JF, Naguib K, and Phillips TD. Prevention of maternal and developmental toxicity in rats via inclusion of common aflotoxin sorbents: potential for hidden risk. Toxicological Sciences. 1998;41,175-182.

106.Mc Loughin ME, Pier AC and Thurston JR. Use of bacteria and yeast to identify T lymphocytes in peripheral blood and lymphoid tissues of healty guinea pigs and guinea pigs fed aflatoxin, Am. J. Vet. Res.1984; 45(9), 1795-1799.

107.Mikelsaar AV,Schmid M, Krone W, Schwarzacher HG, and Schnedl W. Frequency of Ag-stained nucleolus organizer regions in the acrocentric chromosomes of man hum Genet. 1977; 37:73-77.

108.Miller DM, Clark JD, Hatch RC and Jain AV . Caprine aflatoxicosis: Serum electrophoresis and pathologic change, Am. J. Vet. Res.1984;45(6), 1136-1141.

109. Miller M M, Goto R M, Taylor R LR, Auftray C,Briles R W, Briles W E, Bloom SE .Assignment of Rfp-y to the chicken major histocompatibility complex/NOR micro chromosome and evidence for high frequency recombination associated with the nucleolar organiser region. Procc Natl Acad Sci USA, 1996;93:3958-3962.

110. Mohiuddin SM, Reddy MV, Reddy MM, and Ramakrishna K .Studies on phagocytic activity and haematological changes in aflatoxicosis in poultry, Indian Vet. J,1986;63, 442-445.

111. Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi, Editörler: Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H , 6. Baskı,Nobel Matbaacılık, İstanbul, 2002;425-433.

112. Moore DT, Ferket PR, Mozdziak PE.Muscle Development in the late embryonic and early post-hatch poult,ınternational journal of Poultry Science, 2005;4 (3):138-142.

113.Neldon-Ortiz DL and Qureshi MA.The effects of direct and microsomal activated aflatoxin B, on chicken peritoneal macrophages in vitra. Veterinary Immynology and Immunopatholagy. 1992a; 31, 61-76.

114.Nimmo MA,Snow DH. The effect of ageing on skeletal muscle fibre characteristic in two inbred strains of mice. J.Physiol. 1983;40,24-25.

115. Nizamlıoğlu F . Mikotoksin şüphesiyle laboratuara getirilen yem ve yem hammaddelerinde aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 araştırılması, Veterinarium. 1996;7, 42-45.

116. Ochs R, Lischwe M,O'Leary P,and Busch H.Localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23 during mitosis. Exp Cell Res. 1983;146:139-149.

117.Oğuz H . Broyler yemlerine katılan polivinilpolipirolidon (PVPP)'un ve diğer bazı adsorbanlarla karışımlarının aflatoksikozise karşı koruyucu etkinliklerinin belirlenmesi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya. 1997.

118.Oğuz H and Kurtoglu V. Effect of clinoptiloite on performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. Br. Poult. Sci. 2000;41, 512-517.

119.Oğuz H, Keçeci T, Birdane YO, Önder F , Kurtoğlu V. Effect of clinoptilolite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during aflaxicosis. Res. Vet. Sci.2000a;69,89-93.

120.Oğuz H, Kurtoğlu V ve Coşkun B . Preventive efficacy of clinoptilolite in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) exposure. Res. Vet.2000b;Sci., 69, 197-201.

121.Oliveira CC, Bicudo H E. M.C and Gaspar JO. Study of alterations in the polytene chromosomes and nucleoli in Drosophila saltans salivary glands related to programmed cell death using transmission electron microscopy. Revista de Iniciação Científica. São Paulo, v. 2, p. 2000; 15-20.

122.Öznurlu Y, ve Çelik İ. "Yumurtaya verilen aflatoksin B1'in etçi piliçlerde tibianın proksimal büyüme plağının embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi" Veteriner Bilimleri Dergisi. 2004; 20, 4, 99-108.

123.Paker Ş. Histoloji, Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa,1990;169-220.

124.Papstein HJ, Losand B, Gabel M, Fiedler I, Ender K. Wachstums - untersuchungen an Fleischrindbullen und -färsen aus Zwillings geburten bei hohem Ernährungsniveau. 2.

Mitteilung: Wachstumsverlauf, Fleischbeschaffenheit und Muskelstruktur. Züchtungskunde. 1999; 71: 267-276.

125.Pas MFV, Everts ME, Haagsman HP . Muscle development of livestock animals: Physiology, Genetics, and Meat quality. Cambbridge, MA, USA: CABI Publishing. 2004;1-79.

126.Pathak S. Cytogenetic research techniques in humans and laboratory animals that can be applied most profibitably to livestock. JDairy Sci,1979; 62:836-843.

127.Pin CL, Merrifield PA. Regionalised expression of myosin isoforms in heterotypic myotubes formed from embryonic and fetal rat myoblasis in vitro. Dev. Dynamics,1997;208:420-431.

128.Pischinger A. Die lage des isoelektrischen punktes histologischer elemente als ursache ihrer verschiedenen färbbarkeit. Z Zellforsch Mikrosk Anat, 1926;3, 167-197.

129.Ploton D, Menager M, Jeanesson P, Himber G, Pigeon F and Adnet JJ. Improvement in the staining and in the visualisation of the argyrophilic proteins of the nucleolus organiser region at the optical level. Histochem J,1986; 18: 5-14.

130.Prelusky DB, Hamilton RMG, Foster BC, Trenholm HL and Thompson BK . Optimization of chick embryotoxicity bioassay for testing toxicity potential of fungal metabolites, J. Assoc. off Chem. 1987;70(6), 1049-1055.

131. Qureshi MA, Brake J, Hamilton PB , Hagler WM, Nesheim Jr, and S. Dietary exposure of Broiler breeders to aflatoxin results in immune dysfunction in progeny chicks .Poult Sci. 1998;77: 812-819.

132.Ram KV, Rao DG and Rao PR .Sequential gross and histological changes of bursa and thymus in acute and chronic experimental aflatoxicosis of broiler birds, Indian J. Anim. Sci. 1988;58(9), 1011-1018.

133.Rao KS and Gehring PJ . Acute toxicity of aflatoxin B_1 in monkeys, Toxicol. Appl. Pharmacol. 1971; 19, 169-175.

134. Raska I, Rychter Z and Smetana K . Fibrillar centres and condensed nucleolar chromatin in resting and stimulated human lymphocytes. Z Mikrosk Anat Forsch, Leipzig. 1983;97(1):15-32.

135.Reddy RV, Taylor MJ and Sharma RP .Studies of immune function of CD-1 mice exposed to aflatoxin B_1 , Toxicol. 1987; 43, 123-132.

136.Reddy RV, and Sharma RP. Effects of aflatoxin B1 on murine lymphocytic functions. Toxicology. 1989; 54:31-44.

137.Rehfeldt C, Fiedler I, Dietl G, Ender K.Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selction. Livestock Production Science. 2000; 66 ,177-188.

138.Remignon H,Gardahaut MF,Marche G, Ricard FH. Selection for rapid growth increases the number and the size of muscle fibres without changing their typing in chickens. J. Muscle Res .Cell. Motil. 1995;16,95-102.

139.Rose KM, Szopa J, Han F, Cheng Y, Richter A and Scheer U .Association of DNA Topoisomerase I and RNA polymerase I: A possible role for topoisomerase I in ribosomal gene transcription. Chromosoma. 1988;96:411-416.

140.Sağlam M, Aştı RN, Özer A .Genel Histoloji, 5. Baskı, Yorum Matbaacılık Sanayi, Ankara.1997;239-274.

141.Sahoo PK, Chattopadhyay SK, Johrp TS, Charan K , and Sikdar A . Pathology of experimental aflatoxicosis in rabbits, Indian J. Anim. Sci.1993;63(3), 268-273.

142.Samarajeewa U, Sen AC, Cohen MD and Wei CI . Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods, J. of Food Prot.1990;53,6,489-501.

143.Schell TC, Lindeman MD, Kornegay ET, Blodgett DJ .Effects of feding aflatoxin-contaminated diets with and without clay to weanling and growing pigs on performance , liver function and mineral metabolism, J. Anim. Sci. 1993;71, 1209-1218.

144.Scheuermann G N,Bilgili 1 S F, Tuzun S, and Mulvaney D R. Comparison of Chicken Genotypes: Myofiber Number in Pectoralis Muscle and Myostatin. Poult. Sci. 2004;83: 1404–1412.

145.Schmid M, Loser C, Schmidtke J, Engel W. Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organisers during spermatogenesis in vertebrates. Chromosoma, 1982;86(2):149-79.

146.Schultz E and McCormick **K**.M. Skelatal muscle satellite cells.Rev.Phys. Biochem. Pharm. 1994;23:213-57.

147.Schwarzacher HG and Wachtler F .The Nucleolus. Anat Embryol, 1993; 188:515-536.

148.Slowik J, Graczyk S and Madej JA . The effect of a single dose of aflatoxin B_1 on the value of nucleolar index of blood lymphocytes and on histological changes in the liver, bursa Fabricii, suprarenal glands and spleen in ducklings, Folia Histochem. Cytobiol. 1985;23(1-2), 71-80.

149.Smith JH. Relation of bady size to muscle cell size and number in the chicken.Poult.Sci. 1963;42,283-290.

150.Smith R, and Crocker J.Evaluation of nucleolar region-associated proteins in breast malignancy. Histopathology. 1988; 12:113-125.

151.Stewart RG, Skeeles JK., Wyatt RD, Brown J, Page RK., Russel ID and Lukert PD.The effect of aflotoxin on complement activity in broiler chickens. Poultry Science. 1985; 64, 616-619.

152.Stickland NC, and Handel SE. The numbers and types of muscle fibres in large and small breeds of pigs. J.Anat. 1986;147:181.

153.Stoloff L, Verret MJ, Dantzman J, and Reynaldo EF .Toxicological study of aflatoxin P_1 using the fertile chicken egg, Toxicol. Appl. Pharmacol. 1972; 23, 528-531.

154.Stubblefield RD, Pier AC, Richard JL, and Shotwell OL . Fate of aflatoxins in tissues, fluids and excrements from cows dosed orally with aflatoxin B_1 , Am. J. Vet. Res.1983;44(9), 1750-1752.

155. Su MH, and Delany ME. Ribosomal RNA gene copy number and nucleolar size polymorphisms within and among chicken lines selected for enhanced growth. Poult Sci. 1998;77(12):1748-1754.

156.Sudhakar BV. The carry – over effect of aflatoxin B, into eggs and liver of chicken. Indian Veterinary Journel. 1992; 69, 1061-1062.

157.Suliman HB, Mohammed AF, Awadelsied NA and Shommein AM. Acute mycotoxicosis in sheep: Field cases, Vet. Hum. Toxicol.1987; 29(3), 241-243.

158.Sur E . Yumurtaya verilen Aflatoksin B1' in tavukların lenfoid organlarının embriyonal gelişimi üzerindeki etkilerinin enzim histokimyasal yöntemlerle araştırılması, Doktora Tezi, S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya,2001.

159.Sur E ve Çelik İ . Effects of aflatoksin B1 on the development of bursa of Fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken, Br. Poult. Sci. 2003; 44, 4, 558-566.

160.Swartz D, Lim SS, Fassel T, and Valliere CR. Mechanisms of myofibril assembly. Proc. Reciprocal Meat Conf. 1994;47:141–153.

161.Şanlı Y . Mikotoksinler, Özel Toksikoloji Kitabı, Ed. Sezai Kaya, 1995;283-328.

162.Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı .Aflatoksin kontrolüne dair tebliğ, Resmi Gazete, 16 Kasım 1997 tarihli mükerrer yazı.

163.Thaxton, JP, Tung HT, and Hamilton PB. Immunosuppression in chickens by aflatoxin. Poultry Science, 1974;53, 721-725.

164.Thomas J, Milward D, Ouzounis C, Pulman S, Carroll M . Automatic extraction of protein interactions from scientific abstracts. Pac Symp Biocomput. 2000;502–513.

165.Trucksess MW, Stoloff L, Young K, Wyatt RDand Miller BL. Aflatoxical and aflatoxins B_1 and M_1 in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin contaminated feed. Poult. Sci. 1983**;**62:2176-2182.

166.Tuncer N . Ankara çevresinde üretilen yumurta örneklerinde aflatoksin rezidülerinin araştırılması, Etlik Vet. Mik. Derg. 1987;6(1), 101-116.

167.Underwood J and Giri D.Nucleolar organiser regions as diagnostic discriminants for malignancy. J Pathol. 1988; 155:95-96.

168.Velleman S G. Muscle Development in the Embryo and Hatchling1. Poultry Science . 2007; 86:1050–1054.

169.Wegner J, Albrecht E, Fieldler I, Teuscher F, Papstein HJ, Ender K..Growth and breed-related changes of muscle fibre characteristik in cattle. J. Anim. Sci. 2000**;**78,1485-1496.

170.Wigmore PM,Dunglison GF.The generation of fiber diversity during myogenesis , Int.J.Dev.Biol. 1998;42:117-125.

171.Yenice E. Broilerlerin performansı üzerine seçmeli yemlemenin etkisi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü , Doktora Tezi, 2004.

172.Zaczek M, Maciejowski J, Gil K, Szot W, Chlap Z. Silver-binding nucleolar organiser regions (AgNORs) in the normal epithelium of different parts of the digestive tract in rats. Acta Pathol Jpn. 1992; 42(8):573-578.

9. ÖZGEÇMİŞ

Nimet Gündüz 1972 'de Fethiye'de doğdu. İlkokul eğitimini Fethiye'de, orta ve lise eğitimini İzmir'de, lisans eğitimini Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği'nde 1995'de tamamladı ve aynı yıl biyoloji öğretmeni olarak göreve başladı. Hâlen M.E.B'e bağlı bir lisede biyoloji öğretmeni olarak çalışmakta, evli ve bir çocuk sahibi.