

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

**KULUÇKALIK YUMURTA İÇİ (İN OVO) LEPTİN ENJEKSİYONUNUN
ETLİK PİLİÇ EMBRİYOLARININ GELİŞİMLERİ VE FİZYOLOJİK
PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Bülent CELLAK
DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Elif BABACANOĞLU

VAN-2018

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

**KULUÇKALIK YUMURTA İÇİ (IN OVO) LEPTİN ENJEKSİYONUNUN
ETLİK PİLİÇ EMBRİYOLARININ GELİŞİMLERİ VE FİZYOLOJİK
PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Bülent CELLAK

Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından
6576 No'lu proje olarak desteklenmiştir

VAN-2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

Zootekni Anabilim Dalı'nda Dr. Öğretim üyesi Elif BABACANOĞLU danışmanlığında, Bülent CELLAK tarafından sunulan “Kuluçkalık Yumurta İçi (In Ovo) Leptin Enjeksiyonunun Etlik Piliç Embriyolarının Gelişimleri Ve Fizyolojik Parametreleri Üzerine Etkisi..” isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 15./10/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile başarılı bulunmuş ve Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:.....

İmza:

Üye:.....

İmza:

Üye:.....

İmza:

Üye:.....

İmza:

Üye:.....

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../..... tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza

.....
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Bülent CELLAK



ÖZET

KULUÇKALIK YUMURTA İÇİ (İN OVO) LEPTİN ENJEKSİYONUNUN ETLİK PİLİÇ EMBRİYOLARININ GELİŞİMLERİ VE FİZYOLOJİK PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

CELLAK, Bülent
Yüksek Lisans Tezi, Zootekni Anabilim Dalı
Tez Danışmanı :Dr.Öğr.ÜyesiElif BABACANOĞLU
Ekim 2018, 93 sayfa

Bu çalışma,in ovo (IO) leptin enjeksiyonunun etlik embriyo/civciv gelişimi ve fizyolojik parametreler üzerindeki etkisini incelemeyi amaçlamıştır. Bu amaçla, toplam 425 adet kuluçkalık yumurta etlik damızlıklardan elde edilmiştir. Kuluçkadan önce, 25 adet yumurtanın kalite özellikleri saptandıktan sonra geriye kalan 400 yumurta her bir grupta 100 adet olacak şekilde 4 tekerrürlü olarak enjeksiyon yapılmayan kontrol grubu (K) ve 3 enjeksiyon grubu; 100 µl fosfat buffer solüsyon grubu (PBS); 0.5 µl leptin +100 µl PBS (L_{0.5})ve 1 µl leptin +100 µl PBS (L₁) oluşturularak 37.8 °C ve % 65 nem koşullarında kuluçkalanmıştır. Saf leptin hormonu (Rat leptin-Sigma-Aldrich, USA)PBS'de çözülürerek kuluçkanın 7.gününde embriyonun sarı kesesine IO yöntem aracılığı ile enjekte edilmiştir. Sarı kese leptin düzeyi, kabuk sıcaklığı, su kaybı, rektal sıcaklık, serum triiodotronin (T₃), tiroksin (T₄), kreatin kinaz, toplam protein, ürik asit ve lipid profili ile morfolojik özellikler, oransal asimetri, embriyo ve civciv gelişimi ile birlikte performans değerleri ölçülmüştür.Kabuk sıcaklığı L_{0.5} grubuna ait kuluçkanın 7.gününde arttığı, en yüksek sarı kese leptin düzeyinin kuluçkanın 7. gününde olduğu, kan serumlipid,T₃, T₄, kreatin kinaz, ürik asit düzeyleri ve embriyo civciv gelişimi ile korku davranışı üzerine IO uygulamanın etkisinin önemsiz olduğu saptanmıştır. İncik uzunluğunun oransal asimetri değeri IO leptin uygulaması ile artarken, yem tüketimi düşmüştür.Bu çalışma, IO leptin uygulamasının embriyo/civciv gelişimini etkilemeksizin embriyo metabolizmasını ve çıkıştan sonra erkek etlik civcivlerin kolesterol metabolizmasını etkilediğini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: Embriyo gelişimi, Etlik piliç, In ovo, Leptin, Sarı kese,

ABSTRACT

THE EFFECTS OF IN OVO LEPTIN INJECTION INTO HATCHING EGGS ON EMBRYO DEVELOPMENT AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS IN BROILERS

CELLAK Bülent

M.Sc., Thesis

Supervisor : Assist.Prof.Dr. Elif BABACANOĞLU

October, 2018, 93 pages

The study aimed to investigate effect of in ovo (IO) leptin injection on development and physiological parameters of broiler embryo/chicks. A total of 425 eggs obtained from Broiler Breeders were used. At onset of incubation, egg quality traits were measured on 25 eggs. The rest of eggs were weighed and placed in incubator as 100 eggs/ 4 replication /group which was incubated at 37.8 °C and 65 % relative humidity. The non-injected group (C); 3 injected groups; 100 µl of phosphate buffer solution (PBS) group; 0.5 µl leptin in 100 µl of PBS (L_{0.5}) group; 1 µl leptin in 100 µl of PBS (L₁) group. The pure leptin hormone (Rat leptin-Sigma-Aldrich, USA) dissolved in PBS was injected to yolk sac of embryo at day 7 of incubation. Yolk sac leptin level, eggshell temperature, egg water loss, rectal temperature, thyroxine (T₄), triiodothyronine (T₃), creatin kinaz, total protein, uric acid and lipid profiles in blood serum, morphological traits, relative asymmetry, embryo/chick development, and performance were determined. Eggshell temperature increased in L_{0.5} group at day 7 of incubation. The highest yolk sac leptin level was at day 7 of incubation. Egg water loss, serum T₄, T₃, creatin kinaz, uric acid, lipid profiles, embryo/chick development, fear behaviour did not change with IO leptin. Relative asymmetry of shank and feed intake increased in IO leptin groups. The results showed that IO leptin administration could affect embryo metabolism and cholesterol metabolism of male chicks at early post-hatch period without effect on embryo/chick development.

Key words: Broiler, Embryo development, In ovo, Leptin, Yolk sac,



ÖN SÖZ

Bu tez çalışmasında, her türlü ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Dr. Öğretim Üyesi Elif BABACANOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

2018

Bülent CELLAK





İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	5
2.1. Leptin Hormonu	5
2.2. Leptin Hormonunun Biyolojik Reseptörleri ve Geni	6
2.3. Leptin Hormonunun Salınımı	7
2.4. Yaş ve Leptin Hormonu Arasındaki İlişki	8
2.5. Leptin Hormonunun Etkileri	8
2.5.1. İştah üzerine etkileri	8
2.5.2. Büyüme ve gelişme üzerine etkisi	9
2.5.3. Üreme üzerine etkisi	10
2.5.4. Metabolik parametreler üzerine etkileri	10
2.5.5. Performans üzerine etkisi	11
2.5.6. Davranış üzerine etkisi	11
2.5.7. Hormonlar üzerinde etkisi	12
2.5.7.1. İnsülin	12
2.5.7.2. Diğer hormonlar	12
2.5.8. Diğer etkileri	13
2.6. IO Yöntem	13
2.6.1. IO leptin uygulamaları	16
2.6.2. IO enjeksiyon dışındaki diğer leptin uygulamaları	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Denemede Kullanılan Materyaller	21

	Sayfa
3.1.1. Yumurta ve civciv materyali,	21
3.1.2. Kuluçkahanede ve büyütme kümesinde kullanılan materyaller	21
3.1.2.1. Kuluçka makinası.....	21
3.1.3. Kimyasal Materyaller	23
3.1.3.1. Fosfat tampon çözeltisi (PBS)	23
3.1.3.2. Saf leptin hormonu	23
3.1.4. Yem materyali	24
3.2.Yöntem.....	24
3.2.1. Deneme deseni	24
3.2.2. Ölçülen parametreler	25
3.2.2.1. Yumurta kalite özellikleri	25
3.2.2.2. Yumurta kabuk sıcaklığı.....	27
3.2.2.3. In ovo yöntemin uygulanması	27
3.2.2.4. Morfolojik özellikler ve oransal asimetri	28
3.2.2.5. Embriyo, sarı kese ve organ ağırlıkları	29
3.2.2.6. Yumurtada su kaybı.....	30
3.2.2.7. Kuluçka sonuçları	30
3.2.2.8. Rektal sıcaklık	30
3.2.2.9. Etlik civciv performansı	31
3.2.2.10. Hareketsiz kalma süresi	31
3.2.2.11. Kan serum biyokimyasal analizleri	32
3.2.2.12. ELİSA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntem	33
3.2.2.12.1. Sarı ve sarı kese ekstraktlarının hazırlanması	33
3.2.2.12.2. Kan serumu ve sarı/sarı kese örneklerinde leptin hormon düzeyinin ELİSA yöntemine göre analizi	33
3.2.3. İstatistik analiz	34
4. BULGULAR	35
4.1. Yumurta Kalite Özellikleri	35
4.2. Yumurta Kabuk Sıcaklıkları ve Rektal sıcaklık	35
4.3. Yumurta Sarısı ve Sarı Kese Leptin Düzeyi.....	36

	Sayfa
4.4. Serum Leptin ve Biyokimyasal Parametre Düzeyleri	37
4.5. Morfolojik Özellikler ve Oransal Asimetri	42
4.6. Organ Gelişimi	49
4.7. Kuluçka Süresi	51
4.8. Kuluçka Sonuçları	52
4.9. Performans.....	53
4.10. Hareketsiz Kalma Süresi	54
TARTIŞMA VE SONUÇ	55
KAYNAKLAR	61
ÖZ GEÇMİŞ	69



ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Kuluçka boyunca kuluçkahane ortamına ait oransal nem, sıcaklık ve basınç değerlerine ait ortalamalar	21
Çizelge 3.2. Kuluçka boyunca kuluçka makinasının oransal nem, sıcaklık ve basınç değerlerine ait ortalama ölçüm değerleri.....	22
Çizelge 3.3. Etlik civciv başlangıç yemine ait besin madde değerleri	24
Çizelge 4.1. IO uygulamasının yumurta sıcaklığı ve çıkışta günlük civcivlerin rektal sıcaklıkları üzerine etkisi ait ortalama ve standart hatalar	35
Çizelge 4.2. IO uygulaması ve yaşın sarı ve sarı kese leptin düzeyine etkisine ait ortalama ve standart hatalar.....	36
Çizelge 4.3. IO enjeksiyon uygulama ve yaş arasındaki interaksiyonun sarı kese leptin düzeyine etkisine ait ortalamala ve standart hatalar.....	37
Çizelge 4.4. IO uygulaması veya yaşın serum leptin, trigliserid, kolesterol, HDL, LDL, VLDL düzeylerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar	39
Çizelge 4.4. IO uygulaması veya yaşın serum leptin, trigliserid, kolesterol, HDL, LDL, VLDL düzeylerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar (devam).....	39
Çizelge 4.5. IO uygulaması ve yaşın serum ürik asit, keratin kinaz, toplam protein, T ₃ ve T ₄ düzeylerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar	41
Çizelge 4.6. IO uygulaması ve yaşın embriyo uzunluğu, kafa çapı, gaga, sağ yüz, sol yüz üzerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar.....	43
Çizelge 4.7. IO uygulama ve yaşın sağ parmak, sol parmak, sağ incik, sol incik üzerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar	45
Çizelge 4.8. IO uygulama ve yaşın orta parmak ve incik uzunluğunun oransal asimetri değeri ve ortalama asimetri değeri üzerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar	48
Çizelge 4.9. IO uygulamanın embriyo/civciv ve organ gelişimi üzerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar	50

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.9. IO uygulamanın embriyo/civciv ve organ gelişimi üzerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar (devam)	51
Çizelge 4.10. IO uygulama ve yaşın ve yumurta ağırlığı, kabuğu delme ve çıkış zamanına etkileri ortalama ve standart hatalar	52
Çizelge 4.11. IO uygulama ve yaşın kuluçkanın 19. gününde yumurta su kaybı döllülük oranı, kuluçka randımanı, çıkış gücü, erken ölüm, orta ölüm, geç ölüm, kabuk altı değerlerine ait ortalama ve standart hatalar.....	52
Çizelge 4.11. IO uygulama ve yaşın kuluçkanın 19. gününde yumurta su kaybı döllülük oranı, kuluçka randımanı, çıkış gücü, erken ölüm, orta ölüm, geçölüm, kabuk altı değerlerine ait ortalama ve standart hatalar (devam)	53
Çizelge 4.12. IO uygulaması ve yaşın performans değerlerine ait ortalamalar.....	53
Çizelge 4.12. IO uygulaması ve yaşın performans değerlerine ait ortalamaları (devamı)	54
Çizelge 4.13. IO uygulamasıhareketsiz kalma süresi üzerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar	54

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Leptinin organizmada sinyal yolları	7
Şekil 2.2. IO enjeksiyon uygulanabilirliği	14
Şekil 2.3. Birden çok başlıklı IO enjeksiyonu	14
Şekil 2.4. IO enjeksiyon siteleri.....	16
Şekil 3.1. Saf leptin hormonu	23
Şekil 3.2. IO enjeksiyon uygulaması	28
Şekil 4.1. IO enjeksiyon uygulaması gruplarının yaşlara göre serum leptin düzeylerinin grafiksel görünümü	40
Şekil 4.2. IO leptin enjeksiyon uygulaması sonrası grup ve yaşın HDL düzeyi üzerine etkisi	40
Şekil 4.3. IO leptin enjeksiyon uygulaması sonrası grup ve yaşın total protein düzeyi üzerine etkisi	42
Şekil 4.4. IO leptin enjeksiyon uygulaması sonrası grup ve yaşın embriyo/civciv uzunluğu düzeyi üzerine etkisi	44
Şekil 4.5. IO leptin enjeksiyon uygulaması sonrası grup ve yaşın gaga uzunluğu üzerine etkisi	44
Şekil 4.6. IO uygulamasına ve yaşa ait interaksiyonun sol parmak, uzunluğuna etkisine ait ortalama ve standart hatalar	46
Şekil 4.7. IO uygulamasına ve yaşa ait interaksiyonun sağ incik uzunluğuna etkisine ait ortalama ve standart hatalar	46
Şekil 4.8. IO uygulamasına ve yaşa ait interaksiyonun sol incik uzunluğuna etkisine ait ortalama ve standart hatalar	47
Şekil 4.9 IO uygulamasına ve yaşa ait incik oransal asimetri değeri ve ortalama asimetri değeri üzerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar	49



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

SimgelerAçıklama

ACTH	Adeno kortikotropin hormon
cm	Santimetre
°C	Santigrat derece
dl	Desilitre
DNA	Deoksiribo nükleik asit
HHa	Hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen
JAK2	Janus kinaz 2
kcal	Kilokalori
kg	Kilogram
kDA	Kilo dalton
µl	Mikro litre
ml	Mililitre
ng	Nanogram
NPY	Nöro peptit Y
IO	In ovo
Ob	Obez
ObR	Leptin reseptörü
KCL	Potasyum klorür
STAT	Transkripsiyon protein aktivat
SOCS3	Sitokin sinyal supresörü
SOD	Süper oksit dismutaz
ICV	İntra cerebro ventriküler



1.GİRİŞ

Etlik damızlıklarda gelişme hızı yönünde uygulanan yoğun seleksiyon uygulamalarından dolayı metabolik hızı artan embriyoların değişen besin madde ihtiyaçları son yıllarda in ovo yönteme dayalı uygulamaların araştırılması gerektiğini ortaya koymaktadır. İn ovo yöntem ile yumurtada var olan ve maternal kökenli bazı bileşenlerin yumurtaya enjeksiyonunun immun ve sindirim sistem etkinliğini arttırdığı, civciv gelişimini hızlandırdığı, hormon ve enzim aktivitesine bağlı olarak fizyolojik bir çok parametreyi olumlu yönde etkilediği ortaya çıkmıştır (Uni ve Ferket, 2004; Uni ve ark., 2005; Molenaar ve ark., 2010; Noy ve Uni, 2010). Yumurta sarısının oluşum süresi dikkate alındığında, damızlık dişi rasyonlarına ilavesine kıyasla in ovo yöntemin daha kısa sürede uygulanan bileşenin etkinliğini ortaya koyduğu ve bu yöntemin aşı uygulamalarındaki gibi pratik olarak uygulanabilirliği de bilinen bir gerçektir. Optimum embriyo gelişimi ve çıkış gücüne ulaşmak için çevre faktörleri arasındaki denge (Onegbasan ve ark., 2007) ve bu faktörler içerisinde de maternal etkiler en önemli yeri oluşturmaktadır. Memelilerden farklı olarak, kanatlı embriyosunun, kuluçka sırasında büyüme ve gelişimi; döllü yumurtada depolanan besin maddeleri ve maternal hormonların düzeyine bağlıdır. Kanatlılarda döllü yumurtanın besin madde ve hormon kompozisyonu belirlenmiş olmakla beraber, bu hormonların embriyo gelişimi boyunca etki mekanizması ve sarı/sarı kesedeki embriyonik yaşa göre düzeylerinin bilinmesi oldukça önemlidir.

Embriyo gelişim döneminde maternal kökenli bazı hormonların etki mekanizması bilinmemekle birlikte, bu hormonların bazı biyoteknolojik uygulamalar kullanılarak yumurtaya aktarımı da yaygın olarak kullanılmayan bir durumdur. In ovo uygulamalar çıkış gücü, sindirim sistem etkinliği ve civciv kalitesi açısından özellikle kuluçkanın 17 ve 18. günlerinde amniyon kesesine uygulandığında başarılı sonuçlar verdiği ortaya çıkmıştır (Moosanezhad ve ark., 2011). Benzer şekilde, maksimum çıkış gücü ve hastalıklara yanıtta iyi bir bağışıklık için kuluçkanın 17.5 ile 19.2 günleri arasında; hava hücrelerine, allantoik, amniyon ve sarı keseleri ile birlikte embriyonun kendisine in ovo aşı uygulaması yapılmaktadır. Örneğin, bir çalışmada (Wakenell ve ark. 2002) immun yanıt etkinliği için yumurtada sarı kese dışında 4 farklı alana İn ovo

(IO) marek aşısının, amniyon keseye ve embriyoya uygulanmasının immun yanıt etkinliğini % 94 düzeyinde arttırdığını, allantoik kesede etkinliğin %28 olduğu, bu dönemde hava kesesine uygulamanın etkili olmadığını bildirmiştir. Bu nedenle, in ovo yöntemle uygulanacak solüsyonun yapısı dikkate alınarak uygun embriyonik yaşta uygun enjeksiyon alanı seçildiği takdirde in ovo uygulamalar maternal beslemeye göre daha etkili bir yöntemdir. Ayrıca, maternal etkilere dayalı uygulamalara kıyasla in ovo yöntem daha kısa sürede ve daha etkindir. Bunun temel nedeni, yumurtalıklarda gelişen foliküllere bağlı olarak maternal plazma aracılığı ile tüm besin maddeleri ve hormonların aktarımının yaklaşık 60 gün süreyle olmasındandır. Ovulasyondan 24 saat önce yumurta sarısına besin madde ve hormonların birikimi oldukça hızlı olup bunu damızlık dişinin tükettiği yem/yem komponentlerinin düzeylerini de etkilemektedir. Dolayısıyla, Yeme ilavesine kıyasla in ovo uygulama sonunda maternal kökenli maddelerin daha kısa sürede yumurtaya aktarıldığı ve embriyo gelişimini olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (Hossain ve ark., 1998).

Obez (ob) geninin aktivite ettiği leptin hormonunun organizmada yem tüketimi, enerji metabolizması, üreme, büyüme ve gelişme gibi birçok fizyolojik etkisi bulunmaktadır (Elmqvist ve ark.,1999).Etlik piliçlerde yem tüketimi ile başlayan iştahın kontrolünü enerji dengesinin düzenlenmesi ile etkileyen leptin hormonu, sindirim sistem etkinliği ile ilişkili bazı hormonların kontrolünde etkili bir hormondur. Kanatlı embriyosunun leptin sentezi karaciğer ve yumurta sarı kesesinde gerçekleşmekte (Ashwell ve ark., 1999a) ve embriyo gelişiminin 3. gününden hemen sonra leptin ekspresyonu başlamaktadır(McMurtry ve ark., 2000). Kuluçka dönemindeki leptin uygulamaları civcivlerde yem tüketimini azaltmakta ve canlı ağırlığı arttırmaktadır(Rasha ve ark., 2012).İncelenen çalışmalarda, memelilerde maternal leptinin embriyo gelişimini etkileyebileceği konusu da çok yeni olup henüz araştırma aşamasındadır. Dolayısıyla, leptinin kuluçkanın 7. gününde sarı keseye enjekte edilmesi maternal leptinin kanatlılarda aktivasyonu hakkında bilgi vereceği hipotezi bu çalışmada ortaya atılmıştır.

Leptin hormonunun kanatlı hayvan türlerinde yem tüketimi, yağ metabolizması, glikoz metabolizması, enerji metabolizması, sindirim sistem etkinliği, üreme, büyüme ve gelişme gibi fizyolojik etkilerine ait etki mekanizmasının sarı/sarı kesedeki düzeylerine göre nasıl ve ne yönde değiştiği konusu henüz tam olarak bilinmemektedir.

Bu nedenle, bu çalışmada kuluçkalık yumurta içi (in ovo) leptin enjeksiyonunun etlik piliç embriyolarının gelişimi, morfolojik özellikleri ile bu özelliklere ait asimetri gelişimi ve çıkıştan sonra 7 gün büyütme sonunda korku davranışı ve performans ölçütleri ile çıkış sonrası erken gelişme dönemine ait kan lipid metabolizmasına ait biyokimyasal parametreler üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.





2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1. Leptin Hormonu

Leptin canlı organizmalarda 167 amino asitten oluşan poli-peptid yapıda bir hormon olup, reseptörleri aracılığı biyolojik etkisini göstermektedir (Zhang ve ark., 1994; Tartaglia ve ark., 1995). Zhang ve arkadaşları tarafından 1994 yılında tanımlanan leptin adını Yunanca leptos (ince) kelimesinden almaktadır. Yağ dokudan izole edilen leptin 1. grup sitokinlere benzeyen molekül ağırlığı 16 kDA Obez(Ob) gen ürünüdür. Canlı organizmada hipotalamus aracılığıyla yem tüketimini engelleyici etkileri ile tüm vücut enerji dengesinde ve endokrin fonksiyonların düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

Leptin hormonunun keşfinden önce Ob fareler ilk olarak Amerika'da bulunan Jackson laboratuvarında tespit edilmiştir. Leptin keşfinden önce, iştah ile ilgili çeşitli hipotezler ortaya atılmıştır. Örneğin, kan yoluyla taşınan bir lipid metabolitinin, vücut yağ deposunun büyüklüğünü, hipotalamusta, kortizol ve tiroksin gibi hormonlarla gözlemlenen negatif geri bildirim mekanizmasına benzer bir şekilde iletmekten sorumlu olabileceği öne sürülmüştür. Bu teori lipostatik olarak tanımlanmıştır. Hipotalamustaki lezyon bölgelerini ve hiperfajiden dolayı aşırı kilo alımı ve obezitenin ilerlemesi ile bu bölgede meydana gelen hasar Ob geni ile ilişkilendirilmiştir (Kennedy ve ark., 1953). Ob farelerin mutasyona uğramış genlerinden 1994 yılındaki klonlama teknikleri kullanılarak, Ob geni, U18915 numarası ile gen bankasına kaydedilmiştir (Zhang ve ark., 1994). Leptin hormonunun keşfinden sonra, leptin reseptörünün (Ob-R) ekspresyonu farelerden elde edilmiştir (Tartaglia ve ark., 1995). Leptin hipotalamus ve diğer organlarda reseptörlerine bağlanarak biyolojik etkisini göstermektedir (Zhang ve ark., 1994; Tartaglia ve ark., 1995).

İncelenen literatürler ve araştırmalara göre kanatlı türlerine ait leptin hormonu ilk çalışmalarda saf halde bulunmadığından rat ve fare gibi hayvan türlerine ait leptin hormonu ile kanatlı çalışmalarının sonuçlandığı ortaya çıkmıştır.

2.2.Leptin Hormonunun Biyolojik Reseptörleri ve Geni

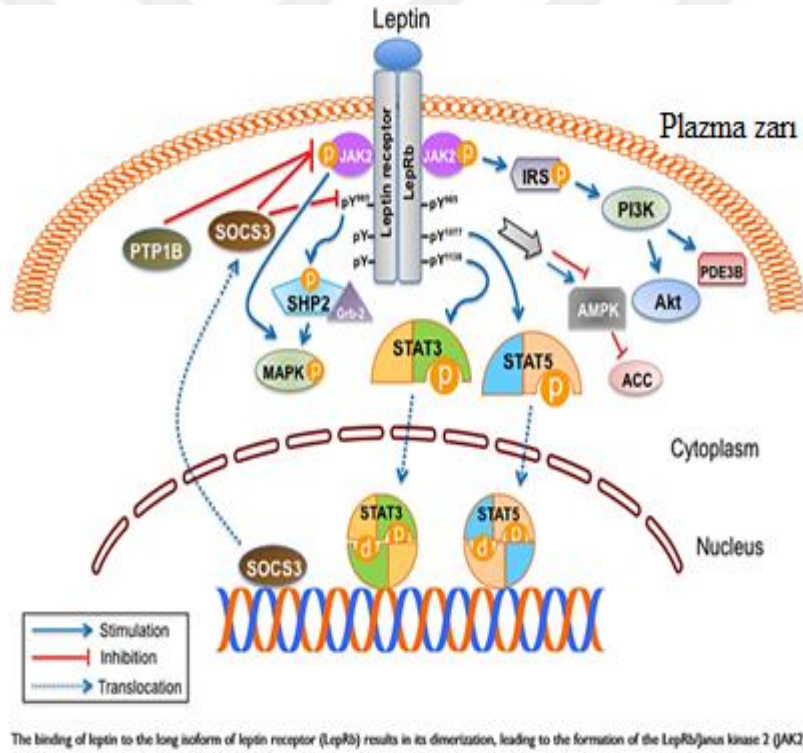
Leptin reseptörleri ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe ve ObRf olmak üzere 6 farklı izoforma ayrılmaktadır (Tartaglia ve ark.,1995; Lee ve ark.,1996; Mercer ve ark., 1996; Ahima ve ark., 2004; Yan ve ark., 2018). Leptin reseptörlerinin sadece iki tanesinin hücre içi sinyalleme ile bağlantılı olduğu ve en uzun izoformunun (ObRb) tam sinyalleme kapasitesine sahip olduğu bildirilmektedir (Ahima ve ark 1996; Lee ve ark., 1996; Park ve ark., 2014). Leptin reseptörleri sahip oldukları C-terminal alanlarına göre; uzun izoformu (ObRb), kısa izoform (ObRa, ObRc, ObRd, ObRf) ve salgılanan izoform (ObRe) olmak üzere 3 gruba da ayrılmaktadır (Tülüçeoğlu ve ark., 2018). Leptin reseptörünün uzun izoformu, yumurtalık, beyin, karaciğer, bağırsak ve böbrek gibi dokularda tespit edilmiştir (Ohkubo ve ark., 2000; Lamošová ve ark., 2001; Hen ve ark., 2008).

Leptin reseptörleri ilk olarak fare beyin ventriküllerinde bulunan koroid pleksusundan ekspresyon klonlama tekniği ile tespit edilmiş olup 1. grup sitokin reseptör ailesindedir (Tartaglia ve ark.,1995).Leptin hormonu iştah,büyüme, gelişme, üreme, yağ ve glikoz metabolizması, akciğer, karaciğer ile iskelet kasları ve enerji metabolizması üzerindeki etkilerini beyin ve periferel dokulardaki leptin reseptörleri aracılığıyla göstermektedir (Tartaglia, 1997; Morrison ve ark., 2001; Aslan ve ark., 2004;Park ve ark., 2014). Leptin reseptörleri hindi, ördek, tavuk olmak üzere çeşitli kanatlı türlerinde tespit edilmiş ve fare gen dizilimine % 97 oranında benzerlik gösteren tavuk leptin mRNA'sı civciv embriyolarında karaciğer, beyin, dalak, bursa, kalp, kas ve yumurta sarısında tespit edilmiştir (Taouis ve ark. 1998; Ashwell ve ark. 1999a; Horev ve ark., 2000; Richards ve ark., 2003; Hu ve ark., 2008; Wang ve ark., 2011; Lei ve ark., 2014).

Kanatlılarda leptin hormonunun DNA'sının gen bankasına kayıt ettirilen sekanslar ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda aynı bant boyutların elde edilemediği ortaya çıkmıştır (Friedman-Einat ve ark.,1999; Kılıç, 2008; Ninov ve ark., 2008). Bu durumun genlerin tanımlanmasını engelleyen teknik zorluklardan kaynaklandığı, bununla birlikte, kanatlılarda endojen leptinin izole edilmesi için daha ileri biyokimyasal teknikler kullanılarak daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir (Ohkubo ve

ark.,2008;Yosefi ve ark.,2010; Ohkubo., 2014; Farkašová ve ark., 2016;Seroussi ve ark.,2016).

Leptin hormonunun hedef hücredeki ObRresöptörüne bağlanması sonucunda aktive edilen Janus kinaz 2 (JAK2), sinyal transdüktörleri alt yolaktaki JAK2/STAT3(transkripsiyon protein 3 aktivat) ve JAK2/STAT5 (transkripsiyon protein 5 aktivat), yollarını fosforile eder. Bu yollar sayesinde leptin canlılarda beslenme, glikoz üretimi, adipoz dokuda lipogenezis üzerine etki ederek enerji metabolizması üzerinde değişik metabolik etkilere neden olur (Adachi ve ark., 2008; Shadi ve ark.,2011). Bu etkileri sağlayan sinyalin hedef hücrede devre dışı kalması için JAK2'ye doğrudan(Sitokin sinyal supresörü)SOCS3 bağlanarak JAK2 nin aktivitesini baskılamaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Leptinin organizmada sinyal yolları (Park ve ark.,2014).

2.3. Leptin Hormonunun Salınımı

Kanatlılarda karaciğer başta olmak üzere yağ doku, hipotalamus, hipofiz bezi, iskelet kası, ve yağ dokudan sentezlenen leptin,kanda serbest ve proteine bağlı olarak iki

formda bulunmaktadır (Taouis ve ark.,1998; Ashwell ve ark., 1999a; Hu ve ark., 2008;Hausman ve ark.,2012). Kanatlılarda karaciğer ağırlığı ile leptin düzeyi arasında pozitif ilişkiye ek olarak lipid metabolizması ile leptin ekspresyonu arasında da ilişki olması karaciğerin tavuklarda büyük bir leptin sentez kaynağı olduğunu göstermektedir (Taouis ve ark.,1998;Bruggeman ve ark.,2000).

Leptin hormonunun doğrudan yumurtalık hücrelerinden salgılandığı tahmin edilmektedir(Paczoska-Eliasiewicz ve ark.,2003). Leptin salınımı üzerine insülin, prolaktin, glukokortikoidler,sitokinler, östrojenler ve prolaktin hormonları uyarıcı etki yaparken, nöro-peptit (NPY), tiroid hormonları, büyüme hormonu, somatostatin, serbest yağ asitleri, katekolaminler ise leptin salınımı üzerinde baskılayıcı etki göstermektedir (Florkowski ve ark., 1996; Sliker ve ark., 1996; Escobar-Morreale ve ark., 1997).

2.4. Yaş ve Leptin Hormonu Arasındaki İlişki

Yumurta sarısı leptin düzeylerindeki değişikliklerin araştırıldığı bir çalışmada, yumurta sarısı leptin düzeyi kuluçkanın 1. ve 3. günlerinde 11. güne göre daha yüksek olduğu ve serum leptin düzeyi ile hipotalamik NPY seviyelerinin ilişkilendirilemediği bildirilmiştir (Huang ve ark., 2008).Beş günlük civciv embriyolarının beyin, bursa, kalp, karaciğer, kas ve dalağında leptin mRNA varlığı kanıtlanmıştır (Ashwell ve ark. 1999b). Etlik piliçlerinbeslenmesinde enerji kısıtlaması ve yaşın besi performansı, et kalitesi ve leptin hormonu düzeyine etkisinin incelendiği çalışmada 7, 14 ve 41. günlerde etlik piliçlerden alınan kan örneklerinde plazmaleptin düzeyi sırasıyla 1.47; 1.40 ve 0.52 ng/ml olarak tespit edildiği ve yaşın ilerlemesiyle plazma leptin düzeyiningerilediği bildirmiştir (Avcılar, 2016).

2.5. Leptin Hormonunun Etkileri

2.5.1. İştah üzerine etkisi

Etlik damızlık tavuklara 10 µg intra cerebro ventriküler (ICV) leptin enjeksiyonunun iştahı azalttığı, su tüketimini etkilemediği bildirilmektedir(Denbow ve ark.,2000).Leptin hormonu ICVenjeksiyonunun tavuklarda enjeksiyon sonrası

180.dakikada iştahı azalttığı, iştah ile ilişkili hipotalamik NPY ekspresyonunu modüle ettiği leptin reseptörünü, sinyal transdüktörünü ve transkripsiyon aktivatörünü (Ob-Rb / STAT) etkinleştirdiği bildirilmektedir (Dridi ve ark., 2005). Leptinin büyümekte olan civcivlerde iştahın düzenlenmesi üzerinde engelleyici etkisinin yaşa bağlı olduğu bildirilmiştir (Cassy ve ark., 2004b).

2.5.2. Büyüme ve gelişme üzerine etkisi

Leptin hormonu büyüme hormonu reseptörü, büyüme faktörü ve kas hücrelerinde protein sentezini etkileyerek embriyonun büyüme ve gelişimi üzerinde etkilidir (Lamoşova ve ark., 2001; Lamosová ve ark., 2003; Hu ve ark., 2008). Tavuklarda dolaşımda bulunan büyüme hormonu düzeyi leptin hormon ekspresyonunu etkileyerek cinsel olgunluk, toplam kuluçka süresi, canlı ağırlık, yem tüketimi ve yumurta ağırlığı üzerinde etkilidir (Lamoşova ve ark., 2003; Su ve ark., 2012).

Memelilerde leptin plasental anjiyogenez ile fetal büyüme üzerine etki etmektedir. Tavuklarda embriyonun korio-allantoik membranı üzerinde benzer bir etki anjiyogenezis etkisiyle kuluçka boyunca embriyonun büyüme ve gelişmesi üzerinde oluşmaktadır (Su ve ark., 2012).

Kanatlılarda leptin hormonunun yem tüketimi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; intraperitoneal rekombinant tavuk leptini (1 mg / kg, canlı ağırlık) enjeksiyonunun, 56 günlük yumurtacı tavuklarda yem tüketimini % 38 oranında azalttığı, 9 günlük etlik damızlık civcivlerde yem tüketimi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı, etlik civcivlere göre yumurtacı civcivlerin beyininde leptin reseptörü ve NPY mRNA gen ekspresyonunun önemli ölçüde daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Aynı çalışmada, canlı ağırlık artışının 8. ve 35. günlerdeki yumurtacı ve etlik civcivler arasında büyüme oranlarındaki farklılıklara rağmen, leptin konsantrasyonunun her iki genotipte de benzer olduğu, leptin reseptörü ve NPY mRNA'sının 1 günlük yaştan itibaren beyinde eksprese edildiği leptinin, büyümekte olan civcivlerde iştahın kontürolü üzerindeki etkisinin yaşa bağlı olduğu bildirilmektedir (Cassy ve ark., 2004b).

2.5.3. Üreme üzerine etkisi

Leptinsalınımında testosteron hormonu bir inhibitör görevi görürken, östrojen hormonu leptinin salgılanması üzerinde uyarıcı bir etkiye sahiptir (Himms-Hagen., 1999; Mácajová ve ark., 2002; Küçük Kurt, 2015). İn ovo (IO) leptin uygulamasının daha yüksek testis ağırlığına sebep olduğu, testis ağırlığındaki bu artışa plazmadaki yüksek testosteron konsantrasyonunun neden olduğu bildirilmektedir (Lamoşova ve ark., 2003). Kuluçkada yüksek düzeydeki leptin hormon seviyesi embriyoların daha hızlı bir gelişim (daha erken kuluçkadan çıkış, kuluçkada daha yüksek embriyo ağırlığı) göstermesine neden olurken eşeyssel olgunluk başlangıcını da uyardığı bildirilmektedir (Lamoşova ve ark., 2003).

Leptin hormonu aça bırakılan tavukların yumurtalıklarından salgılanan estradiol ve progesteron hormonları üzerinde uyarıcı etki yaptığı, yumurtalık foliküllerinin teka tabakasındaki steroid hormonu salgılamasına etkisi bulunduğu bildirilmektedir (Paczoska-Eliasiewicz ve ark., 2006).

Ad libitum beslenen 11 haftalık piliçlerde, cinsel olgunluğa kadar dört farklı leptin dozu uygulamasında (4, 16, 64 ve 256 µg/ kg vücut ağırlığı) eşeyssel olgunluk döneminde kan plazmasında luteinize edici hormon, östradiol ve progesteron hormon düzeylerini ve yumurtalıkta folikül gelişimini arttırdığı, erken eşeyssel olgunluğa yol açtığı bildirilmektedir (Paczoska-Eliasiewicz ve ark., 2006).

Üç gün boyunca, leptin, ghrelin, obestatinin ve bu hormonlarla birlikte yem kısıtlamalarının yumurtlama hızı, progesteron, testosteron, estradiol ve arjinin-vasotosin salgılamasını önemli ölçüde azalttığı, progesteron salgılamasını arttırdığı, ad libitum beslenen tavuklarda leptinin yumurtlama hızı, testosteron ve estradiol salgılamasını baskıladığı bildirilmektedir (Sirotkin ve ark., 2015).

2.5.4. Metabolik parametreler üzerine etkileri

Leptin hormonunun plazma glikoz düzeyini düşürdüğü, glikojen sentezi ve hedef dokularda glikoz alımını dolayısıyla glikoz metabolizmasını etkilediği bildirilmektedir (Hardie ve ark., 1996; Muller ve ark., 1997; Macajova ve ark., 2003).

In ovo leptin uygulamasının karaciğerde trigliserid ve kolesterol düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir (Hu ve ark., 2012). Bazı çalışmalarda, IO leptin uygulaması ile plazma kolesterol konsantrasyonunun değişmediği, yumurtlama dönemi boyunca tüm gruplarda kolesterol düzeyinin yükseldiği bildirilmiştir (Lamoşova ve ark., 2003).

Plazma alkalik fosfataz aktivitesinin çikitten sonra değişerek en yüksek seviyesine büyüme ve yem tüketimi sırasında ulaştığı en düşük değerinin ise eşeyssel olgunluk yaşında gerçekleştiği bildirilmiştir (Lamoşova ve ark., 2003).

2.5.5. Performans üzerine etkileri

Farklı dozlarda ICV enjeksiyonu ile leptin uygulanan civcivlerde yem ve su tüketimi ile birlikte canlı ağırlık üzerinde leptin hormonunun herhangi bir etkisi olmadığı bildirilmektedir (Mácãjová ve ark., 2003; Kuo ve ark., 2005). İnsan rekombinant ICV leptin enjeksiyonunun tavuklarda yem tüketimini azalttığı bildirilmiştir (Denbow ve ark., 2000; Dridi ve ark., 2000).

Bir gün boyunca aç bırakılan tavuklarda adipoz doku ve karaciğerde leptin mRNA gen ekspresyonunun azaldığı yem tüketiminden sonra, yem verildiğinde kademeli olarak leptin mRNA ekspresyonunun tekrar yükseldiği (Sato ve ark., 2003), bu sonucun lipid metabolizması ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (Sato ve ark., 2003).

2.5.6. Davranış üzerine etkisi

Kanatlılarda leptinin yem ve su tüketimi, davranışları ile birlikte bazı davranış özelliklerinden olan ayakta kalma, oturma, tüy düzeltme, derin dinlenme, dışkılama üzerine önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Sims ve ark., 2017). Buna karşılık insan rekombinant leptininin ICV enjeksiyonunun yem ve su tüketimini azalttığı bildirilmiştir (Kuo ve ark., 2005).

Değişik dozlarda leptin verilen civcivlerde yem tüketimi, su tüketimi, atlama, kaçış, gagalama ve dışkılama gibi davranışlar üzerine etkisi bulunmadığı belirtilmiştir (Denbow ve ark., 2000; Mácãjová ve ark., 2003).

2.5.7. Hormonlar üzerinde etkisi

2.5.7.1.İnsülin

Leptin insülin sekresyonunununu inhibe ederek yem tüketimi düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Taouis ve ark.,2001). İnsülin, leptin salınımını uyarırken, leptin uygulanması, plazma insülin seviyesini azaltmaktadır (Gettys ve ark.,1996; Harris, 1998; Patel ve ark., 1998; Cassy ve ark.,2003). İnsülin enerji metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan anabolik bir hormondur, kanatlılarda kan glikoz seviyesindeki artış insülin salınımını yükseltirken düşük glikoz seviyesi glukagon salınımını artırmaktadır (Güzel, 2016). Kanatlılarda kan glikoz konsantrasyonu yüksektir bu insüline karşı duyarlılığın az olmasından kaynaklanmaktadır(Erhan ve ark.,2018).Karaciğerde leptin ekspresyonu insülin ve deksametazon ile artarken,glukagon ve östrojen ile azalmaktadır(Ashwell ve ark.,1999a).

İnsülin, adipositlerden leptin sentezi ve salgılanması için gerekli bir hormondur.İşlevsel leptin reseptörleri sadece merkezi leptini uyarmak için değil, aynı zamanda beynin insüline duyarlı hale gelmesi içinde gerekli bir hormondur(Lamošová ve ark.,2001).

2.5.7.2. Diğer hormonlar

Embriyo gelişim döneminde IO leptin uygulamasının tri-iodotrionin (T₃)hormonunuplazmada gerilettiği ve tiroksin (T₄) hormon düzeyini arttırdığı (Lamošová ve ark., 2003).Büyüme hormonu verilen etçi tavukların karaciğerinde leptin düzeyinin arttığı yağ dokusu üzerinde herhangi bir etksinin olmadığı bildirilmektedir (Ashwell ve ark., 1999b). Kanatlılarda leptin uygulamaları sonucunda T₃seviyesinin yükselmesi hipotalamus, hipofiz, adrenal bez (HHA) eksen aktivitesini etkilemiştir (Lamošová ve ark.,2003).Leptin hormonuyumurtacı tavuklarda luteinize edici hormonu stimüle ederken estradiol hormon sekresyonunu inhibe etmektedir(Paczoska-Eliasiewicz ve ark.,2003).

Leptin hormonu kanatlılarda soğuk ve sıcak ortama maruz kaldıklarında karaciğer leptin gen ekspresyonunu arttırmaktadır(Dridge

ark.,2008).Kesikli aydınlatma uygulamalarının melatonin hormonu aracılığıyla leptin hormon konsantrasyonu üzerine doğrudan ve dolaylı etkileri bulunduğu (Abbas ve ark., 2008)melatonin hormonunun insülin ile etkileşimine bağlı olarak leptin ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir.

2.5.8. Diğer etkileri

Leptinin folüküler ve eşeyssel olgunluk döneminde hipofiz hipotalamus ve gonadal eksen üzerinde de etkileri bulunmaktadır (Paczoska-Eliasiewicz ve ark.,2006). Isı stresine ve yem sınırlamasına maruz bırakılan etlik piliçlerde serum leptin, T₃, T₄, glikoz ve trigliserid düzeylerinin ve rektal sıcaklığın düştüğü, bu gerilemeye ısı stresi ile yem sınırlamasının etkisi sonucu hipotalamus-hipofiz-tiroit-leptin aktivasyonunun etkisi ile gerçekleştiği bildirilmektedir (Lamosova ve ark.,2003; Khamseh, 2014).

Leptin, bir antioksidan enzim olan süper oksit dismutazı(SOD) aktive ederek vücudun antioksidan savunmasında önemli rol oynadığı, antioksidan ve oksidatif stres arasındaki dengeyi sağladığı bildirilmektedir (Zheng ve ark.,2010).

2.6. IO Yöntem

Bir enjeksiyon yöntemi olan IO ilk olarak 1982 yılında marek aşısının etkinliğini saptamak amacı ile kullanılmıştır (Sharma ve Burmester, 1982). Günümüzde, IO uygulamalar dünyada kanatlı hayvan sektöründe ticari bir yöntem olup, saatte ≥ 70.000 yumurta başlıklı IO cihazlar geliştirilmiştir (Şekil 2.2). Marek aşısının etkinliği aşının amniyon kesesine ve embriyoya kuluçkanın 17.5 ve 18.5 günlerinde IO enjeksiyon aracılığı ile daha iyi anlaşılmıştır (Sharma ve Burmester, 1982). Bununla birlikte, marek aşısının çıkışta civcive uygulanmasına karşılık geç embriyo gelişim dönemindeki enjeksiyonun immun sistem etkinliğini arttırdığı ve geç embryonik gelişim dönemindeki enjeksiyondan daha etkili olduğu bildirilmektedir (Sharma ve ark., 1984; Zhang ve Sharma., 2001).

Kanatlı endüstrisi için ekonomik önem arz eden IO besleme yöntemi patentli bir uygulamadır (Uni ve Ferket, 2003; US Patent No. 6.5692.878). Kanatlı endüstrisi için

ekonomik önem arz eden fenotipik özellikler için amniyon keseye in ovo besleme yöntemi (Uni ve Ferket, 2003; US Patent No. 6.5692.878) ile başarılı sonuçlar elde edildiği de ortadadır. Etlik civcivlerde çıkış gücü (Uni ve Ferket, 2004; Uni ve ark., 2005), karaciğer glikojen düzeyi (Uni ve Ferket., 2004; Uni ve ark., 2005; Tako ve ark., 2004; Foye ve ark., 2006), yem yeme davranışı ve çıkışta göğüs kas ağırlığı (Uni ve ark., 2005; Foye ve ark., 2006) IO besleme ile artmaktadır. Kuluçkanın 0, 1, 7, 13, 14, 17, 17.5, 18. günlerinde IO yöntem kullanılarak etlik damızlıklara ait dömlü yumurtalara çeşitli besin maddeleri ve bileşikler enjekte edilmiştir (Ohta ve ark., 1999; Uni ve Ferket 2004; Keralapurath ve ark., 2010; Shafey ve ark., 2014).

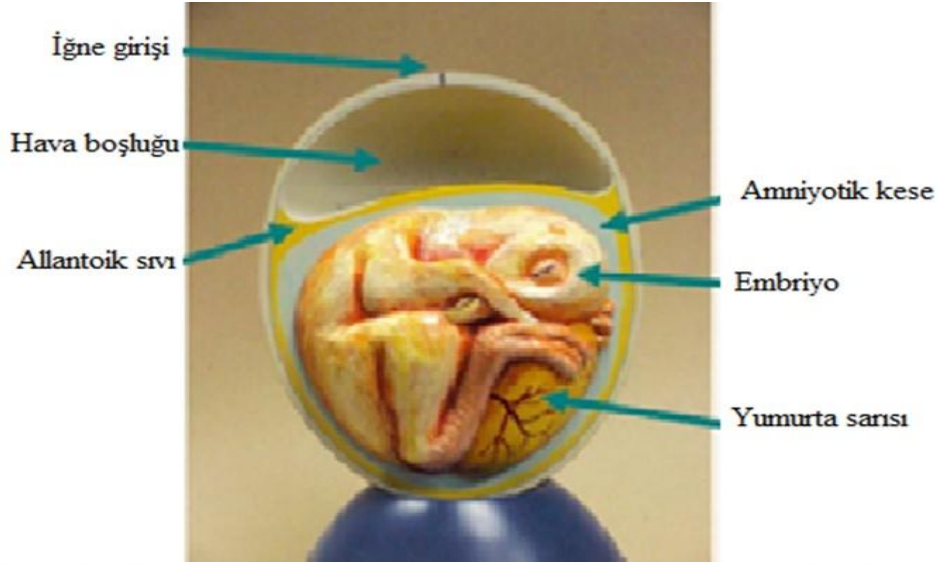


Şekil 2.2 IO enjeksiyon uygulanabilirliği (Anonim,2018).



Şekil 2.3 Birden çok başlıklı IO enjeksiyonu (Anonim)

Bir biyoteknolojik uygulama olan IO yöntem maternal etkiye dayalı uygulamaların daha kısa ve etkin sürede gerçekleştirilmesini sağlar (Babacanoğlu ve ark., 2018). Maternal uygulamalara alternatif bir yöntem olan IO, maternal kökenli besin madde, hormon, antikor ve antioksidanların yumurta içinde uygun sitede işlevselliği ve etkinliğinin artırılması amacıyla uygulanmaktadır (Babacanoğlu ve ark., 2018). Enjeksiyona dayalı IO yöntem; uygulama ve besleme olarak iki şekilde sınıflandırılabilir. Bunun temel nedeni, çeşitli besin madde, hormon, antioksidan ve antikorların enjekte edildiği sitelerin embriyo gelişimine bağlı olarak değişmesinden kaynaklanmaktadır. IO uygulama kuluçkadan önce veya kuluçkanın herhangi bir döneminde amniyon sıvısı dışında diğer sitelere yapılan enjeksiyonların tümünü kapsar. IO uygulamalar içinde özellikle maternal etkiye dayalı hormon, antikor ve yağda çözünen antioksidanlar gibi dışı damızlıktan yumurta sarısına aktarılan maddelerin etkisinin yumurta sarısı ya da sarı keseye enjeksiyonunu kapsamaktadır (Henry ve Burke, 1999; Babacanoğlu ve ark., 2018). Bu siteler, kuluçkadan önce döller yumurtanın albümin, sarısı ve hava boşluğu; kuluçka döneminde ise embriyo, sarı kese ve hava boşluğudur (Kralapurt ve ark., 2010; Tako ve ark., 2004; Molenaar ve ark., 2010). IO yöntemiyle yapılan enjeksiyon uygulamalarında enjeksiyon sitesi uygulama yeri ve zamanına göre farklı çalışmalar bulunmaktadır. IO uygulamalar özellikle sarı keseye uygulandığında hormon veya besin maddelerinin en etkin oldukları yaşı yedinci gün olduğu (Kralapurt ve ark., 2010), aşı uygulamalarının ise en etkin olduğu sitenin embriyonun kendisi olduğu bildirilmektedir (Sharma ve Burmaster, 1982).



Şekil 2.4 IO enjeksiyon siteleri (Ricks ve ark.,2003)

IO besleme ise embriyonun amniyon kesesindeki amniyon sıvısına çeşitli besin maddelerin enjeksiyonunu içermektedir (Ohta ve ark., 2001;Tako ve ark.,2004; Smirnov ve ark.,2006; Shoval ve ark.,2011;).IO besleme amion kesenin sıvısı içine amino asitler (Ohta ve ark., 1999), glikoz, selenyum (Salmanzadeh, 2012; Surai ve ark., 2016), askorbik asit (Altan ve ark.,2017) gibi besin maddelerinin enjeksiyonunu içermektedir. IO besleme için en uygun embriyonik yaşın 17.5.gün ile 18.9 günlerarası olduğu başka bir ifadeyle kuluçkanın 421.saati ile 453.saati veya bu saatler arasında olduğu bildirilmektedir(Uni ve Ferket.,2004;Rabie ve ark., 2015).

2.6.1.IO leptin uygulamaları

Maternal leptinin etkisini araştırmak amacı ile etlik damızlık yumurtalarının kuluçkaya girişinden önce 100 µl fosfat tamponlu salin (PBS) içinde 0.5 µg rekominat fare leptinin IO enjeksiyonunun, karaciğer leptin sekresyonunu ve lipid metabolizmasını değiştirdiği, bunun maternal leptinin rolünü ortaya koyduğunu, IO leptinuygulamasınınçıkışta canlı ağırlığı azalttığı bildirilmektedir(Hu ve ark.,2012).

Etlik piliçlerde leptin hormonunun enerji metabolizması üzerindeki etkisini belirlemek için yapılan bir araştırmada 0.5 µg+ 100 µl PBS düşük ve 5.0 µg + 100 µl PBS yüksek rekombinant fare leptinin IO enjeksiyonunun hipatalamusta leptin

enjeksiyon dozuna bağlı olarak kanatlılarda büyüme ve büyüme hormonu mRNA ekspresyonunu önemli düzeyde etkilediği bildirilmektedir(Yuana ve ark.,2017).

Kuluçkadan önce yerli bir tavuk ırkına ait kuluçkalık yumurtanın albüminine 0.5µg rekombinant leptin enjekte edilen çalışmada kuluçkanın12. gününde STAT3 aracılığıyla korio-allantoik membrandaki anjiyogenezisi ve embriyo gelişimini etkilediği bildirilmiştir (Su ve ark.,2012).

Japon bıldırcınlarının yumurtalarına kuluçkanın 5. gününde 50 µl PBS içeren 0.1 µg veya 1 µg rekombinant fare leptinialbümine enjekte edilerek, kan serumunda T₃, T₄, kortikosteron, testosteron, toplam lipidler, triaçilgliseroller, kolesterol, glikoz ve alkalın fosfataz aktivitesi plazma konsantrasyonlarına bakılmış,çıkışta T₃ düzeyi düşük, ileri yaşlarda kontrol gruplarıyla aynı, eşeyssel olgunluk döneminde tekrar gerilediği, leptin uygulama gruplarında T₄düzeyinin çıkışta yüksek diğer yaşlardagerilediği,eşeyssel olgunlukta tekrar yükseldiği, ayrıca leptin gruplarında karaciğer, triaçilgliserol konsantrasyonları, kolesterol ve plazmada alkalın fosfataz aktivitesi, toplam lipid seviyelerinde düşüş, büyüme döneminde toplam lipid konsantrasyonlarının leptin gruplarında arttığı, ileriki yaşlarda azaldığı bildirilmiştir(Lamosova ve ark.,2003). Aynı çalışmada, kuluçkanın 5. gününde yumurtanın albüminine 0.1 µg leptin (50 µl fosfat tampon çözeltisi içinde) IO uygulamasının canlı ağırlığı arttırarak kuluçkadan erken çıkışı hızlandırdığı bildirilmiştir(Lamosova ve ark.,2003).

Leptin hormon etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 3ml / saatlik sabit bir hızda 6 saat boyunca rekombinant tavuk leptinin sürekli infüzyonu aracılığıyla uygulamasının üç haftalık etlik damızlık civcivlerde yem tüketimini azalttığı, Ob-R, NPY, oreksin ve oreksin reseptörü ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı, pro-opiomelanokortin ve kortikotropin salgılatıcı hormon mRNA seviyelerinin leptin uygulamasından sonra değişmediği bildirilmiştir.Aynı çalışmada, leptinin kanatlılardaıştahı düzenleyen melanokortin reseptör üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak etkilediği,leptinin merkezi sinir sistemi üzerindeki etkisini seçici hipotalamik NPY aracılığıyla gerçekleştirdiği bildirilmiştir(Dridi ve ark., 2005).

Kuluçkadan önce leptin IO enjeksiyonu ile 1 µg leptin (100 µl PBS içinde) yapılmış bir diğer gruba da kuluçkanın 5. gününde 1 µg leptin+PBS yumurta albümin sıvısına enjekte edildiği çalışmada; embriyonik yaşı 5. gününde uygulanan IO leptin

hormon uygulamasının kuluçka ve etlik piliç performanslarına ait parametreler üzerine olumlu etki ettiği bildirilmiştir (Güz, 2014).

Bıldırcın yumurtalarına leptinin IO enjeksiyonunun pro-anjiyojenik etkisini araştırmak için yapılan bir çalışmada, kuluçkanın 7. günde rekombinant fare leptin IO yöntemiyle 10, 100 ve 1000 ng olarak yumurta albümüne enjeksiyonunun anjiyogenezis, yumurta sarısından besin madde Emilimi ve embriyo gelişimi üzerinde etkisinin olduğu bildirilmiştir (Výboh ve ark., 2010).

Sekiz haftalık erkek Japon bıldırcınlarına (*Coturnix Japonica*) leptin hormonu uygulamasının kontrol grubuna göre uygulama gruplarında daha erken dönemde yumurtadan çıktığı, daha yüksek canlı ağırlığa sahip olduğu, testosteron düzeyi leptin gruplarında daha yüksek olduğu, gelişmekte olan embriyonun endokrin sisteminin leptin tarafından etkilendiği, embriyonik dönemde leptin uygulanmasının embriyonik gelişmeyi hızlandırdığı bildirilmektedir (Macajova ve ark., 2003).

Japon bıldırcınlarında IO leptinin uygulamasının kuluçka randımanı, canlı ağırlık, testosteron ve estradiol hormonu üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada kuluçkanın 5. gününde yumurta sarısına leptin hormonu IO yöntemiyle uygulanması sonucunda plazma testosteron ve estradiol seviyeleri üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı, IO leptin uygulamasının erkek ve dişi Japon bıldırcınlarında canlı ağırlığını arttırdığı bildirilmiştir (Rasha ve ark., 2012).

2.6.2. IO enjeksiyon dışındaki diğer leptin uygulamaları

Kanatlılarda leptinin enjeksiyonunun yem tüketimi, su tüketimi, civcivlerdeki davranışlar üzerindeki etkilerini belirlemek için yapılan bir çalışmada ICV olarak enjekte edilen 10 nmol leptin hormonunun yem ve su tüketimi üzerine etkisini olmadığı, leptin uygulamasının davranış, ayakta kalma, oturma, tüy düzeltme, derin dinlenme, atlayışların sayısı, yiyecek ve keşif, su tüketimi, dışkılama davranışları üzerine ICV leptin enjeksiyonunun önemli bir etkisinin olmadığını bildirmiştir (Sims ve ark., 2017).

Buna karşılık insan rekombinant leptinin ICV yoldan kanatlılara verilmesi ile yem ve su tüketimi incelendiği bir çalışmada uygulamadan sonra yem ve su tüketiminin azaldığı bildirilmiştir (Kuo ve ark., 2005).

Fare leptininin ICV. yöntemi ile tavuk merkezi sinir sistemi içine enjekte edildiği çalışmada, tavukların yem tüketiminde bir değişik meydana getirmediği, fare leptininin tavuk leptin reseptörüne bağlanmadığı tavuk beyinde leptin reseptörünün bulunmadığı bildirilmiştir (Bungo ve ark.,1999).

Etçi damızlık tavukların rasyonlarına 400 mg/kg sisteamin ilavesinin leptin hormon seviyesini, düşürdüğü bildirmişlerdir (Hu ve ark., 2008) .

Yumurtalık ve cinsel olgunluğun gelişmesi üzerine yapılan bir çalışmada ad libitum beslenen 11 haftalık piliçlerde, eşeyssel olgunluğa kadar dört doz seviyesinde (4, 16, 64 ve 256 µg kg/ vücut ağırlığı) günlük olarak leptin enjekte edildiği, eşeyssel olgunluk döneminde kan plazmasında luteinize edici hormon, östradiol ve progesteronun arttığı, etlik dışı tavuklarda ekzojen leptinin yumurtalık apoptozunun azalması ve folikül gelişimini artması ile ergenliğin başladığını bildirmişlerdir (Paczoska-Eliasiewicz ve ark., 2006).

Kanatlılarda leptin hormonunun yem tüketi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; ICV tavuk leptinin (1 mg / kg CA) enjeksiyonunun, 56 günlük yumurtacı tavuklarda yem tüketimini % 38 ile %15 oranında azalttığını 9 günlük etlik damızlık civcivlerde yem tüketimine önemli bir etkisinin olmadığını bildirmektedirler (Cassy ve ark.,2004b). Canlı ağırlık artışı, leptin plazma konsantrasyonlarında 1-9 ve 35. günlerde beyin leptin reseptörü NPY mRNA ekspresyonu analiz edildiği çalışmada kuluçkadan yeni çıkmış civcivlerde, leptinin periferik konsantrasyonun etçi damızlık civcivlerine göre yumurtacı civcivlerde önemli ölçüde daha fazla olduğu, canlı ağırlık artışı 8. ve 35. günlerdeki yumurta ve etci civcivleri arasındaki büyüme oranlarındaki farklılıklara rağmen, leptinin periferik konsantrasyonları her iki genotipte de sabit ve benzer olduğu, leptin reseptörü ve NPY mRNA, her iki genotipin civcivinde 1. yaşlarından itibaren beyinde eksprese edildiği leptinin büyümekte olan civcivlerde besin alımının düzenlenmesi üzerindeki engelleyici etkisinin yaşa bağlı bir süreç olduğu bildirilmektedir(Cassy ve ark.,2004b).

Kanatlılarda ovulasyon ve salgı aktivitesinin kontrolünde beslenme durumu, metabolik hormonların ve bunların birbirleriyle olan ilişkilerinin incelemek amaç ile üç gün boyunca, leptin, ghrelin obestatinin ve bu hormonlarla birlikte yem kısıtlamalarının uygulandığı çalışmada;yem kısıtlamasının yumurtlama hızı, progesteron, testosteron, estradiol ve arjinin-vasotosin salınımını önemli ölçüde azalttığı, progesteron salınımını

artırdığı, ad libitum beslenen tavuklarda leptinin, ovülasyon, testosteron, estradiol salınımı baskıladığı, tavuk yumurta hormonları üzerinde leptin, ghrelin ve obestatin hormonlarının etkisi bulunduğu bildirmektedir (Sirotkin ve Grossman, 2015).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Denemede Kullanılan Materyaller

3.1.1. Yumurta ve civciv materyali

Bu çalışma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Çiftlik Müdürlüğü Uygulama Çiftliğinde yer alan kuluçkahane ve civciv büyütme kümesinde bulunan büyütme kafeslerinde gerçekleştirilmiştir. Denemeye ait yumurtalar ticari bir firma olan BANVİT A.Ş.'den temin edilmiştir. Ross 308 genotipine ait 45 haftalık etlik dişi damızlıklardan toplam 425 adet kuluçkalık yumurta deneme materyali olarak kullanılmıştır.

3.1.2. Kuluçkahanede ve büyütme kümesinde kullanılan materyaller

3.1.2.1. Kuluçka makinası

Tek girişli olarak tanımlanan 600 kapasiteli Çimuka marka kombine kuluçka makinesi denemede kullanılmıştır. Kuluçka boyunca kuluçkahanede bulunan ölçü aletleri ile oransal nem, sıcaklık, basınç takip edilerek kayıt altına alınmıştır (Çizelge 3.1). Tam otomatik ısıtma/çevirme/nemlendirme sistemlerine sahip olan kombine kuluçka makinesinde ısı ölçer, basınç ölçer ve nem ölçer kullanılarak embriyonun gelişimi ve çıkış boyunca ölçüm/sn/gün olarak kayıt altında tutulmuş ve kuluçka günlerine ait ortalama değerler Çizelge 3.2.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Kuluçka boyunca kuluçkahane ortamına ait oransal nem, sıcaklık ve basınç değerlerine ait ortalamalar

	Oransal nem	Sıcaklık	Basınç
Embriyo yaşı gün	%	°C	mmhg
1-7	54.60	25.35	628.15
8-15	50.49	21.36	627.08
16-21	49.81	21,14	627.71

Çizelge 3.2.Kuluçka boyunca kuluçka makinasının oransal nem, sıcaklık ve basınç değerlerineait ortalama ölçüm değerleri

Günler	Oransal nem %	Sıcaklık °C	Basınç mmhg
0	52.29	37.93	625.93
1	53.95	34.58	631.08
2	60.93	38.11	626.32
3	53.64	38.00	626.53
4	52.63	37.90	626.98
5	54.08	38.03	627.33
6	54.00	38.07	627.62
7	53.03	38.09	626.37
8	53.37	38.17	624.30
9	53.38	38.24	619.63
10	53.54	38.13	616.82
11	54.52	38.20	618.75
12	54.46	37.47	617.17
13	57.72	37.38	628.84
14	57.21	37.60	628.40
15	55.21	37.65	630.92
16	58.65	37.20	626.80
17	53.99	37.65	628.40
18	55.85	37.64	630.92
19	55.11	37.75	629.75
20	70.86	36.53	625.75
21	70.12	36.34	616.74
22	70.80	36.44	617.94

Deneme boyunca kullanılan Mitutoyo marka 0.01mg hassasiyetli terazi, Mitutoyo marka 0.01mm hassasiyetli sürgülü dijital kumpas, Mitutoyo marka 0.01mm hassasiyetli üçayaklı mikrometre ölçüm aleti, PCE-PHD1 marka PH metre, PCE-THB 40 nem, basınç ve sıcaklık ölçer cihazı, problu termometre ve temazsız yüzey ısıölçer(Ebro TFI 250 lazer termometre. 85055 Ingolstadt. Almanya) cihazı, 0.001mm/0.0001” lik Mitutoyo marka elektronik dijital mikrometre 0.1 mm ölçekli sabit bir cetvel, AND marka 0.0001 g hassasiyetli terazi kullanılmıştır.

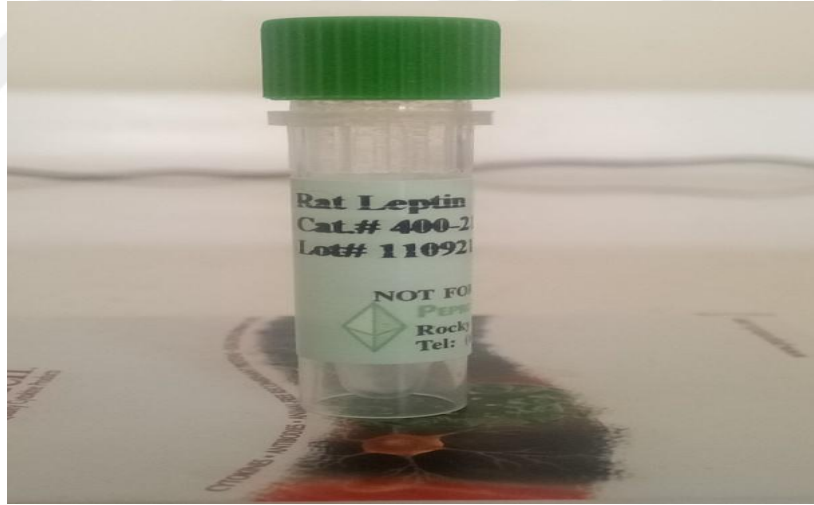
3.1.3. Kimyasal materyaller

3.1.3.1 Fosfat tampon çözeltisi (PBS)

Proje denemesinde kullanılan leptin hormonu çözülebilmesi için SIGMA firmasının phosphate buffered saline (PBS) ürünü olan tablet 200 ml de-iyonize saf suda çözdürülerek 0.0027 M potasyum klorid ve 0.137 M sodyum klorid içeren 0.01 M pH 7.4 ve 25 °C’de PBS elde edilmiştir. Bu işlem 5 defa tekrarlanarak toplam 1000 ml PBS çözeltisine ait stok solüsyon elde edilmiştir.

3.1.3.2. Saf leptin hormonu

Ticari ismi PEPROTECH olan 1 mg leptin Recombinant rat leptini (CAT: 400-21) denemede kullanılmıştır (3.1).



Şekil 3.1.Saf leptin hormonu.

Hazırlanan PBS çözeltisine ait stok solüsyonunda leptin hormonu iki farklı doz düzeyini oluşturulabilmek için 2 farklı düzeyde solüsyon hazırlanmıştır. PEPROTECH marka 1 mg rat leptini 1 ml daha önceden hazırlanan PBS’de çözdürülerek stok solüsyon oluşturulmuştur (1000 µl stok solüsyon 1000 µg leptin içerir). Bu solüsyondan 500 µl alınarak 50 ml’e PBS eklenmiştir. Bu 50000 µl PBS çözeltisi içinde 500 µg leptin 100 µl PBS çözeltisi içinde 1 µg leptin (L1: 1 µg leptin/100 µl PBS) içermekte

olup. 100 adet yumurta örneği için hazırlanan bu solüsyon kullanılmıştır. Bir diğer leptin grubu olan 0.5 µg leptine eş değer solüsyon hazırlığı için 500 µl stok solüsyon alınarak 100 ml PBS tamponu eklenmiş ve 100000 µl çözelti 500 µg leptin içeriğine sahip olup 100 µl PBS çözeltisi içinde 0.5 µg leptin (L0.5: 0.5 µg leptin/100 µl PBS) içeriği 100 adet yumurta örneği için kullanılmıştır.

3.1.4. Yem Materyali

Denemeye ait yem materyali ticari bir firma olan BANVİT A.Ş.'den temin edilmiş ve etlik civciv başlangıç yemine ait besin madde değerleri Çizelge 3.3.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.3. Etlik civciv başlangıç yemine ait besin madde değerleri.

Yem bileşenleri	Besin madde düzeyi
Kuru madde. %	89.7
Su. %	10.3
HP. %	23.3
HY. %	4.49
HK	5.94
NaCl. %	0.61
Ca. %	0.99
P. %	0.60
ME. kcal/kg	2804.03

3.2. Yöntem

3.2.1. Deneme deseni

Deneme materyali olarak kullanılan toplam 425 adet kuluçkalık yumurtaların 25 adedinde kuluçkadan önce yumurta ve kabuk kalite özellikleri ölçülmüştür. Geriye kalan toplam 400 yumurta numaralandırılarak 0.01 g hassasiyetli terazide yumurta ağırlıkları ölçüldükten sonra her bir grupta 4 tekerrür olacak şekilde (25 yumurta/tekerrür/grup) 100 adet yumurta/grup olarak kuluçka makinesine yerleştirilmiştir. Kuluçkaya yumurtaların yerleştirilmesinden önce ortalama yumurta ağırlığı 63.43 ± 0.39 g olarak saptanmış ve oluşturulan her bir grup için yumurta

ağırlıkları 63.00 ile 63.87 g olarak değişmiştir. Deneme desenini oluşturan gruplar aşağıda verildiği şekildedir:

- 1.grup: Kontrol (K) (n=100 yumurta/grup; 25 yumurta/tekerrür)
- 2.grup: fosfat tampon çözeltisi (PBS):100 µl PBS çözeltisi (n=100 yumurta/grup; 25 yumurta/tekerrür)
- 3.grup: L_{0.5} (L_{0.5}: 0.5 µg leptin/100 µl PBS) 0.5 µg-leptin + 100µl PBS çözeltisi (n=100 yumurta/grup; 25 yumurta/tekerrür)
- 4.grup: L₁ (L₁: 1 µg leptin/100 µl PBS) 1µg-leptin + 100µl PBS çözeltisi (n=100 yumurta/grup; 25 yumurta/tekerrür)

Kuluçkaya girişten 8 saat önce 27 °C’de ön ısıtma yapılmıştır. Kuluçkanın 12. gününde her bir grupta döl kontrolü yapılarak dölsüz yumurtalar ve ölümler saptanmıştır. Dölsüz yumurtalar işaretlenerek çıkışa kadar makinedemuhafaza edilmiştir. Kuluçkanın 18. gününde embriyolu yumurtalar tepsilere transfer edilerek tekerrürler korunmuştur. Kuluçkanın 472 ile 496. saatleri arasında çıkış yapan dişi ve erkek civcivler makinada kuruma için bekletilerek kuruyan civcivler çıkış zamanlarından yaklaşık 3 saat sonra her bir grup için farklı büyütme birimine yerleştirilmiştir.

3.2.2. Ölçülen parametreler

3.2.2.1. Yumurta kalite özellikleri

Çalışmada ön görülen genotipten elde edilen 25 yumurtanın 15 adedinde;

Denemeden önce kalite özelliklerinin saptanması için ayrılan yumurtaların 15 âdetinde ölçümler yapılmıştır. Denemede kullanılan yumurtalarda ağırlık ölçümleri 0.01 mg hassasiyetli terazi kullanılarak numaralandırma işlemi yapıldıktan sonra kaydedilmiştir. Mitutoyo marka 0.01 mm hassasiyetli bir kumpas ile yumurta genişliği (mm) ve yumurta uzunluğu (mm) ölçülmüştür. Yumurta şekil indeksi aşağıdaki formüle göre saptanmıştır.

$$\text{Yumurta şekil indeksi} = \text{yumurta genişliği (mm)} / \text{yumurta uzunluğu (mm)} \times 100 \quad (3.1)$$

Aynı yumurta örneklerinin hava boşluğuna ait alan yumurtanın küt ucunda bulunan hava boşluğunun eni ve uzunluğu en uç noktalardan 0.01 mm hassasiyetli sürgülü kumpas kullanılarak ölçülmüş kayıt altına alınmıştır.

Sarı ve ak yüksekliği ölçümü için oda sıcaklığında yumurtalar kırıldıktan sonra düz bir cam üzerine yerleştirilmiş olan 0.01 mm hassasiyetli üçayaklı kumpas aleti kullanılarak sarı ve ak yükseklikleri kaydedilmiştir.

Aynı 15 âdet sarı ve ak örneğinin bulunduğu beherde ak ve sarı PH sına ait ölçümler PH metre cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Aynı yumurtalarda kabuk yüzey alanı (cm^2) = $3.9782 \times \text{yumurta ağırlığı}^{0.7056}$ (Carter. 1975) (3.2) formülü ile hesaplanmıştır. Kabuk kalite özelliklerini içeren kabuk ağırlığı 0.001 mg hassasiyete sahip terazide ölçülmüştür. Her bir yumurtanın küt, orta ve sivri kısımlarından bir makas yardımı ile zarı ayrılmış kabuk parçalarının 0.001mm/0.0001" lik elektronik dijital mikrometre ile kabuk kalınlığı ölçülmüş ve her bir yumurta kabuğunun ortalama kabuk kalınlığı hesaplanmıştır.

Günlük ortalama yumurta su kaybı (günde mg kaybedilen su miktarı, kabuk geçirgenliği (günde mg / torr), nispi yumurta kabuğu iletkenliği (mg / gün) ve por sayısı ikinci bir set yumurta olan 10 adet yumurta için saptanmıştır (Peebles ve McDaniel, 2004).

Her bir yumurtanın başlangıç ağırlığı, alındıktan sonra 23.6 °C'de 22.24 mm Hg'lık bir basınç ortamına sahip desikatör ortamında yumurtanın mg cinsinden kaybettiği su miktarı günlük olarak her gün aynı saatte 0.0001 g hassasiyetli terazide 4 farklı günde ölçüldükten sonra günlük ortalama su kaybı iç ve dış ortam arasındaki su buharı basınç değişimine (torr) bölünerek ortalama günlük yumurta ağırlık kaybı hesaplanmıştır. Desikatöre ait 4 günlük süre boyunca tüm sıcaklık, barometrik basınç, ortalama günlük yumurta ağırlığı kayıt altına alınmıştır. Bu ortam sıcaklığı, barometrik basınç ve günlük yumurta su kaybı değerleri kullanılarak kabuk geçirgenliği hesaplanmıştır.

Kuluçkadan önce ayrılan 25 adet yumurtanın geriye kalan 10 adedinde gözenek sayısının ölçülmesi için yumurta kabukları 3 saat 50 °C'de kurutulduktan sonra yumurta kabuğunun büyük ucunun ortasına doğru küçük bir delik açılmıştır. Yumurta kabuğu 30 dakika boyunca 1 L % 70 etanol içinde 0.5 g % 89'luk metilen mavisi kristallerinin çözülmesiyle hazırlanan bir boya çözeltisi ile doldurulmuştur (Peebles ve

McCruden.,2004). Gözenek sayısı her bir 0.25 cm² alan dikkate alınarak yumurta kabuğunun sivri, orta ve küt alanlarından her birinde 10 alan olacak şekilde 40x büyütme altındaki bir merceğe sahip stereo-mikroskop kullanılarak 0.25 cm²'lik bu alanlar içinde bulunan boyanmış tüm gözenekler sayılmıştır (Babacanoğlu ve ark., 2018). Gözenek sayısı aynı 10 yumurtada kabuğun küt, orta ve sivri ucuna sahip gözeneklerin ortalaması alınarak her bir yumurta için ortalama gözenek sayısı tespit edilmiştir. Aynı kabuklarda kabukların por çapları (Leica ICC50 HD software 4*10 büyütme kullanılarak her bir pordan 3 adet örnekleme alınarak bu örneklerin ortalamasına göre por çaplarına ait değerler tespit edilmiştir. Yumurtanın kalite özellikleri saptanan 15 adet yumurtanın 8 adet sarı örneği alınarak ELİSA yöntemi kullanılarak leptin düzeyi saptanması amacı ile -20°C de analize kadar bekletilmiştir.

3.2.2.2.Yumurta kabuk sıcaklığı

Kuluçkanın 3. 7. 11. 15 ve 19. günlerinde her gruptan rastgele seçilen 15 yumurtada, yumurta kabuk sıcaklığı (embriyo sıcaklığı) EBRO IR-thermometer TFI 550 marka temazsız yüzey ısı ölçerin (Ebro TFI 550.85055 Ingolstadt Almanya) lazerli ölçüm başlığına denk gelecek şekilde her bir yumurtanın küt uç ile ekvator bölge arasında kalan site 3. günde işaretlenmiş ve ölçüm alınmıştır. Aynı noktadan geriye kalan ölçüm günlerinde de bu noktadan ölçümler tekrarlanmıştır.

3.2.2.3. In ovo yöntemin uygulanması

IO uygulamasından önce yumurta sıcaklığı ve neminin düşmemesi için gerekli ortam sıcaklığı ve nem kuluçkahane ortamında sağlanmıştır. Embriyoda büyüme hormonunun salınmaya başladığı kuluçkanın yedinci gününden 6 saat sonra (kuluçkanın 174. saati) IO enjeksiyon uygulaması yapılmıştır. Hazırlanan leptin – (PBS) solüsyonu ile L0.5 + PBS ve L1 + PBS solüsyonları her üç enjeksiyon grubunda farklı tekerrürlerden alınan yumurtaların enjeksiyon sitesi % 70 lik etanolla temizlendikten sonra küt uç aşağı doğru 45° eğim yapacak şekilde yumurta 22 G iğne kullanılarak önce delinmiş ve 26 G iğneye sahip yarı otomatik enjektör kullanılarak doğrudan yumurta sarısına solüsyonlar enjekte edilmiştir. Grup dozlarına göre sırasıyla ; (PBS) 100 µl/100

yumurta; ($L_{0.5}$) 0.5 μg -leptin + 100 μl PBS/100 yumurta; (L_1) 1 μg -leptin + 100 μl PBS/100 yumurta olacak şekilde solüsyonlar bu dozlara göre enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonrasında yumurtada açılan delikler parafin ile kapatılmış ve enjeksiyonyapılan yumurtalar hızlı şekilde kuluçka makinasına tekrar yerleştirilmiştir. Enjeksiyon işleminden 4 saat sonra (kuluçkanın 178. saati) her gruptan 8 adet yumurta örneği rasgele seçilerek (enjeksiyon yapılmayan kontrol grubu dahil) sarı keseler embriyodan ayrılmış ve -20 °C’de leptin hormon düzeyinin analizine kadar saklanmıştır.



Şekil 3.2. IO enjeksiyon uygulaması

3.2.2.4. Morfolojik özellikler ve oransal asimetri

Kuluçkada 15 günlük embriyoda, çıkışta (günlük civcivlerde) ve 7 günlük civcivlerde, her gruptan rasgele seçilen 8 adet embriyo/erkek civciv üzerinde gaga, kafa çapı, sağ ve sol incik, orta parmak ve yüz uzunlukları 0.01 mm hassasiyetli sürgülü kumpas ile ölçülmüştür. Bu örneklerden leptin hormon düzeyini belirlemek için sarı ve kalıntı sarı kese örnekleri ayrılarak -20 °C’de ekstraksiyon işlemine kadar saklanmıştır. Oransal asimetri değerinin hesaplanabilmesi için çift yönlü özellikler olan incik ve orta parmak için ölçümler 3 kez tekrarlanmış ve ortalama değerler üzerinden oransal asimetri aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Yalçın ve Siegel, 2003; Babacanoğlu ve ark., 2015).

Oransal asimetri = $\frac{|\text{sol ölçüm} - \text{sağ ölçüm}|}{(\text{sol ölçüm} + \text{sağ ölçüm}/2)} * 100$ (3.3).

Sağ ve sol orta parmak uzunluğu üçüncü ayak parmağının başlangıcından üçüncü ayak parmağının ucuna kadar olan kısım ölçülmüştür (Babacanoğlu ve ark.,2015).

Vücut Uzunluğu: Aynı örneklerde vücut uzunluğusağ kanat en altta kalacak şekilde yatırılan embriyo/civcivlerin gaga ucundan başlanarak ayak 3. parmağın en uç noktasına kadar yatay düzlemde cetvel üzerinde ölçüm gerçekleştirilerek saptanmıştır (Deeming, 2005; Meijerhof, 2006; Willemsen ve ark., 2008; Babacanoğlu ve ark., 2015). Sağ ve sol yüz uzunluğu: Kulak deliğinden gaganın birleşim noktasına kadar ölçülmüştür (Babacanoğlu ve ark.,2015). Sağ ve sol incik: metatarsus kemiğinin ucundan ayak tabanının başladığı noktaya kadar ölçülmüştür (Hill, 2001; Deeming, 2005). Kafa çapı: kulak deliğinden diğer kulak deliğine kadar olan mesafe sürgülü kupmas kullanılarak ölçülmüştür (Babacanoğlu ve ark.,2015). Gaga uzunluğu: gaga ucundan gaganın birleşim noktasına kadar ölçülmüştür (Babacanoğlu ve ark.,2015).

3.2.2.5. Embriyosarı kese ve organ ağırlıkları

Kuluçkanın 15. gününde her gruptan rasgele seçilen 10 adet yumurta tartıldıktan sonra kabuğu kırılarak çıkarılan embriyolar servikal dislokasyondan sonra embriyo çıkartılmış, sarı kese embriyodan ayrıldıktan sonra embriyo kâğıt havlu ile hafifçe kurularak embriyo ağırlığı ölçülmüştür. Embriyodan karaciğer, akciğer, kalp, beyin, bursa fabricius, dalak, proventrikülüs +taşlık ve göğüs kası ağırlıkları saptanmıştır. Aynı ölçümler çıkıştan sonra incelenecek bütün özelliklerin eşeye göre etkisini elemine etmek amacı ile her gruptan rastgele seçilen; çıkışta ve çıkış sonrası 7 günlük 8 adet erkek civcivdetekrarlanmıştır.

Kuluçkadan önce 8 adet yumurta sarısında, kuluçkanın 15. gününde ve çıkışta her bir gruba ait 8 adet sarı kese/kalıntı sarı kese örneklerleptin hormon düzeyini belirlemek için -20 °C de muhafaza altına alınmıştır.

3.2.2.6. Yumurtada su kaybı

Kuluçkanın 18. gününde her bir gruba ait 20 adet yumurta 0.01mm hassasiyetli terazi kullanılarak tartılmış yumurta su kaybı hesaplanarak (Willemsen ve ark., 2010) kayıt altına alınmıştır.

$$\text{Yumurta su kaybı}(\%) = \frac{\text{Kuluçka giriş yumurta ağırlığı} - 18. \text{ gün yumurta ağırlığı}}{\text{Kuluçka giriş yumurta ağırlığı}} \times 100 \quad (3.4)$$

3.2.2.7. Kuluçka sonuçları

Her bir grup için toplam kuluçka süresi kuluçkanın 460. saatinden itibaren tamamlanıncaya kadar her 4 saatte bir kabuğu delenler ve çıkanların yumurta numaraları kayıt altına alınmıştır. Döllülük oranı, çıkış gücü, kuluçka randımanı ve embriyo ölümleri erken (embriyo yaşının 1 ile 6. günleri), orta (embriyo yaşının 7 ile 17. günleri) ve geç (embriyo yaşının 18 ile 21. günleri) ile kabuğu delen ancak çıkamayanlar kabuk altı ölümler olarak sınıflandırılmıştır (Tona ve ark.,2001)ve aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Döllülük oranı } \% = \text{Döllü yumurta} / \text{Dölsüz yumurta} \times 100 \quad (3.5)$$

$$\text{Çıkış gücü } \% = \text{Çıkan civciv} / \text{Döllü yumurta} \times 100 \quad (3.6)$$

$$\text{Kuluçka randımanı } \% = \text{Çıkan civciv} / \text{Toplam konan yumurta} \times 100 \quad (3.7)$$

$$\text{Erken ölüm } \% = \text{Ölen embriyo} / \text{Döllü yumurta} \times 100 \quad (3.8)$$

$$\text{Orta ölüm } \% = \text{Ölen embriyo} / \text{Döllü yumurta} \times 100 \quad (3.9)$$

$$\text{Geç ölüm } \% = \text{Ölen embriyo} / \text{Döllü yumurta} \times 100 \quad (3.10)$$

$$\text{Kabuk altı ölüm } \% = \text{Ölen embriyo} / \text{Döllü yumurta} \times 100 \quad (3.11)$$

3.2.2.8. Rektal sıcaklık

Çıkışta, her gruptan rastgele seçilen 8 adet erkek civcivde dijital bir termometre yardımı ile kloak içine yaklaşık 1.2 cm termometreye ait probun yerleştirilmesi ile ölçüm yapılarak rektal sıcaklıklar kaydedilmiştir (Babacanoğlu, 2018).

3.2.2.9. Etlik civciv performansı

Çıkıştan itibaren 7 günlük yaşa kadar etlik civciv başlangıç yemi ile beslenen civcivler standart büyütme koşulları altında büyütülmüşlerdir (Yalçın ve Koçak, 2009). Bir haftalık performans değerlerine ait sonuçlar aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

Cinsiyet oranı: Dişi civciv/Toplam civciv x 100; Erkek civciv/Toplam civciv x100

Ölüm oranı %= Ölen civciv sayısı/Canlı civciv sayısı x 100 (3.12)

Yaşama gücü %=100- Ölüm oranı(3.13)

Toplam yem tüketimi = Kalan yem miktarı - Tüketilen yem miktarı (3.14)

Yemden yararlanma =Tüketilen yem miktarı (g)/ Canlı ağırlık (g)(3.15)

Günlük canlı ağırlık artışı= 7. gün canlı ağırlık/7.gün (3.16)

3.2.2.10. Hareketsiz kalma süresi

Her gruptan çıkışa ait ölçümleri yapılan kanat numarası belli 7 günlük yaştaki 8 adet erkek civcivde korku davranışının bir ölçümü olan hareketsiz kalma süresi ve bu süreye ait müdahale sayısı civcivlerden kan alımından önce ölçülmüştür. Karanlık bir odada ahşap bir düzenek içine serilmiş odun talaşı üzerine sırt üstü yatırılmış civcivin başı aşağı sarkacak şekilde. uyutan kişinin bir eli civcivin göğsüne temas ettikten sonra 15 sn beklenmiş uyuma gerçekleşmiş ise el civcivin göğsünden yavaşça çekilip hareketsiz kaldığı süre kronometre ile ölçülmüştür. Civciv 10 sn içinde hareket ederse bu uyutma işlemi 2 defa daha tekrarlanmıştır. Hareketsiz kalma süresi 600 sn'ye ulaştığında işlem sonlandırılarak başka bir civciv üzerinde işlem tekrarlanmıştır (Babacanoğlu, 2010).

3.2.2.11. Kan serumu biyokimyasal analizleri

Çıkışta her gruptan rastgele seçilen 8 erkek civcivde cerrahi işlem olmaksızın alınan kan örnekleri ELISA yöntemi ile leptin hormon düzeyi ve biyokimyasal analizlerin (serbest tri-iodotironin (T₃) ve tiroksin (T₄), low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL), very low density lipoprotein (VLDL) trigliserid, kreatin kinaz, ürik asit, kolesterol, toplam protein saptanması amacı ile kan tüplerine

alınmıştır. Kan tüpleri Van YYÜ Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü laboratuvarında SİGMA 3 30 K marka soğutmalı santrifüj cihazı kullanılarak 4 °C de 3750 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen kan serumu analizler için ependorf tüplere aktararak -20 °C de muhafaza edilmiştir.

Serum örnekleri özel bir biyokimya laboratuvarında Roche CREJ2 Cobas İNTEGRA 400 plus ve Cobass E 411-USA otoanalizör cihazları ve bunlara ait ticari kitler (Cobas-ROCHE) kullanılarak biyokimyasal analizler yapılmıştır.

Kolesterol: Enzimatik kolorimetrik yöntemle serum örneği ve kolesterol kitinden (CHOL2 Kit) 142 µl kullanılarak 512/659 nm dalga boyunda okutulmuştur.

Toplam Protein: kolorimetrik yöntemle serum örneği ve toplamprotein kitinden (TP2 kit) 152 µl kullanılarak 552/659 nm dalga boyunda okutulmuştur.

HDL: Homojen kolorimetrik yöntemle serum örneği ve HDL kitinden (HDL C4 kit) 169.5 µl kullanılarak 583/659 nm dalga boyunda okutulmuştur.

Ürik asit: Enzimatik kolorimetrik yöntemle serum örneği ve ürik asit kitinden (UA2 Kit) 134 µl kullanılarak 552/659 nm dalga boyunda okutulmuştur.

Trigliserid: Enzimatik kolorimetrik yöntemle serum örneği ve trigliserid kitinden (TRIGL Kit) 150 µl kullanılarak 512/659 nm dalga boyunda okutulmuştur.

Keratin Kinaz: UV test yöntemi ile serum örneği ve keratin kinaz kitinden (CK Kit) 12.75 µl kullanılarak 340/552 nm dalga boyunda okutulmuştur.

Serbest T₃: Rutenyum kompleksiyle işaretlenmiş spesifik anti-T₃ antikoru ve T₃ kiti (FT3Kit) yarışma test yöntemi ile serum örneğinden 15 µl alınarak toplam 18 dakika boyunca otoanalizör cihazda ölçülmüştür.

Serbest T₄: Rutenyum kompleksiyle işaretlenmiş spesifik anti-T₄ antikoru ve T₄ kiti (FT4 II Kit) yarışma test yöntemi ile serum örneğinden 15 µl alınarak toplam 18 dakika süreyle otoanalizör cihazında ölçülmüştür.

LDL ve VLDL ise hesap yolu ile saptanmıştır.

$$\text{LDL} = \text{Kolesterol} - (\text{HDL} + \text{Trigliserid}/5) \quad (3.17)$$

$$\text{VLDL} = \text{Trigliserid}/5 \quad (3.18)$$

3.2.2.12. ELİSA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntemi

3.2.2.12.1. Sarı ve sarı kese ekstraktlarının hazırlanması

Deneme başlangıcında yumurta kalite özellikleri saptanan yumurtaların 8 adedinin sarı örnekleri, kuluçkanın 7. gün 12 saat sonra IO enjeksiyonundan sonra ve 15. gün her bir gruba ait rasgele seçilen 8 adet embriyoların sarı keseleri ile birlikte çıkış yapan günlük erkek civcivlere ait kalıntı sarı kese (8 yumurta/grup) örneklerinde leptin hormon düzeyi ELİSA yöntemine göre saptanmıştır. Sarı/sarı kese ve kalıntı sarı kese örneklerinde analizden önce tüm örnekler ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. ELİSA analizine kadar -20 °C'de tutulan yumurta sarı, sarı kese ve kalıntı sarı kese örnekleri her örnekten yaklaşık 20–30 mg 0.001 mg hassasiyetli terazi kullanılarak tartılmıştır.

Elde edilen örnek ağırlığı dokuz katı ile çarpılarak eklenecek potasyum klorür (KCL) 140 mmol solüsyonunun hacmi belirlenmiştir. Hazırlanan örnekler 1 dakika süre ile homojenizatörde homojenize edildikten sonra homojenatlar santrifüj cihazında 3750 rpm'de 10 dakika süreyle 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen üst fazdaki supernatan ependorf tüplere 200 µl olarak transfer edilmiştir. Her bir supernatan üzerine 1 ml KCL eklenerek 1 dakika süreyle vortekslenmiştir. Tüm örnekler 3750 rpm 15 dakika boyunca 4°C'de tekrar santrifüj edilmiş ve bu işleminden sonra her bir örnek 200 µl alınarak numaralanarak ependorf tüplere aktarılıp analize kadar -20 °C'de bekletilmiştir.

3.2.2.12.2. Kan serumu ve sarı/sarı kese örneklerinde leptin hormon düzeyinin

ELİSA yöntemine göre analizi

Ticari bir markanın (Rel Assay Diagnostics Chicken LEP ELISA kit Türkiye) 2 adet leptin hormon kiti kullanılmıştır. Leptin hormon düzeyleri tavuğa spesifik olan 96 testlik. Kitler aracılığı ile enzimatik immuno-sorbent assay analizine dayalı çift antikor sandviç metodu ile çalışan yıkama ünitesi Biotek marka ELISA okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Yöntemin aşamaları aşağıdaki gibi sıralanmıştır:

1. Kit ve kite ait solüsyonlar analizden 30 dakika önce oda sıcaklığında bekletilmiştir.
2. İlk kuyucuk olan kör kuyucuğuna 50 µl biyotin antijen eklenmiştir.
3. 2.3.4.5.6 ve 7. Kuyucuklara standart solüsyonlar hacimlerine göre (60ng/ml, 120ng/ml, 240ng/ml, 480ng/ml, 960ng/ml, 1920ng/ml) 50µl olacak şekilde pipetlenmiştir.
4. 96 lık plate üzerine kör ve standartlar dışında kalan kuyucuklara eksrakt sarı örnekleri ve serum örnekleri 50µl olacak şekilde pipetlenmiştir. 4.kör kuyucuğu hariç tüm kuyucuklara 50µl biyotiniyle antijeninden 50µl çalışma solüsyonu eklenmiştir.
5. Plate 60 dakika boyunca 37 °C’de inkübatörde inkübe edidi.
6. Plate inkübatörden alınarak Biotek marka ELİSA yıkama cihazında 5 defa 300 ml 25 kat deiyonize saf su ile seyreltilen yıkama solüsyonu ile yıkama gerçekleştirilmiştir.
7. Standart 50µl avidin-HRP kör hariç tüm kuyucuklara pipetlenmiştir.
8. Plaka 60 dakika boyunca 37 °C’de inkübatörde inkübe edilmiştir.
9. Altıncı maddede açıklanan yıkama işlemi bu aşamada tekrarlanmıştır.
10. Kör dahil tüm kuyucuklara 50µl renkli substrat (Chromogen solüsyon) eklenmiştir.
11. Renklendirme işlemi için karanlıkta 10 dakika bekletme yapılmıştır.
12. Reaksiyonu durdurmak için her bir kuyucukta 50µl stop solüsyon eklenmiştir.
13. Bu işlemden sonra 10 dakika içinde Biotek ELx800 marka Elisa okuyucuda standart ve örneklere ait absorbanslar elde edilmiştir. Standart konsantrasyonlarına göre çizdirilen grafiğin OD değeri ile standart eğrinin regresyon denklemi hesaplanmıştır. Bu hesaplamaya göre absorbans değerler formülde yerine konduğunda sarı/sarı kese ve serum leptin hormon düzeyleri elde edilmiştir.

3.2.3 İstatistik analiz

İstatistik analiz, SAS paket programında (SAS, 2009) ANOVA kullanılarak ana etkiler (grup, yaş) ve bunlara ait ikili interaksiyonlar modelde yer almıştır. Ortalamaların karşılaştırılması için TukeyHSD testi ve önemlilikler için $P < 0.05$ düzeyi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Yumurta Kalite Özellikleri

Kuluçkadan önce saptanan ortalama yumurta ağırlığı 65.54 g, yumurta şekil indeksi % 80.01, sarı ağırlığı 20.17 g, ak ağırlığı 33.80 g, kabuk ağırlığı 6.86 g, hava boşluğu alanı 12.48 mm, hava boşluğu çapı 20.94 mm, ak yüksekliği 6.04 mm, sarı yüksekliği 19.01 mm, ak pH'sı 9.21, sarı pH'sı 6.47, kabuk yüzey alanı 76.09 cm², kabuk kalınlığı 33.01 µm, kabuk geçirgenliği 8.92 mg torr H₂O/gün, por sayısı 26.65 adet/yumurta, por çapı 22.06 µm olarak ölçülmüştür.

4.2. Yumurta Kabuk Sıcaklıkları ve Rektal Sıcaklık

Kuluçkanın 7. 11 ve 19. gününe ait kabuk sıcaklıkları üzerine IO uygulamanın etkisi önemli saptanırken kuluçkanın 15. gününde IO uygulamanın etkisi önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.1). Kuluçkanın 7. gününde IO leptin gruplarında kabuk sıcaklıkları kontrol grubuna göre önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur. Kuluçkanın 11. gününde L_{0.5} grubunun kabuk sıcaklığı diğer gruplardan önemli düzeyde daha düşük saptanmıştır. Kuluçkanın 19. gününde leptin uygulama grupları ve PBS grubu kontrolden önemli düzeyde daha düşük kabuk sıcaklıklarına sahip olmuştur (Çizelge 4.1). Rektal sıcaklık üzerine gruplar arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. IO uygulamasının yumurta sıcaklığı ve çıkışta günlük civcivlerin rektal sıcaklıkları üzerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar

	7. gün	11. gün	15. gün	19. gün	Rektal sıcaklık
IO uygulama (grup)	°C	°C	°C	°C	°C
K	35.38±0.11 ^c	37.46±0.12 ^a	37.82±0.14	38.14±0.21 ^a	37.87±0.35
PBS	36.92±0.11 ^a	37.50±0.12 ^a	37.82±0.14	37.16±0.21 ^b	38.44±0.35
L _{0.5}	37.02±0.11 ^a	36.92±0.12 ^b	37.49±0.14	37.05±0.21 ^b	38.56±0.35
L ₁	36.48±0.11 ^b	37.58±0.13 ^a	37.88±0.14	37.13±0.21 ^b	38.76±0.35
P önemlilik düzeyleri	<0.0001	0.003	0.235	0.001	0.342

^{a,b,c}Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.05). K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0.5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁: 1µg- leptin+100µl PBS.

4.3. Yumurta Sarısı ve Sarı Kese Leptin Düzeyi

IO leptin uygulamasının yumurta sarısı leptin düzeyine ait ortalamalar Çizelge 4.2’te verilmiştir. Çizelgeden anlaşılacağı üzere IO leptin uygulamasının yumurta sarısı leptin düzeyine etkisi istatistiksel olarak önemli saptanmamıştır ($P>0.05$). IO uygulama grupları arasında leptin düzeyi $L_{0.5}$ grubunda 661.20 ng/ml ve L_1 grubunda 618.89 ng/ml olarak tespit edilirken, en yüksek leptin düzeyi kontrol grubunda 669.31ng/ml olarak tespit edilmiştir.

Kuluçka öncesi yumurta sarısında, kuluçkada ve çıkışta sarı kesede leptin hormon düzeyleri Çizelge 4.2’de incelendiğinde en yüksek leptin düzeyi kuluçkanın 7. gününde (kuluçkanın 180. saatinde) IO uygulamasından 6 saat sonra 754.17 ng/ml seviyesinde ölçülmüştür. Kuluçka öncesi yumurta sarısı leptin düzeyi, kuluçkanın 15. gününde ve çıkışta sarı kesedeki leptin düzeyine kıyasla istatistik olarak daha yüksek saptanmıştır ($P<0.001$). Çıkışta kalıntı sarı ve kuluçka öncesi yumurta sarısındaki leptin düzeyi arasındaki farklar önemsizdir ($P>0.05$). Leptin düzeyi kuluçkanın 15. gününde diğer günlerdeki yumurta sarısı veya sarı kesedeki leptin düzeylerinden önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur ($P<0.001$). IO leptin enjeksiyon uygulaması ve yaş arasındaki interaksiyon önemli saptanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. IO uygulaması ve yaşın sarı ve sarı kese leptin düzeyine etkisine ait ortalama ve standart hatalar

	Sarı leptin düzeyi
IO uygulama (grup)	ng/ml
K	669.31±20.82
PBS	657.55±20.82
$L_{0.5}$	661.20±21.28
L_1	618.89±20.82
Yaş	
Kuluçka öncesi	658.46±32.50 ^b
Kuluçkanın 7.günü	754.17±16.79 ^a
Kuluçkanın 15.günü	567.92±18.40 ^c
Çıkış	668.01±17.08 ^b
P önemlilik düzeyi	
Grup	0.330
Yaş	<0.001
Grup x Yaş	0.031

^{a,b,c} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ($P<0.05$).

K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; $L_{0.5}$: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L_1 : 1µg-leptin+100µl PBS.

IO uygulama ve yaşa göre interaksiyon sarı kese leptin düzeyi en yüksek değerine $819.29 \pm 30.68 \text{ ng/ml}$ ile kuluçkanın 7. günü kontrol grubunda saptanmıştır (Çizelge 4.3). Kuluçkanın 15. gününde kontrol grubu (520.62 ng/ml), PBS grubu (584.19 ng/ml), $L_{0.5}$ grubu (660.69 ng/ml) ve L_1 grubu (492.82 ng/ml) arasındaki farklar istatistik olarak önemlidir ($P < 0.05$). Bu farklara göre, $L_{0.5}$ grubuna ait 15 günlük yaşta embriyoların sarı keselerinin leptin düzeyi diğer gruplara göre en yüksek düzeyde saptanmıştır. Çıkışta, $L_{0.5}$ grubu diğer gruplardan daha düşük kalıntı sarı kese leptin düzeyine sahip olmuş, ancak bu sonuç diğer gruplara benzer olarak elde edilmiştir. Kuluçkanın 15. gününde L_1 grubunda 492.82 ng/ml olan sarı kese leptin düzeyindeki en düşük ortalama değer IO uygulaması (grup) ve yaş arasındaki interaksiyonun önemli bulunmasına yol açmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. IO enjeksiyon uygulama ve yaş arasındaki interaksiyonun sarı kese leptin düzeyine etkisine ait ortalamalar ve standart hatalar

Yaş (gün)	IO uygulama (grup)	Sarı leptin düzeyi ng/ml
Kuluçka 7.gün	K	819.29 ± 30.68^a
	PBS	719.67 ± 30.65^b
	$L_{0.5}$	741.22 ± 32.73^{ab}
Kuluçka 15.gün	L_1	711.86 ± 35.22^{bc}
	K	520.62 ± 37.65^{bcd}
	PBS	584.19 ± 32.77^b
Çıkış	$L_{0.5}$	660.69 ± 35.40^a
	L_1	492.82 ± 37.65^d
	K	668.01 ± 30.65^{ab}
	PBS	668.80 ± 30.65^{ab}
	$L_{0.5}$	595.98 ± 35.22^b
	L_1	651.99 ± 35.22^{ab}

^{a,b,c,d}Aynı yaş için aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ($P < 0.05$).

K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; $L_{0.5}$: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L_1 : 1µg-leptin+100µl PBS.

4.4. Serum Leptin ve Biyokimyasal Parametre Düzeyleri

IO leptin enjeksiyon uygulamasının çıkışta ve çıkış sonrası 7 günlük yaşta ki serum leptin, trigliserid, kolesterol, HDL, LDL, VLDL düzeylerine ait ortalamalar Çizelge 4.4'de sunulmuştur. IO leptin uygulamasının kan serum leptin düzeyi üzerine

etkisi istatistiksel olarak önemli saptanmamıştır ($P>0.05$). Gruplarda en yüksek kan serum leptin düzeyi L_1 grubunda, en düşük kan serum leptin düzeyi PBS grubunda elde edilmiştir (Çizelge 4.4). Kan serum leptin düzeyi üzerine yaşın etkisi oldukça önemli bulunmuştur ($P<0.001$). Leptin düzeyi 7 günlük yaştaki civcivlerin serumunda 564.70 ng/ml olan leptin düzeyi günlük yaştaki civcivlerin serumunda 388.86 ng/ml leptin düzeyine göre daha yüksek saptanmıştır (Çizelge 4. 4). Enjeksiyon uygulaması ve çıkış sonrası yaş arasındaki interaksiyon kan serum leptin düzeyi üzerine önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.4). Ancak, bu interaksiyona ait ortalamalar karşılaştırıldığında yaşın etkine bağlı olarak ortalamalar arasındaki farklar grafiksel olarak Şekil 4.1'de sunulmuştur. IO leptin enjeksiyon sonrası çıkışta kan serum leptin düzeyi en yüksek 7 günlük yaşta L_1 grubunda (592.26ng/ml) gerçekleştiği ve bunu sırasıyla $L_{0.5}$ grubu (572.63ng/ml), kontrol grubu (562.64ng/ml) ve PBS grubu (531.56 ng/ml) izlemektedir ($P>0.05$). Günlük yaştaki civcivlerin kan serum leptin düzeyinin en yüksek L_1 grubunda (430.43 ng/ml) gerçekleştiği daha sonra $L_{0.5}$ grubu (384.09 ng/ml) ve kontrol grubu (376.29 ng/ml) ile PBS grubunda (364.64 ng/ml) gerçekleştiği saptanmıştır ($P>0.05$) (Şekil 4.1).

IO leptin enjeksiyonu uygulamasının serum trigliserid, kolesterol, HDL, LDL ve VLDL düzeyleri üzerine etkisi önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$). Serum kolesterol, trigliserid ve VLDL üzerine yaşın etkisi oldukça önemli bulunmuştur ($P<0.001$). Serum HDL ve LDL üzerine yaşın önemli bir etkisi bulunmamıştır ($P>0.05$). Artan yaşla birlikte serum trigliserid, kolesterol ve VLDL düzeyleri azalmıştır (Çizelge 4.4). Serum HDL düzeyi için IO leptin enjeksiyon uygulaması ve yaş arasındaki interaksiyon önemli bulunmuştur (Çizelge 4.4). Bu interaksiyona ait sonuçlar Şekil 4.2'de sunulmuştur. Serum HDL düzeyi en yüksek IO leptin uygulama gruplarında 137.56mg/dl ile L_1 grubunda, 134.63 mg/dl ile $L_{0.5}$ grubunda günlük yaştaki civcivlerde gerçekleşmiştir. Bu interaksiyona ait ortalamalar karşılaştırıldığında 7 günlük yaşta kontrol grubu (121.58 mg/dl) ve PBS (125.16 mg/dl) grubunda yaşa bağlı serum HDL seviyeleri artarken L_1 grubunda (112.91 mg/dl) ve $L_{0.5}$ grubunda (120.9 mg/dl) serum HDL seviyesinde gerileme olduğu saptanmıştır (Şekil 4.2).

Çizelge 4.4. IO uygulaması ve yaşın serum leptin, trigliserid, kolesterol, HDL, LDL, VLDL düzeylerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar

	Leptin	Trigliserid	Kolesterol
IO uygulama (grup)	ng/ml	mg/dl	mg/dl
K	469.31±31.85	74.31±5.72	256.49±11.86
PBS	448.10±32.97	60.00±5.72	255.65±11.86
L0.5	478.37±32.97	68.00±5.72	241.05±11.86
L ₁	511.35±31.85	61.50±5.72	258.14±11.86
Yaş (Gün)			
0	388.86±21.80 ^b	75.03±4.04 ^a	336.78±8.39 ^a
7	564.70±22.52 ^a	56.87±4.04 ^b	168.88±8.39 ^b
P önemlilik düzeyleri			
Grup	0.587	0.278	0.7230
Yaş	<0.001	0.001	0.001
Grup x yaş	0.445	0.867	0.313

^{a,b,c} Aynı sütundafarklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir(P<0.05).

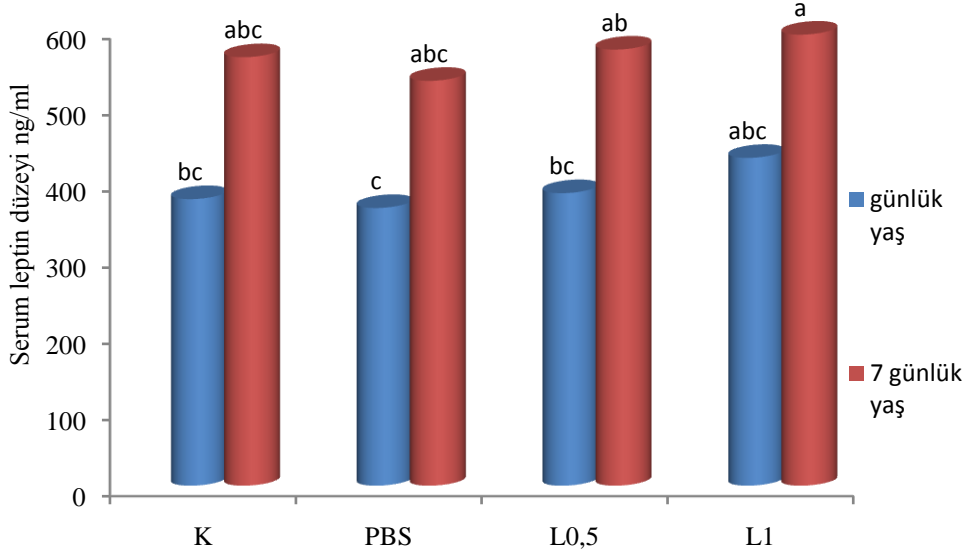
K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0.5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁:1µg-leptin+100µl PBS.

Çizelge 4.4. IO uygulaması ve yaşın serum leptin, trigliserid, kolesterol, HDL, LDL, VLDL düzeylerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar (devamı)

	HDL	LDL	VLDL
IO uygulama (grup)	mg/dl	mg/dl	mg/dl
K	120.70±4.42	121.62±4.53	14.84±1.14
PBS	123.64±4.42	123.64±4.53	11.98±1.14
L0.5	127.77±4.42	127.77±4.53	13.58±1.14
L ₁	125.23±4.42	125.23±4.53	12.28±1.14
Yaş (Gün)			
0	128.53±3.12	128.99±3.20	14.98±0.80 ^a
7	120.14±3.12	120.14±3.20	11.36±0.80 ^b
P önemlilik düzeyleri			
Grup	0.719	0.805	0.278
Yaş	0.632	0.561	0.025
Grup x yaş	0.009	0.126	0.869

^{a,b,c} Aynı sütundafarklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir(P<0.05).

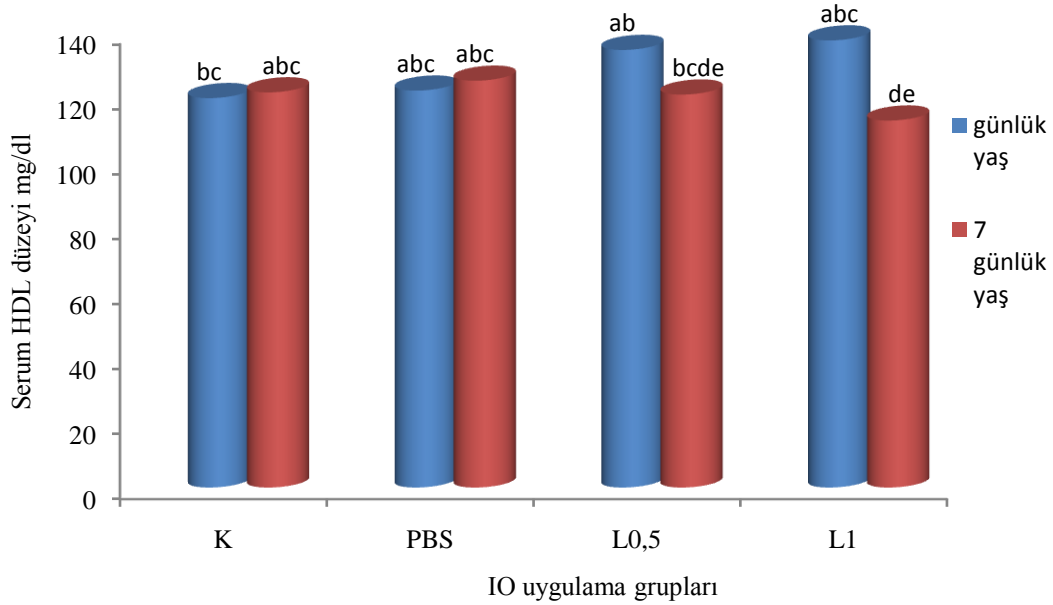
K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0.5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁:1µg-leptin+100µl PBS.



IO uygulama grupları

K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0,5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁:1µg-leptin+100µl PBS

Şekil 4.1 IO uygulama gruplarının yaşlara göre serum leptin düzeyine ait ortalamalar



K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0,5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁:1µg-leptin+100µl PBS.

Şekil 4.2. IO uygulama ve yaş etkileşiminin serum HDL düzeyi üzerine etkisine ait ortalamalar

Serum ürik asit düzeyi IO grupları arasında önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.5). Serum ürik asit düzeyi üzerine yaşın etkisi önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.5). Serum

ürük asit düzeyi üzerine grup ve yaş arasındaki interaksiyon önemli saptanmamıştır (Çizelge 4.5). Serum keratin kinaz düzeyinde gruplar arasındaki fark önemli bulunmamıştır. Yaşın etkisi kreatin kinaz üzerine önemli olup 7 günlük yaştaki serum keratin kinaz düzeyi günlük yaştaki civcivlerin serum kreatin kinaz düzeyinden daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.5). IO uygulama * yaş interaksiyonu serum keratin kinaz düzeyi için önemsiz saptanmıştır (Çizelge 4.5). Serum T₃ düzeyi üzerine IO uygulama grupları, yaş ve IO uygulaması * yaş interaksiyonuna ait etkiler önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.5). Serum T₄ düzeyi üzerine IO grupları arasındaki farklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.5). Serum T₄ düzeyi 7 günlük yaştaki civcivlerde günlük yaştaki civcivlerin serum T₄ seviyesine göre önemli düzeyde gerilemiştir (Çizelge 4.5). IO uygulama ve yaş arasındaki interaksiyon serum T₄ düzeyi için önemli saptanmamıştır (Çizelge 4.5). Serum toplamprotein düzeyi üzerine IO grupları arasındaki farklar önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.5) Serum toplamprotein seviyeleri üzerine yaşın etkisi önemli bulunmuştur. Yedi günlük yaştaki serum toplam protein seviyesi günlük yaştaki civcivlerin serum toplam protein seviyesinden daha düşük saptanmıştır (Çizelge 4.5). IO uygulama ve yaş arasında serum toplam protein düzeyi üzerine interaksiyon önemli saptanmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. IO uygulaması ve yaşın serum ürik asit, keratin kinaz, toplamprotein, T₃ ve T₄ düzeylerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar

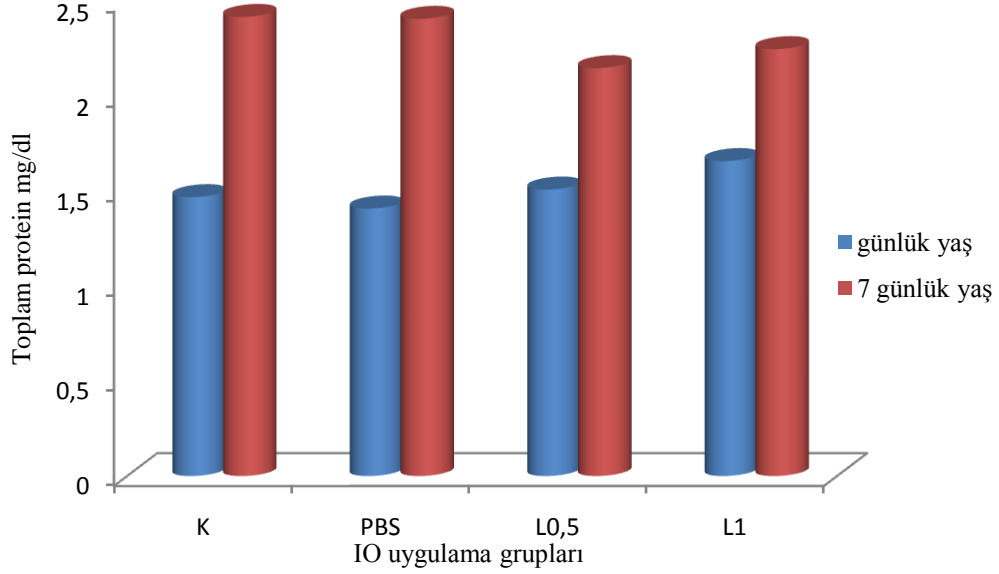
	Ürik asit	Keratin kinaz	Toplam protein	T ₃	T ₄
IO uygulama	mg/dl	U/l	mg/dl	pg/ml	ng/ml
K	6.62±0.56	5221.37±533.64	1.95±0.05	8.91±0.94	5.44±0.64
PBS	5.88±0.56	5132.56±533.64	1.91±0.05	11.20±0.94	6.77±0.64
L _{0.5}	5.13±0.56	5332.01±533.64	1.83±0.05	10.53 ±0.97	6.66±0.64
L ₁	6.10±0.56	5309.93±533.64	1.95±0.05	11.11±0.94	7.02±0.64
Yaş (Gün)					
0	6.02±0.40	3851.37±533.64 ^b	51±0.03 ^b	6.79±0.67	9.76±0.45 ^a
7	5.84±0.40	6646.56±533.64 ^a	30±0.03 ^a	14.09±0.66	3.18±0.45 ^b
P önemlik düzeyi					
Grup	0.320	0.993	0.363	0.321	0.312
Yaş	0.755	<0.001	<0.001	0.755	<0.001
Grup x Yaş	0.847	0.274	0.017	0.847	0.255

^{a,b} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.05).

K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0.5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁:1µg-leptin+100µl PBS

Serum toplam protein düzeyi en yüksek kontrol grubunda (2.42 mg/dl), PBS grubunda (2.41 mg/dl) 7. günlük yaştaki civcivlerde tespit edilirken, günlük yaştaki

civcivlerde ise en yüksek L₁ grubunda (1.66 mg/dl) ve L_{0.5} grubunda (1.51 mg/dl) olarak tespit edilmiştir. Uygulama ve kontrol gruplarındagünlük yaştaki civcivlerin serum toplam proteindüzeyinindaha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu sonuç, IO uygulama grup ve yaş arasındaki interaksyonun önemli olmasına neden olmuştur (Şekil 4.3).



K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0.5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁:1µg-leptin+100µl PBS

Şekil 4.3. IO uygulaması ve yaş interaksyonunun toplam protein düzeyi üzerine etkisine ait ortalamalar

4.5 Morfolojik Özellikler ve Oransal Asimetri

Kuluçka dönemi ve çıkışta embriyo/civciv uzunluk ortalamaları üzerine gruplar arasında önemli bir fark bulunmamıştır (Çizelge 4.6). Kuluçkanın 15. günü,günlük ve 7günlük yaşlarda embriyo/civciv uzunluğu üzerine yaşın etkisi önemli olmuştur (Çizelge 4.6). IO enjeksiyon uygulaması ve yaşın embriyo/civciv uzunluğu üzerinde interaksyonu önemli saptanmıştır (Şekil 4.4). Embriyo/civciv uzunlukları yaşa bağlı olarak en yüksek 7 günlük yaşta kontrol (27.56 cm), PBS (26.93 cm) ve L_{0.5} gruplarında (26.22 cm) tespit edilmiştir (Şekil 4.4).

Gaga uzunluğu üzerine gruplar arasında önemli bir fark bulunmamıştır (Çizelge 4.6). En yüksek gaga uzunluğu L_{0.5} grubunda 6.35 mm ile gerçekleşirken, en kısa gaga uzunluğu PBS grubunda 6.17 mm olarak saptanmıştır. Gaga uzunluğu üzerine grup ve

yaş arasındaki interaksyonun etkisi önemli bulunmuştur (Çizelge 4.6). IO enjeksiyon uygulamasının yaşa göre gaga uzunluğu üzerindeki önemli interaksyon etkisine ait sonuçlar Şekil 4.5’de verilmiştir. Gaga uzunlukları her bir IO enjeksiyon grupları arasında embriyonik yaşın 15. gününde diğer iki yaşa göre önemli düzeyde daha düşük saptanmıştır (Şekil 4.5). Dolayısıyla, bu interaksyonun kaynağını yaş oluşturmuştur (Şekil 4.5).

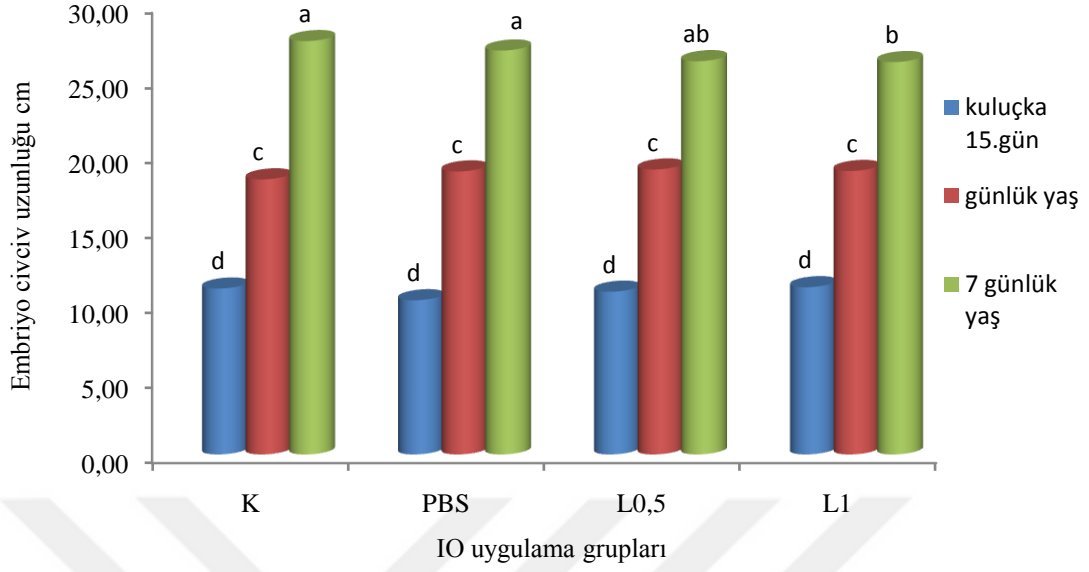
Kafa çapı, sağ ve sol yüz uzunluklarının ortalaması üzerine gruplar arasında önemli bir fark bulunmamıştır (Çizelge 4.6). Kafa çapı, sağ yüz ve sol yüz ortalamaları üzerine yaşın etkisi önemli bulunmuştur (Çizelge 4.6). Artan yaşla birlikte incelenen bu üç uzunluğa ait ortalama değerler önemli düzeyde artmıştır. IO uygulamasının kafa çapı, sağ ve sol yüz uzunlukları üzerine grup ve yaş arasındaki interaksyon önemli saptanmamıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. IO uygulaması ve yaşın embriyo uzunluğu, kafa çapı, gaga, sağ yüz, sol yüz üzerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar

	Embriyo/civciv uzunluğu	Gaga	Kafa çapı	Sağ yüz	Sol yüz
IO uygulama grup	cm	mm	mm	mm	mm
K	18.65±0.14	6.25±0.05	16.90±0.11	12.40±0.14	12.50±0.12
PBS	18.69±0.14	6.17±0.05	17.02±0.11	12.48±0.14	12.50±0.12
L _{0.5}	18.69±0.14	6.35±0.05	16.90±0.11	12.33±0.14	12.76±0.12
L ₁	18.73±0.14	6.25±0.05	16.90±0.11	12.44±0.14	12.49±0.12
Yaş (Gün)					
15	10.83±0.12 ^c	4.16±0.04 ^c	14.14±0.10 ^c	9.98±0.124 ^c	10.21±0.10 ^c
0	18.78±0.12 ^b	6.29±0.04 ^b	17.00±0.10 ^b	13.07±0.124 ^b	13.17±0.10 ^b
7	26.47±0.12 ^a	8.31±0.04 ^a	19.78±0.10 ^a	14.19±0.124 ^a	14.35±0.10 ^a
P önemlilik düzeyi					
Grup	0.984	0.135	0.958	0.897	0.382
Yaş	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Grup x Yaş	0.017	0.014	0.976	0.508	0.464

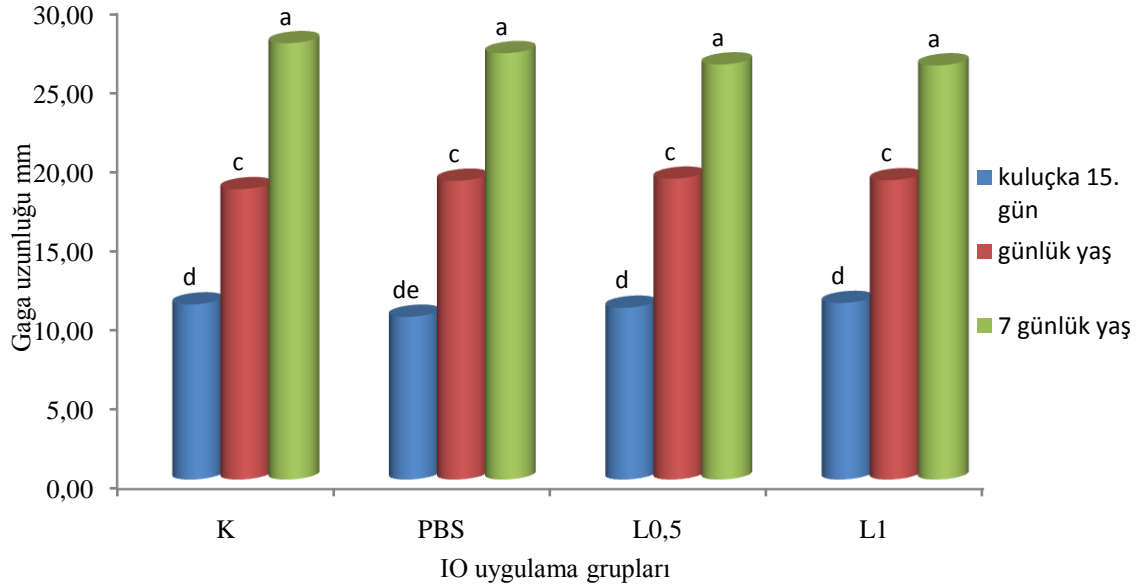
^{a,b,c,d} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.05).

K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0.5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁: 1µg- leptin+100µl PBS.



K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0,5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁:1µg-leptin+100µl PBS.

Şekil 4.4. IO uygulama ve yaş interaksiyonunun embriyo/civciv uzunluğuna etkisine ait ortalamalar



K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0,5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁:1µg-leptin+100µl PBS.

Şekil 4.5. IO uygulama sonrası grup ve yaşın gaga uzunluğu üzerine etkisi

IO uygulamasının sağ ve sol parmak, sağ ve sol incik uzunlukları üzerine etkisinin önemsiz olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.7). Yaşın etkisi ile sağ ve sol parmak, sağ ve sol incik uzunluklarının arttığı saptanmıştır (Çizelge 4.7). IO uygulama * yaş interaksyonu sağ parmak uzunluğu üzerinde önemsiz iken sol parmak, sağ ve sol incik uzunlukları üzerinde önemli saptanmıştır (Çizelge 4.7).

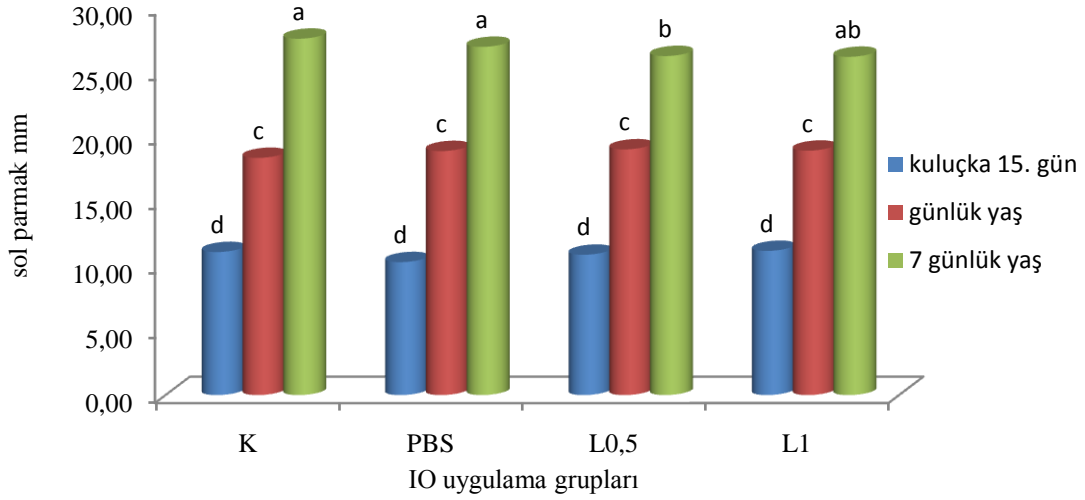
Çizelge 4.7. IO uygulama ve yaşın sağ parmak, sol parmak, sağ incik, sol incik üzerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar

		Sağ parmak	Sol Parmak	Sağ incik	Sol incik
		mm	mm	mm	mm
IO uygulama (grup)	K	14.41±0.187	14.27± 0.14 ^a	17.19±0.17 ^a	17.07±0.16
	PBS	14.24±0.187	14.32± 0.14 ^a	16.98±0.17 ^a	17.03±0.16
	L _{0.5}	13.86±0.187	13.92± 0.14 ^b	16.52±0.17 ^b	16.64±0.16
	L ₁	14.24±0.187	14.04± 0.14 ^{ab}	16.80±0.17 ^b	16.38±0.16
Yaş (gün)	15	7.65±0.162 ^c	7.79±0.12 ^c	10.31±0.14 ^c	10.22±0.14 ^c
	0	14.4±0.162 ^b	13.93±0.12 ^b	16.87±0.14 ^b	16.73±0.14 ^b
	7	20.67±0.162 ^a	20.46±0.12 ^a	23.44±0.14 ^a	23.40±0.14 ^a
P önemlilik düzeyi					
Grup		0.226	0.282	0.494	0.890
Yaş		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Grup x yaş		0.422	0.001	0.045	<0.001

^{a,b,c} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.05).

K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0.5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁:1µg-leptin+100µl PBS.

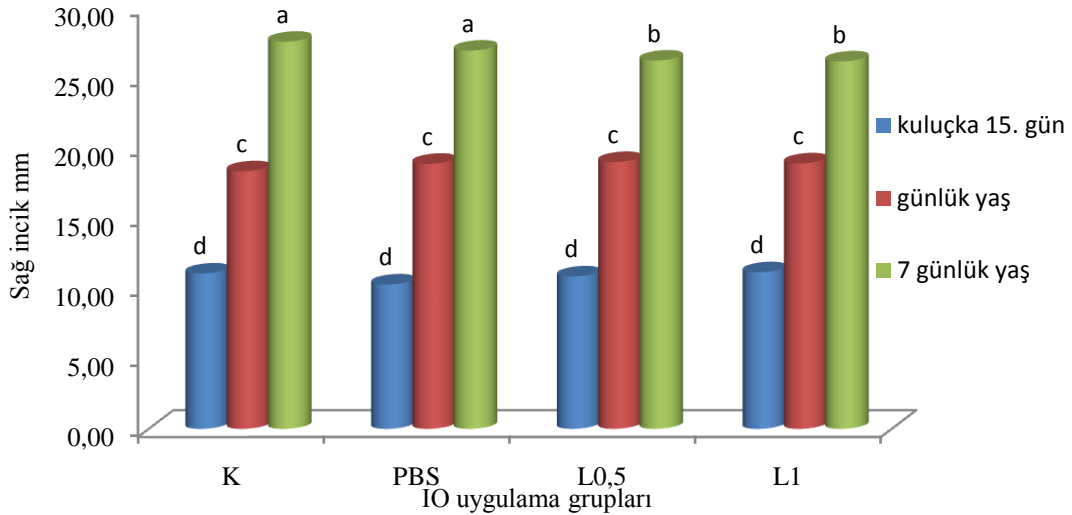
IO uygulama * yaş interaksyonu sol parmak, sağ ve sol incik uzunlukları üzerinde önemli saptanması ile elde edilen ortalama değerler Şekil 4.6; Şekil 4.7; Şekil 4.8'de verilmiştir. Sol parmak uzunluğunun 7 günlük yaşta L_{0.5} grubunda L₁ grubundan farklı olmayıp kontrol ve PBS grubundan daha düşük elde edilmesi bu interaksyonun kaynağını oluşturmuştur (Şekil 4.6).



K: Kontrol; PBS: 100 μ l fosfat tampon çözeltisi; L_{0,5}: 0.5 μ g leptin + 100 μ l PBS; L₁:1 μ g-leptin+100 μ l PBS.

Şekil 4.6. IO uygulamasına ve yaşa ait interaksiyonun sol parmak, uzunluğuna etkisine ait ortalama ve standart hatalar

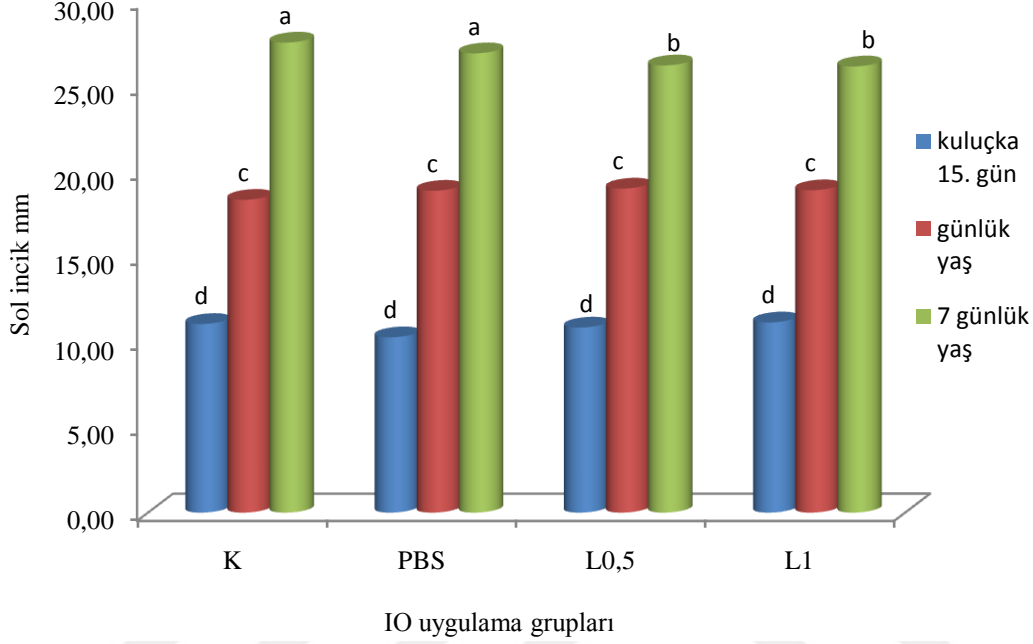
IO uygulama * yaş interaksiyonu sağ incik uzunlukları üzerinde önemli saptanması ile elde edilen ortalama değerler Şekil 4.7 de verilmiştir. Sağ incik uzunlukları bakımından önemli saptanan grup yaş interaksiyonunun nedeni IO leptin uygulama gruplarının kontrol ve PBS gruplarına göre 7 günlük yaşta daha küçük olmasıdır (Şekil 4.7).



K: Kontrol; PBS: 100 μ l fosfat tampon çözeltisi; L_{0,5}: 0.5 μ g leptin + 100 μ l PBS; L₁:1 μ g-leptin+100 μ l PBS.

Şekil 4.7. IO uygulamasına ve yaşa ait interaksiyonun sağ incik uzunluğuna etkisine ait ortalama ve standart hatalar

Sol incik uzunlukları bakımından önemli saptanan grup yaş etkisinin nedeni IO leptin uygulama gruplarının kontrol ve PBS gruplarına göre 7 günlük yaşta daha küçük olmasıdır (Şekil 4.8).



K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0.5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁:1µg-leptin+100µl PBS.

Şekil 4.8. IO uygulamasına ve yaşa ait etkisinin sol incik uzunluğuna etkisine ait ortalama ve standart hatalar

IO uygulamasının orta parmak ve incik uzunluğunun oransal asimetri değeri ve bu uzunluklara ait ortalama asimetri değeri üzerine etkisine ait ortalama Çizelge 4.8’de sunulmuştur. Orta parmak uzunluğuna ait oransal asimetri değeri IO uygulama grupları arasında önemli bulunmamıştır. İncik uzunluğu oransal asimetri üzerine grup etkisi önemli bulunmuş, L₁ grubunun oransal asimetri incik değeri en yüksek L_{0.5} grubu ve kontrol ve PBS gruplarında önemli düzeyde saptanmıştır (Çizelge 4.8). İncik uzunluğu oransal asimetri değeri L_{0.5} grubunda kontrol ve PBS gruplarına göre daha yüksek saptanmıştır (Çizelge 4.8). İncik ve orta parmak uzunluklarının ortalama oransal asimetri değeri üzerine IO uygulamasının etkisi önemli bulunmamıştır. İncelenen yaşlara göre orta parmak ve incik ile bu uzunluklara ait ortalama asimetri değerleri önemli bulunmuştur. Orta parmak uzunluğuna ait oransal asimetri kuluçkanın 15. günündeki embriyolarda çıkıştan sonraki civcivlere göre daha yüksek elde edilmiştir

(Çizelge 4.8) İncik uzunluğuna ait oransal asimetri çıkışta günlük civcivlerde en düşük olup, 7 günlük civcivlerde 0.84 olarak daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.8). Ortalama orta parmak ve incik uzunluklarına ait oransal asimetri kuluçkanın 15. günündeki embriyolarda çıkıştan sonraki günlük ve 7 günlük civcivlere göre daha yüksek saptanmıştır (Çizelge 4.8)

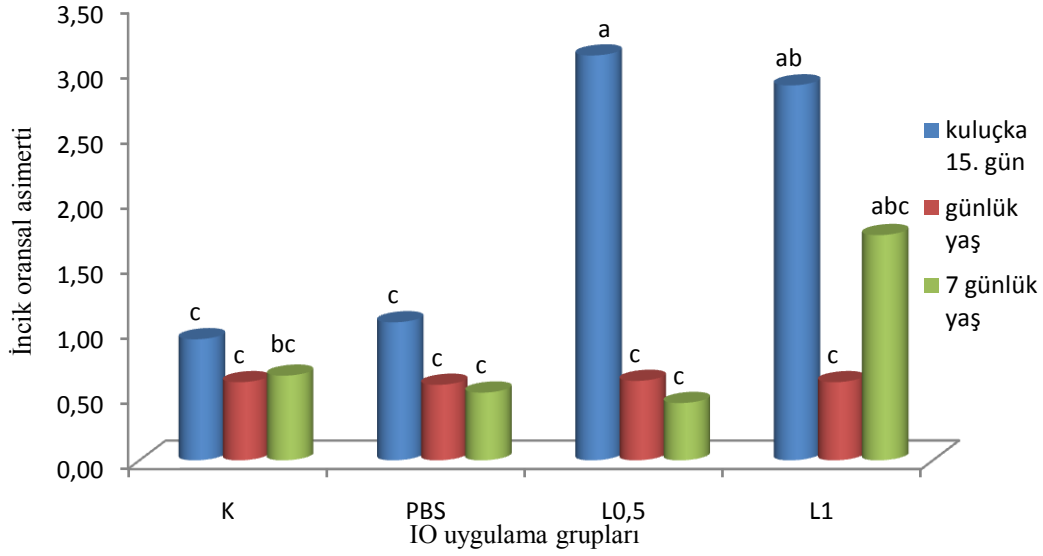
Çizelge 4.8. IO uygulama ve yaşın orta parmak ve incik uzunluğunun oransal asimetri değeri ve ortalama asimetri değeri üzerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar

IO Uygulama (grup)	Orta parmak	İncik	Ortalama Oransal asimetri
K	0.96±0.18	0.74±0.33 ^b	0.83±0.10
PBS	1.17±0.18	0.72±0.34 ^b	0.89±0.10
L0.5	1.16±0.18	1.39±0.33 ^b	0.98±0.11
L1	1.37±0.18	1.74±0.33 ^a	1.20±0.12
Yaş(gün)			
15	1.44±0.12 ^a	2.59±0.22 ^a	1.27±0.09 ^a
0	1.13±0.11 ^{ab}	0.61±0.26 ^b	0.83±0.08 ^b
7	0.84±0.16 ^b	0.84±0.37 ^b	0.84±0.11 ^b
P önemlilik düzeyi			
Grup	0.507	0.0002	0.264
Yaş	0.006	<0.001	0.053
Grup x Yaş	0.874	<0.001	0.103

^{a,b,c} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir(P<0.05).

K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0.5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁:1µg-leptin+100µl PBS

IO uygulama grupları ile incelenen yaşlar arasında orta parmak uzunluğu ve ortalama oransal asimetri üzerinde önemli interaksiyon saptanmazken incik uzunluğu oransal asimetri üzerinde bu interaksiyon önemli bulunmuştur (Şekil 4.9).



K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0,5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁:1µg-leptin+100µl PBS.

Şekil 4.9. IO uygulamasına ve yaşa ait incik oransal asimetri değeri ve ortalama asimetri değeri üzerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar

4.6 Organ Gelişimi

Kuluçka dönemi ve çıkışta embriyo/civciv ağırlığı ortalaması üzerine gruplar arasında önemli bir fark bulunamamıştır (Çizelge 4.9). Civciv canlı ağırlığı 7 günlük yaşta en düşük L_{0,5} grubunda (169.04), en yüksek PBS grubunda (194.21) gerçekleşmiştir.

IO uygulamasının kuluçka ve günlük yaştaki embriyo/civciv oransal sarı kese ağırlığı üzerine grup ve yaşın etkisi önemsiz saptanmıştır (Çizelge 4.9). Oransal sarı kese ağırlığı embriyonik yaşın 15. gününde IO uygulama gruplarında daha yüksek saptanmıştır (Çizelge 4.9).

Yaşın etkisi ile oransal karaciğer ağırlığı artarken oransal akciğer ağırlığı kontrol grubu dışındaki diğer gruplarda azalmıştır. Yedi günlük yaştaki civcivlerde akciğer ağırlığı IO uygulama gruplarında gerilemiştir (Çizelge 4.9).

Kalp oransal ağırlığı PBS grubunda embriyonik dönemde diğer yaş gruplarından yüksek olduğu, yaşla birlikte kalp ağırlığında düşme olduğu saptanmıştır. (Çizelge 4.9). IO uygulamanın pankreas ağırlığında yaşla birlikte arttığı, 7 günlük yaşta leptin gruplarında diğer gruplardan yüksek oransal kalp ağırlığı olduğu saptanmıştır. Bursa

ağırlığının yaşla birlikte arttığı tespit edilmiştir. IO uygulamasının beyin ağırlığı embriyonik yaşta yüksekken, çıkış ve sonraki yaşlarda düştüğü saptanmıştır. Beyin ağırlığı 7. günde IO uygulama gruplarının PBS ve kontrol gruplarından daha yüksek saptanmıştır (Çizelge 4.9). Bağırsak ağırlığı embriyonik ve günlük yaşta IO uygulama gruplarında yüksek olduğu embriyonik 15. gününde en yüksek oransal organ ağırlığı PBS grubunda olduğu tespit edilmiştir. Günlük yaşta en yüksek bağırsak ağırlığı L₁ grubunda tespit edilmiştir IO uygulamasının yaşla birlikte proventrikülüs + taşlık organ ağırlığını arttırdığı belirlenmiştir. IO uygulaması dalak ağırlığını önemli düzeyde etkilemiştir (Çizelge 4.9). IO uygulamasının oransal göğüs ağırlığı üzerine yedi günlük yaşta herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. IO uygulamanın embriyo/civciv ve organ gelişimi üzerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar

Yaş	Embriyo/civciv	Sarı kese ağırlığı*		Karaciğer	Akciğer	Kalp	Pankreas
		g	%	%	%	%	%
Kuluçka 15. günü	K	14.21±0.55	27.15±1.98	1.87±0.09 ^b	0.94±0.07 ^b	0.67±0.02 ^b	-
	PBS	13.57±0.55	25.10±1.98	2.40±0.10 ^a	1.22±0.07 ^a	0.85±0.02 ^a	-
	L _{0.5}	14.79±0.55	28.92±2.12	2.05±0.11 ^{ab}	1.06±0.07 ^{ab}	0.73±0.02 ^b	-
	L ₁	14.01±0.55	28.63±2.22	1.96±0.09 ^b	1.10±0.07 ^{ab}	0.72±0.02 ^b	-
P değeri		0.439	0.570	0.007	0.051	0.004	-
0.gün	K	44.79±1.03	12.80±0.99	2.43±0.13	0.90±0.06	0.62±0.11	0.28±0.06
	PBS	44.58±1.03	9.75±0.99	2.67±0.13	1.05±0.06	0.84±0.11	0.14±0.06
	L _{0.5}	44.73±1.03	10.68±0.99	2.76±0.13	1.09±0.06	0.69±0.11	0.15±0.06
	L ₁	44.56±1.03	9.69±0.99	2.76±0.13	1.11±0.06	0.66±0.11	0.15±0.06
P değeri		0.998	0.120	0.270	0.105	0.818	0.350
7.gün	K	180.85±7.07	-	3.70±0.15	0.92±0.04	0.66±0.03	0.45±0.03
	PBS	194.21±7.07	-	3.41±0.15	0.93±0.04	0.68±0.03	0.39±0.03
	L _{0.5}	169.04±7.07	-	3.65±0.15	0.83±0.04	0.65±0.03	0.47±0.02
	L ₁	176.34±7.07	-	3.66±0.15	0.84±0.04	0.64±0.03	0.48±0.02
P değeri		0.128	-	0.563	0.196	0.884	0.219

*Sarı kese kuluçkanın 15. gününde yumurta ağırlığına çıkışta civciv ağırlığına oranlanmıştır

^{a,b} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.05).

K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0.5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁: 1µg-leptin+100µl PBS.

Çizelge 4.9. IO uygulamanın embriyo/civciv ve organ gelişimi üzerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar (devam)

		Bursa	Beyin	Bağırsak	Proventrikulus	Dalak	Göğüs
Yaş gün		%	%	%	%	%	%
Kuluçkanın 15.günü	K	0.08±0.03	2.93±1.17	1.17±1.55 ^b	2.81±0.155	0.07±0.05	-
	PBS	0.10±0.03	2.92±1.17	1.78±1.45 ^a	3.11±0.155	0.09±0.04	-
	L _{0.5}	0.17±0.03	2.86±1.17	1.35±1.45 ^{ab}	3.11±0.155	0.14±0.14	-
	L ₁	0.09±0.03	2.92±1.17	1.44±1.45 ^{ab}	2.96±0.155	0.04±0.04	-
P değeri		0.282	0.994	0.051	0.481	0.560	-
0.gün yaş	K	0.11±0.01	2.16±0.17	4.61±0.56 ^{ab}	5.71±0.32	0.05±0.01	-
	PBS	0.11±0.01	2.14±0.18	4.74±0.56 ^{ab}	6.17±0.32	0.06±0.01	-
	L _{0.5}	0.11±0.01	2.00±0.17	4.03±0.56 ^b	6.08±0.32	0.03±0.01	-
	L ₁	0.13±0.01	1.92±0.17	6.22±0.56 ^a	6.75±0.32	0.04±0.01	-
P değeri		0.737	0.747	0.052	0.168	0.617	-
7.gün yaş	K	0.15±0.01	0.65±0.03	10.40±0.38	6.95±0.35	0.07±0.01	9.63±0.41
	PBS	0.15±0.01	0.63±0.03	9.44±0.38	6.76±0.350	0.06±0.01	10.89±0.41
	L _{0.5}	0.17±0.01	0.70±0.03	10.31±0.38	7.20±0.35	0.07±0.01	9.62±0.41
	L ₁	0.15±0.01	0.71±0.03	10.64±0.38	7.58±0.35	0.06±0.01	9.98±0.41
P değeri		0.482	0.279	0.192	0.715	0.863	0.199

*Sarı kese kuluçkanın 15. gününde yumurta ağırlığına çıkışta civcivağırlığına oranlanmıştır

^{a,b} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir (P<0.05).

K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0.5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁:1µg-leptin+100µl PBS.

4.7 Kuluçka Süresi

IO grupları arasında yumurta ağırlığı bakımından (Çizelge 4.10) ve kabuğu delme zamanı bakımından gruplar arasındaki fark önemli bulunmamıştır. En erken kabuğu delen L₁ grubu 473.07saat ile diğer grupların kabuğu delme zamanına göre önemli bir fark oluşturmamıştır (Çizelge 4.10). Toplam kuluçka süresi bakımından en erken çıkış L₁ grubunda 480.60 saat, L_{0.5} grubunda 482.62 saat, K grubunda 484.35 saat ve PBS grubunda 488.64 saat olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. IO uygulama ve yaşın ve yumurta ağırlığı, kabuğu delme ve çıkış zamanına etkileri ortalama ve standart hatalar

		Yumurta ağırlığı	Kabuğu delenler	Çıkış
IO uygulama (grup)		g	saat	saat
	K	63.52±0.38	475.35±1.13 ^b	484.35±1.05 ^b
	PBS	63.86±0.38	477.57±1.28 ^a	488.64±1.24 ^a
	L _{0.5}	63.33±0.38	474.27±1.31 ^b	482.62±1.30 ^c
	L ₁	63.00±0.38	473.07±1.63 ^b	480.6±1.47 ^c
P önemlilik düzeyi	Grup	0.451	0.139	0.0004

^{a,b} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir(P<0.05).

K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0.5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁:1µg-leptin+100µl PBS.

4.8. Kuluçka Sonuçları

IO grupları arasında su kaybı bakımından gruplar arasında önemli fark bulunmamıştır (Çizelge 4.11). Su kaybı en yüksek L_{0.5} grubunda %11.77 olarak gerçekleşirken L₁ grubunda %10.39, K grubunda %10.99, PBS grubunda ise %11.25 olarak saptanmıştır(Çizelge 4.11).

Döllülük oranı, çıkış gücü ve kuluçka randımanı üzerine IO uygulamanın etkisi önemsiz olarak saptanmıştır (Çizelge 4.11). Benzer şekilde, embriyonik ölümler üzerinde IO uygulamasının etkisi önemsiz olmuştur (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11 IO uygulama ve yaşın kuluçkanın 19. gününde yumurta su kaybıdöllülük oranı, kuluçka randımanı, çıkış gücü, erken ölüm, orta ölüm, geç ölüm, kabuk altı değerlerine ait ortalama ve standart hatalar

	19. gün su kaybı	Döllülük oranı	Kuluçka randımanı	Çıkış gücü
IO uygulama grup	%	%	%	%
K	10.99±0.99	85.39±3.40	72.40±7.34	77.12±7.89
PBS	11.25±0.99	78.96±3.40	70.00±7.34	70.20±7.89
L _{0.5}	11.77±0.99	88.97±3.40	62.67±7.34	74.07±7.89
L ₁	10.39±0.99	91.21±3.40	70.67±7.34	77.90±7.89
P önemlilik düzeyi	0.745	0.096	0.789	0.457

K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0.5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁:1µg-leptin+100µl PBS.

Çizelge 4.11. IO uygulama ve yaşın kuluçkanın 19. gününde yumurta su kaybıdöllülük oranı, kuluçka randımanı, çıkış gücü, erken ölüm, orta ölüm, geç ölüm, kabuk altı değerlerine ait ortalama ve standart hatalar (devam)

IO uygulama grup	Erken ölüm %	Örta ölüm %	Geç ölüm %	Kabuk altı %
K	1.45±0.36	5.45±0.31	9.30±0.63	6.68±0.25
PBS	8.00±0.36	5.80±0.31	8.00±0.63	8.00±0.25
L _{0.5}	6.61±0.36	8.65±0.31	8.00±0.63	2.67±0.25
L ₁	7.50±0.36	2.60±0.31	5.30±0.63	6.70±0.25
P önemlilik düzeyi	0.177	0.344	0.647	0.702

K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0.5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁:1µg-leptin+100µl PBS.

4.9. Performans

Çizelge 4.12' de sunulan tüm özelliklere ait sonuçlar sayısal ortalamaları temsil etmektedir. Yem tüketimi IO uygulama gruplarında PBS ve kontrol gruplarına göre düşük saptanmıştır (Çizelge 4.12). Yedi günlük canlı ağırlık artışı en yüksek K grubunda 185.19 g olarak gerçekleşirken L₁ grubunda 183.99 g, PBS grubunda 179.44g ve L_{0.5} grubunda 183.99 g olarak saptanmıştır (Çizelge 4.12). Yemden yararlanma oranı IO leptin gruplarında K ve PBS gruplarına göre daha düşük saptanmıştır (Çizelge 4.12). Cinsiyet oranı dişilerde K grubunda % 50, PBS grubunda % 45, L_{0.5} grubunda % 37. L₁ grubunda % 47 olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 4.12). Cinsiyet oranı erkeklerden yüksek L_{0.5} grubunda %63, PBS grubunda %55, L₁ grubunda %53 ve K grubunda % 50 oranında gerçekleşmiştir (Çizelge 4.14). Ölüm oranı en yüksek PBS grubunda % 6.45 oranında gerçekleşirken en düşük ölüm oranı L₁ grubunda % 2.5 olarak gerçekleşmiştir. Yaşama gücü en yüksek L₁ grubunda %97.5 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. IO uygulaması ve yaşın performans değerlerine ait ortalamalar

IO uygulama grup	Günlük yem tüketimi g	7 günlük canlı ağırlık g	Yemden yararlanma	Cinsiyet oranı dişi
K	19.65	185.19	1.35	50
PBS	20.44	179.44	1.25	45
L _{0.5}	17.51	183.99	1.49	37
L ₁	15.43	167.41	1.55	47

K:Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0.5}: 0.5 µg leptin+100µl PBS; L₁:1µg-leptin+100µl PBS

Çizelge 4.12. IO uygulaması ve yaşın performans değerlerine ait ortalamaların (devam)

IO uygulama (grup)	Ciniyet oranı erkek	Ölüm oranı	Yaşama gücü
	%	%	%
K	50	2.94	96.87
PBS	55	6.45	93.54
L _{0.5}	63	3.70	96.30
L ₁	53	2.50	97.5

K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0.5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁:1µg-leptin+100µl PBS

4.10. Hareketsiz Kalma Süresi

Hareketsiz kalma süresi ve müdahale sayısı üzerine IO uygulamasının etkisi önemsiz bulunmuştur (Çizelge 4.13). Müdahale sayısı (1.87) ve hareketsiz kalma süresi (93.50 sn) bakımından L₁ grubu diğer gruplara göre daha yüksek saptanmıştır (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. IO uygulaması hareketsiz kalma süresi üzerine etkisine ait ortalama ve standart hatalar

IO uygulama (grup)	Müdahale sayısı	Hareketsiz kalma (sn)
K	1.37±0.25	72.12±7.8
PBS	1.66±0.29	24.83±7.8
L _{0.5}	1.60±0.22	67.10±7.8
L ₁	1.87±0.25	93.50±7.8
P önemlilik düzeyi	0.586	0.198

K: Kontrol; PBS: 100 µl fosfat tampon çözeltisi; L_{0.5}: 0.5 µg leptin + 100µl PBS; L₁:1µg-leptin+100µl PBS

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada kuluçkalık yumurta içi (in ovo) leptin enjeksiyonunun etlik piliç embriyolarının gelişimi, morfolojik özellikleri ile bu özelliklere ait asimetri gelişimi ve çıkıştan sonra 7 gün büyütme sonunda korku davranışı ve performans ölçütleri ile çıkış sonrası erken gelişme dönemi boyunca kan lipid metabolizmasına ait biyokimyasal parametreler üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, çalışmanın deneme aşaması başlatılmadan önce örnek materyali olan yumurtaları temsilen rasgele seçilen 25 adet yumurtada IO yöntem uygulanacağından yumurta kabuk kalite özellikleri, sarı pH'sı ve diğer yumurta kalite özellikleri ölçülmüş ve ortalama değerler bulgular bölümünde sunulmuştur. İncelenen tüm kalite özelliklerinin yapılan çalışma sonuçlarında belirtilen kalite sonuçları ile uyumlu olduğu (Babacanoğlu, 2018) ve kabuk kalite özellikleri ile birlikte ortalama sarı pH değeri IO enjeksiyonunun uygulanabilirliğini ortaya koymuştur.

Kuluçkanın 7. gününde IO leptin enjeksiyon gruplarında kabuk sıcaklıklarının kontrol grupuna göre önemli düzeyde daha yüksek bulunması, bu yüksek sıcaklığın 0.5 µg leptin enjeksiyonunun embriyonun metabolizmasını hızlandığını ortaya koymaktadır. Bu sonuç, 0.5 µg leptin IO enjeksiyonunun metabolik indikatörlerin değişimine bağlı olarak embriyonun metabolizmasını hızlandıran başka bir çalışma sonucu ile uyumlu bulunmuştur (Cellak ve Babacanoğlu., 2018). Tavuk embriyosunun yumurta sarı kesesinde leptin sentezi olduğu (Ashwell ve ark., 1999b) ve embriyo gelişiminin 3. gününden sonra leptin hormon ekspresyonunun başlaması (McMurtry ve ark., 2000) leptin hormonunun kuluçkanın 3. gününden sonra sarıda var olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak, bu hormonun yumurtadaki varlığı biyolojik olarak aktif olup-olmadığını ortaya koymamaktadır. Bununla birlikte bu çalışmada, kuluçkanın 7. gününde embriyonun sarı kesesine uygulanan 1 µg leptin düzeyine kıyasla 0.5 µg leptin uygulamasının embriyonun kabuk iç zarını deldiği dönemden sonra embriyonun metabolizmasını geriletmediği ortaya çıkmıştır. Yumurta sarısı leptin düzeylerindeki değişikliklerin araştırıldığı bir çalışmada, yumurta sarısı leptin düzeyinin kuluçkanın 1. ve 3. günlerinde 11. güne göre daha yüksek olması (Huang ve ark., 2008)beş günlük

civciv embriyolarının beyin, bursa, kalp, karaciğer, kas ve dalağında leptin mRNA varlığından söz edilmesi (Ashwell ve ark., 1999b), kuluçkanın ilk yarısında tavuk embriyosunun sarı kesesinde bulunan leptinin bizim çalışma sonuçlarımıza göre de 7. günden itibaren aktif olduğunu ortaya koymaktadır.

Kuluçka öncesi yumurta sarısında, kuluçkada ve çıkışta sarı kesede leptin hormon düzeylerinin yaşa bağlı değişimi incelendiğinden yüksek leptin düzeyi kuluçkanın 7. gününde (kuluçkanın 180. saatinde) IO uygulamasından 6 saat sonra 754.17 ng/ml olarak gerçekleştiği ortaya çıkmıştır. Ayrıca, kuluçkanın 15. günündeki leptin düzeyinin başlangıç sarı leptin düzeyi ve çıkışta kalıntı sarı kese leptin düzeyinden daha düşük elde edilmesine ek olarak kabuk sıcaklığı ile ilişkili bir biçimde kuluçkanın 15. gününde bu değişimin gözlenmesi leptin hormon düzeyinin düşmesi ile bağlantılı olabilir. Kuluçkadan önce yumurta sarısında leptin varlığı (658.46 ng/ml) bu hormonun maternal kökenli olduğunu ve dişi etlik damızlığın plazması aracılığı ile sarı foliküllerine aktarıldığını göstermektedir. Benzer şekilde, yumurta içinde bulunan leptinin maternal kökenli veya doğrudan foliküllerden salgılandığı da tahmin edilmektedir (Cassy ve ark., 2003). IO uygulamalar içinde özellikle maternal etkiye dayalı etkilerin saptanması oldukça önemli olup dişi damızlıktan yumurta sarısına aktarılan maternal hormonların etkisinin yumurta sarısı ya da sarı keseye enjeksiyonu çalışmamızın konusunu kapsamaktadır (Henry ve Burke, 1999; Babacanoğlu ve ark., 2018). Bizim çalışmamızda, kuluçkadan önce yumurta sarısında ve kuluçkanın 7. gününde IO uygulamasından hemen sonra uygulama ve kontrol grubunda sarı keselerde leptin hormon varlığı (819.29 ng/ml) leptinin maternal kökenli olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, maternal leptinin etkisini araştırmak amacı ile etlik damızlık yumurtalarına kuluçkaya girişden önce içinde 0.5 µg rekominat fare leptinin IO enjeksiyonunun, karaciğer leptin sekresyonunu değiştirmesi sonucu maternal leptinin rolünü de ortaya koymaktadır (Hu ve ark., 2012).

Bu çalışmada, sarı leptin düzeyi embriyonik yaşa bağlı olarak değişim göstermiştir. Kuluçkanın 7. gününde enjeksiyon yapılmayan grupta sarı kese leptin düzeyinin tüm enjeksiyon gruplarından aynı embriyonik yaşta istatistiksel olarak farklı olmamasına karşılık kuluçkanın 15. gününde önemli düzeyde yüksek olması bu yorumu doğrulamaktadır. Yaşa bağlı leptin düzeyindeki değişimler (Cassy ve ark., 2004 b)'e ait çalışma sonucunda da bu yorum benzer şekilde yapılmıştır. Kuluçkanın 7. gününde IO

enjeksiyon aracılığı ile uygulanan farklı leptin dozlarının erken gelişme dönemi olan 1 haftalık süre boyunca erkek civcivlerin serum leptin düzeyi üzerine etkisinin önemli olmaması, sarı kese ve kalıntı sarı kese leptin düzeyinin değişmemesi ile ilişki olabilir. Buna karşılık, yaşa bağlı değişime göre 7 günlük yaştaki civcivlerin serum leptin düzeyinin çıkışta günlük yaştaki civcivlere göre daha yüksek olması artan yaşla birlikte serum leptin düzeyinin arttığını ortaya koymuştur. Bu sonucu, yaş ve IO uygulama arasında çıkan interaksiyona ait sonuçlar incelendiğinde her bir grupta yaşla kan serum leptin düzeyinin artarak değişim göstermeside doğrulamaktadır.

Çıkıştan sonra erken gelişme dönemi boyunca incelenen 2 farklı civciv yaşına göre IO leptin enjeksiyonunun kan lipid metabolizması (serum trigliserid, kolesterol, LDL ve VLDL düzeyleri) üzerine etkisi olmadığı, ancak kan serumu HDL düzeyi üzerine IO uygulama ve yaşın etkisinin önemli olduğu bu çalışmada sonuçlanmıştır. Bu interaksiyonun nedeni 1 µg leptinin embriyonik yaşın 7. gününde sarı keseye enjekte edilmesi ile 7 günlük yaştaki civcivlerin kan serum HDL düzeyinin çıkışta günlük civcivlerin kan serum HDL düzeyine göre ve enjeksiyon yapılmayan grup ile sadece solüsyon enjeksiyonu yapılan gruptan daha düşük olmasından ileri gelmiştir. Bu sonuç, günlük etlik civcivlerde IO leptin uygulamasının karaciğer lipid metabolizması ve mRNA ekspresyonunu etkilemesi ile serum trigliserid düzeyini arttırıp, karaciğer trigliserid düzeyinin azaldığını bildiren (Hu ve ark., 2012) çalışma sonuçları ile ilişkilendirebiliriz. Bu sonuçtan hareketle, yüksek dozda leptin ile muamele edilen 7 günlük civcivlerde serum HDL düzeyinin düşmesi karaciğerde HDL sentezinin artması ve bununla karaciğer kolesterol sentezinden sonra kolesterolün kanda VLDL'ye dönüşmesi ile bağlantılı olabilir. Bizim çalışmamızda, karaciğer kolesterol sentezinden sonra kolesterolün kanda VLDL'ye dönüşmesi kan serumunda çıkıştan sonra yaşla azalan serum VLDL'nin ve benzer şekilde trigliserid ile kolesterolün yaşla etkilenmesi kan lipid metabolizmasının metabolitlerinin gerilemesi ile doğrulanmıştır. Bizim çalışma sonuçlarımıza göre yaşla kan serumunda azalan trigliserid, kolesterol ve VLDL düzeylerinin gerilemesi (Lamosova ve ark.,2003) sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. İlgili literatür bıldırıncılarda leptin uygulamasının çıkış sonrası büyüme döneminde plazma ve karaciğer toplam lipid konsantrasyonlarını artan yaşla birlikte azalttığını rapor etmiştir.

Yumurta içi leptin hormon enjeksiyonunun plazmadatoplam ve serbest T_3 seviyeleri üzerine etki ettiği, toplam T_4 düzeyini değiştirmediği şeklinde sonucu bildirilmektedir (Mácajová ve ark., 2002). Embriyonik dönemde yumurtalara leptin enjeksiyonunun plazmadaki tiroid hormonların düzeylerini etkilediği, T_3 düzeyini dűřürerek, T_4 düzeyini arttırarak bu etkisini gösterdiği bildirilmektedir (Lamořova ve ark., 2003). IO leptin uygulamasının çıkış sonrası erken gelişme döneminde tiroid hormonlarının karaciğer aktivitesini etkilediğini bildirmesi bizim çalışmamızda kan lipid metabolizmasının değişmemesinin karaciğer metabolizmasını da etkilemediğini ortaya koymasıyla ilişkili olarak açıklanabilir. Ayrıca, leptin enjeksiyonunun 7 günlük embriyonun sarı kesesine uygulanmasının çıkıştan sonra serum ürik asit düzeyini etkilememesi leptinin protein katabolizması üzerinde etkili olmadiğını ve yine değişmeyen kreatin kinaz sonuçlarına göre kas yıkımına da neden olmadiğını ortaya koymaktadır. IO yöntem kullanarak leptinin kuluçkada sarı keseye enjekte edilmesi günlük yaştaki civcivlerin kan serumu toplam protein düzeyinin kontrolden yüksek olması ve 7 günlük yaştada gerilemesinin leptin doz düzeyinin etkisini ortaya koymakla birlikte etlik civcivlerde protein metabolizması ile bağlantılı olarak erken yaşlarda protein düzeylerinin azalması (Yang ve ark., 2007) ile ilgili olabileceği tahminlenmektedir.

Embriyo ve civciv uzunluğu ile birlikte gaga uzunluğu, kafa çapı ve incelenen çift yanlı uzunluklar üzerine etkisine ait IO leptin uygulama konusunda elde edilen sonuçlar literatürde bir ilk olup, herhangi bir sonuçla ilişkilendirilerek açıklanmaması literatür sonucunun olmamasından ileri gelmektedir. Her ne kadar embriyo/civciv uzunluğu ve gaga uzunluğu için önemli bir intaraksiyon uygulama ve yaş arasında elde etsek de bu önemin kaynağı yaşın etkisi olmuştur. İncelenen tüm bu morfolojik özelliklere IO leptin enjeksiyonunun etkisi önemli bulunmazken, yaşla birlikte doğrusal bir şekilde tüm uzunlukların artması daha önceki çalışma sonuçlarıyla doğrulanmıştır (Babacanoğlu ve Güler, 2018; Babacanoğlu ve ark., 2018). Sol parmak ve sağ ve sol incik uzunlukları için grup ve yaş interaksiyonun önemli olması leptin uygulamasının her bir üç uzunluk için 7 günlük yaştaki civcivlerde enjeksiyon yapılmayan K ve PBS gruplardan düşük olması leptin dozuna bağlı olarak orta parmak ve incik uzunluklarının 7 günlük yaşta gerilediği şeklinde yorumlanabilir. İncik uzunluğuna ait oransal asimetri üzerine leptin uygulamasının etkisi asimetriyi arttırması yönünde olmuştur. Bunun sonucunda ortaya

çıkan interaksiyona göre leptin uygulama grupları kuluçkanın 15. günündeki embriyoların incik uzunluğuna ait oransal asimetrinin ortaya çıkması ile bağlantılı olarak önemli elde edilmiştir. Bu sonuç, çıkış sonrası erken büyütme dönemine kıyasla embriyo gelişim döneminde IO leptin enjeksiyonunun incik uzunluğunda asimetri gelişime yol açtığını göstermektedir.

Leptin uygulama gruplarına ait embriyoların kontrol embriyoları ile aynı saatte kabuğu deldikleri ortaya çıkarken, çıkış zamanı tam tersi şekilde her iki IO leptin grubu embriyolarında daha kısa sürede olup, bu sonuç leptinin etkisi ile toplam kuluçka süresinin daha kısa olduğunu ortaya koymaktadır. Bunun nedeni, dokulardaki leptin mRNA ekspresyonunun etkisi ile tavuklarda dolaşımdaki büyüme hormon düzeyine bağlı olarak toplam kuluçka süresinin arttığını bildiren çalışmaların sonucu ile (Ashwell ve ark.,1999a; Lamoşova ve ark., 2003; Su ve ark., 2012) ilişkili olabilir.

Leptin uygulaması ile kuluçka sonuçları, kuluçka randımanı ve çıkış gücü ile birlikte embriyonik ölümler üzerinde herhangi bir etkinin saptanmaması, IO uygulamanın etkinliğini ortaya koymuştur. Oysaki IO uygulama etkisi ile özellikle IO'nun uygulandığı embriyonik yaşta ölümler artmaktadır. Ancak bizim çalışma sonuçlarımıza göre 7 günlük yaşta sarı keseye IO uygulamanın ölümleri etkilemediği gibi çıkış gücünü de etkilememesi IO uygulamanın pratikte de uygulanabilirliğini göstermektedir. Etlik civcivlerde IO besleme ile çıkış gücünün arttığını bildiren çalışma sonuçları da mevcuttur (Uni ve Ferket, 2004; Uni ve ark.,2005).

Bıldırcınlarda leptin düzeyi ile çıkış ağırlığı arasında pozitif yönlü bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Rao ve ark., 2009). Bu sonuç, bizim çalışma sonucumuz olan leptin uygulamasının embriyo ve civciv gelişimini etkilememesi ile uyumludur. Serum leptin düzeyinin değişmemesine bağlı olarak canlı ağırlıklarında bu çalışmada incelenen her bir yaşta değişmemesi bu ilişkiden kaynaklanmış olabilir. Farklı dozlarda leptinin ICV enjeksiyonunun civcivlerde canlı ağırlık üzerine herhangi bir etkisi olmadığını bildirmesi (Mácãjová ve ark.,2003; Kuo ve ark.,2005) bizim sonuçlarımızla uyumludur. Leptin uygulaması embriyo ve civciv gelişimini etkimezken, bağırsak ağırlığının günlük civcivlerde 1 µg leptin enjeksiyonu ile diğer uygulama gruplarından önemli düzeyde artması leptin etkisi ile çıkış sonrası ilk hafta sindirim sistem etkinliğinin artması ile yorumlanabilir. Bunun nedeni, bu grubun yem tüketiminin azalması ile ilişkili olabilir. Çünkü leptin insülin sekresyonunu inhibe ederek yem tüketimi düzenlenmesinde

önemli rol oynamaktadır (Taouis ve ark.,2001). Bu çalışmada, leptin doz gruplarında günlük hesaplanan yem tüketiminin azaldığı ortaya çıkmıştır. Bu sonuc, leptinin merkezi sinir sistemi üzerindeki etkisi ile seçici hipotalamik nöro-peptidler aracılığıyla yem tüketimini etkilemesine bağlı olarak gerçekleştirdiğini bildiren (Dridi ve ark., 2005) çalışma sonucu ile açıklayabiliriz. Ayrıca. leptin büyümekte olan civcivlerde yem tüketimi yani iştahın düzenlenmesi üzerindeki engelleyici etkisinin yaşa bağlı olması da (Cassy ve ark., 2004b) bu sonucu doğrulamaktadır. Dolayısıyla, leptin uygulamasının çıkış sonrası bir hafta büyütme sonunda etlik civcivlerin yem tüketimindeki artışın enerji metabolizmasının artmasından kaynaklanmış olabileceği de bu duruma bir açıklama olabilir.

Değişik dozlarda leptin verilen civcivlerde yem tüketimi, su tüketimi, atlama, kaçış, gagalama ve dışkılama tipi davranışlar üzerine etkisi bulunmadığı belirtilmiştir (Denbow ve ark., 2000; Mácăjová ve ark., 2003). Kanatlılarda leptinin yem ve su tüketimdavranışları ile birlikte bazı davranış özelliklerinden olan ayakta kalma, oturma, tüy düzeltme, derin dinlenme, dışkılama üzerine önemli bir etkisinin olmadığı da bildirilmiştir (Sims ve ark., 2017).Bu çalışmada. IO leptin uygulaması ile korku davranışının ölçütü olarak kabul edilen hareketsiz kalma süresinde değişim olmaması leptinin davranış parametreleri üzerinde önemli bir etkisi olmadığını bildiren çalışma sonuçları ile uyumlu bir sonuçtur.

Sonuç olarak, leptin hormonunun maternal kökenli olup yaşa bağlı olarak değişim gösterdiği ve leptin doz düzeyine bağlı olarak embriyonun metabolizmasını etkilediği, kan lipid metabolizmasını etkilemediği ancak günlük yaştaki civcivlerin serum toplam protein düzeyini ile birlikte 7 günlük yaştaki civcivlerin serum HDL düzeyini gerilediği, leptin dozuna bağlı olarak orta parmak ve incik uzunluklarının 7 günlük yaşta gerilediği, çıkış sonrası erken büyütme dönemine kıyasla embriyo gelişim döneminde IO leptin enjeksiyonun incik uzunluğunda asimetri gelişimine yol açtığı, embriyo ve civciv gelişimini ve korku davranışını etkilemezken yem tüketimini azalttığı, bağırsak gelişimini arttırdığı ortaya çıkmıştır.

IO leptin uygulamasının embriyo ve civciv gelişimini etkilemediği, leptin doz düzeyine ve embriyonik yaşa bağlı olarak embriyo metabolizması ile birlikte çıkıştan sonra erkek etlik civcivlerin kolesterol metabolizmasını etkilediği şeklinde bu çalışma sonucu yorumlanabilir.

KAYNAKLAR

- Abbas, A. O., El-Dein, A. A., Desoky, A. A., Galal, M. A. 2008. The effects of photoperiod programs on broiler chicken performance and immune response. *International Journal of Poultry Science*, **7**(7), 665-671.
- Adachi, H., Takemoto, Y., Bungo, T., Ohkubo, T. 2008. Chicken leptin receptor is functional in activating JAK-STAT pathway in vitro. *Journal of Endocrinology*, **197**(2), 335-342..
- Ahima, R. S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E., Flier, J. S., 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, **382**(6588), 250..
- Ahima, R. S., Osei, S. Y. 2004. Leptin signaling. *Physiology & behavior*, **81**(2), 223-241.
- Altan, Ö., Açıköz, Z., Bayraktar, ÖH., Köse, FA., 2017. Ovo vitamin c ve e enjeksiyonunun ısı stresine maruz kalan etlik piliçlerde gelişim performansı ve oksidatif stabilite üzerine etkileri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Derg*, **54**(3):259-266.
- Anonim, 2018 IO enjeksiyon uygulanabilirliği. <http://www.thepoultrysite.com/articles/> Erişim tarihi: 12.11.2018.
- Ashwell, CM., Czerwinski, SM., Brocht, DM., McMurtry, JP., 1999a. Hormonal regulation of leptin expression in broiler chickens. *American Journal of Physiology*, **276**:226-232.
- Ashwell, CM., McMurtry, JP., Wang, XH., Zhou, Y., Vasilatos-Younken, R., 1999b. Effects of growth hormone and pair-feeding on leptin mRNA expression in liver and adipose tissue. *Domestic Animal Endocrinolog*, **17**: 77-84.
- Aslan, K., Serdar, Z., Tokullugil, HA., 2004. Multifonksiyonel hormon: leptin. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **30**:113-118.
- Avçılar, ÖV., Onbaşlar, EE., 2016. Effects of breeder age and early energy restrictIO on fattening performance. some meat quality traits and plasma leptin concentration of broilers. *Ankara Üniversitesi Veteriner Faültesi Dergisi*, **63**:69-76.
- Babacanoglu, E., 2010. *Etlik Damızlık Dişilere Kortikosteron Verilerek Oluşturulan Maternal Stresin Yumurta Kortikosteron Düzeyine. Embriyo Ve Cıvcıvlerde Gelişme ve Fizyolojik Parametreler Üzerine Etkileri*. Doktora tezi. EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Bornova İzmir
- Babacanoglu, E., Yalçın, S. 2015. Effect of maternal stress on relative asymmetry and fear behaviour of broilers reared under harsh environmental conditions. Proceedings of the 3th International. *Poultry Meat Congress*, 22-26 Nisan 2015, Antalya, Turkey, 386-390.
- Babacanoglu, E., Karageçili, MR., Karadaş, F., 2018. Effects of egg weight and in ovo injection of α -tocopherol on chick development. hatching performance. and lipid-soluble antioxidant concentrations in quail chick tissues. *Arch. Animal. Breed*, **61**: 179-189.
- Babacanoglu, E., 2018. Responses of developmental and Physiological traits to manipulated incubation conditions in broiler embryos at hypoxic high altitude. *Arch. Anim. Breed*, **61**: 337-349.

- Babacanoglu, E., Güler, HC., 2018. High temperature and oxy-gen supplementation can mitigate the effects of hypoxia on developmental stability of bilateral traits during incubation of broiler breeder eggs. *Animal*, **12**:1584–1593.
- Bungo, T., Shimojo. M., Masuda. Y., Tachibanab. T., Tanaka. SJ., Sugahara. K., Furuse. M., 1999., Intracerebroventricular administration of mouse leptin does not reduce food intake in the chicken. *Brain Research*, **817** 196–198.
- Cellak, B., Babacanoglu, E., 2018. The Effect of in Ovo Leptin Administration on Indicators of Embryonic Metabolism in Broilers. *International Agricultural Science Congress*. 9-12 Mayıs 2018 Van Türkiye. 20-22.
- Bruggeman, V., Onagbesan, O. M., Decuypere, E. 2000. Body weight, fat content, liver weight and plasma leptin concentrations in broiler breeder females reared under ad libitum feeding, restricted feeding or combinations of both until age of first egg. *British Poultry Science*, **41**(S1), 57-59.
- Carter, TC., 1975. The hen's egg: Estimation of shell superficial area and egg volume, using measurements of fresh egg weight and shell length and breadth alone or in combination. *British Poultry Science*, **16**: 541–543.
- Cassy, S., Derouet, M., Crochet, S., Dridi, S., Taouis, M., 2003. Leptin and insulin downregulate leptin receptor gene expression in chicken-derived leghorn male hepatoma cells. *Poultry Science*, **82**:1573–1579.
- Cassy, S., Metayer, S., Crochet, S., Rideau, N., Collin, A., Tesseraud, S., 2004a. Leptin receptor in the chicken ovary: potential involvement in ovarian dysfunction of ad libitum-fed broiler breeder hens. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **2**:72
- Cassy, S., Picard, M., Crochet, S., Derouet, M., Keisler, DH., Taouis, M., 2004b. Peripheral leptin effect on food intake in young chickens is influenced by age and strain. *Domestic Animal Endocrinology*, **51**:6.
- Denbow, D. M., Meade, S., Robertson, A., McMurtry, J. P., Richards, M., & Ashwell, C. 2000. Leptin-induced decrease in food intake in chickens. *Physiology & Behavior*, **69**(3), 359-362..
- Deeming, D.C., 2005. Yolk sac, body dimensions and hatchling quality of ducklings, chicks and poults, br. *Poultry. Science*, **465**: 560–564.
- Dridi, S., Swennen. Q., Decuypere. E., Buyse. E., 2005. Mode of leptin action in chicken hypothalamus. *Brain Research*, **47**: 214 – 223.
- Dridi, S., Derouet, M., Tesseraud, S., Taouis, M., 2008. Acute cold- and chronic heat- exposure upregulate hepatic leptin and muscle uncoupling protein (UCP) gene expression in broiler chickens. *J. Exp. Zool*, **9**:381–388.
- Elmqvist. JK., Bjorbaek. C., Ahima. RS., Flier. J., Saper. CB., 1999. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain *The Journal of Comparative Neurology*, **3**: 535-547.
- Eliasiewicz, EP., Weglarz, MP., Proudman, J., Jacek, T., Mika, M., Sechman, A., Rzasca. J., Gertler, A., 2006. Exogenous leptin advances puberty in domestic hen. *Domestic Animal Endocrinology*, **3**:211-226.
- Erhan, F., Ergün, L., 2018. Kanatlı ve memeli karaciğerinde karbonhidrat ve yağ metabolizmasının karşılaştırılması. *MAKÜ Sag. Bil. Enst. Dergisi*: **6**(1): 33-42.
- Escobar-Morreale, HF., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G., 1997. Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. *Endocrinology*, **138**:(10):4485–4488.
- Farkašová, H., Hron, T., Pačes, J., Paje, P., Elleder, D., 2016. Identification of a GC-rich leptin gene in chicken. *Agri Gene Volume* **1**, 88–92.

- Friedman-Einat, M., Boswell, T., Horev, G., Girishvarma, G., Dunn, I. C., Talbot, R. T., Sharp, P. J. 1999. The chicken leptin gene: has it been cloned?. *General and comparative endocrinology*, **115**(3), 354-363..
- Florkowski, CM., Collier, GR., Zimmet, PZ., Livesey, JH., Espiner, EA., Donald, RA., 1996. Low- dose growth hormone replacement lowers plasma leptin and fat stores without affecting body mass index in adults with growth hormone deficiency. *Clinical Endocrinology*, **45**(6):769–773.
- Foye, O. T., Uni, Z., Ferket, P. R. 2006. Effect of in ovo feeding egg white protein, β -hydroxy- β -methylbutyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys. *Poultry Science*, **85**(7), 1185-1192.
- Gettys, T. W., Harkness, P. J., Watson, P. M. 1996. The beta 3-adrenergic receptor inhibits insulin-stimulated leptin secretion from isolated rat adipocytes. *Endocrinology*, **137**(9), 4054-4057.
- Güzel.M.,2016.Kafes kuşlarında hipoglisemi sendromu. *Turkiye Klinikleri J Vet Sci Intern Med-Special Topics*, **2**(3):66-8
- Güz. B.,2014. *Etilik damızlık yumurtalarına leptin in-ovo enjeksiyonunun çıkış gücü ve piliç performansı üzerine etkileri*. Yüksek lisans tezi. EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü. Bornova. İzmir.
- Hardie, J., Guilhot, N., Tryhurn, P.,1996. Regulation of leptin production in cultured mature white adipocytes. *Horm Metab Res*, **28** (12):685 – 93.
- Harris, R. B. 1998. Acute and chronic effects of leptin on glucose utilization in lean mice. *Biochemical and biophysical research communications*, **245**(2), 502-509.
- Hausman, GJ., Barba, CR., Fairchild, BD., Gamble, J., Lee-Rutherford, L.,2012. Expression of genes for interleukins. neuropeptides. growth hormone receptor. and leptin receptor in adipose tissue from growing broiler chickens. *Domestic Animal Endocrinology*, **43** 260–263.
- Henry, M. H., Burke, W. H., 1999. The effects of in ovo administration of testosterone or an antiandrogen on growth of chick embryos and embryonic muscle characteristics. *Poultry science*, **78** (7), 1006-1013.
- Hen, G., Yosefi, S., Ronin, A., Einat, P., Rosenblum, CI., Denver, RJ., Friedman-Einat, M., 2008. Monitoring leptin activity using the chicken leptin receptor. *Journal of Endocrinology*, **197**: 325-333.
- Horev, G., Einat, P., Aharoni, T., Eshdat, Y., Friedman-Einat, M., 2000. Molecular cloning and properties of the chicken leptin receptor (CLEPR) gene. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **162**: 95-106.
- Hossain, SM., Barreto, SL., Bertechini, AG., Rios, AM., Silva, CG.,1998. Influence of Dietary Vitamin E Level on Egg Production of Broiler Breeders. and on the Growth and Immune Response of Progeny in Comparison with The Progeny from Eggs Injected with Vitamin E. *Animal Feed Science and Technology*. **73**: 307-317.
- Huang, JX., Luo, XG., Lu, L., Liu, B., 2008. Effects of age and strain on yolk sac utilization and leptin levels in newly hatched broilers. *Poultry Science*, **87**: 2647–2652.
- Hu, Y., Ni, Y., Ren, L., Dai, J., Zhao, R., 2008. Leptin is involved in the effects of cysteamine on egg laying of hens. characteristics of eggs. and posthatch growth of broiler offspring. *Poultry Science*, **87**(9).1810-1817.

- Hu.Y., Zhang. R., Zhang. Y., Li. J., Grossmann. R., Zhao. R.,2012. In ovo leptin administration affects hepatic lipid metabolism and microRNA expression in newly hatched broiler chickens. *Journal of Animal Science and Biotechnology*,**3**(1):16.
- Himms-Hagen, J.,1999. Physiological roles of the leptin endocrine system: differences between mice and humans. *Crit Rev Clin Lab Sci*.**36**: 575–655.
- Hill. D., 2001. Chick length uniformity profiles as a field measurement of chick quality. *Avian and Poultry Biology Reviews*, **12**: 188.
- Kennedy, GC., 1953. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proceedings of the Royal Society of London B.*,**14**: 578-592
- Keralapurath, MM., Gerard, PD.,2010. Piping Muscle and Liver Metabolic Profile Changes and Relationships in Broiler Embryos on Days 15 and 19 of Incubation. *Poultry Science*,**89**: 860–865.
- Khamseh, EK., 2014. *Etlik Piliçlerde Yem Sınırlaması İle Termoregülasyon ve Kan Leptin Düzeyi Arasındaki İlişkiler*. EÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, İzmir
- Kılıç. F., 2008.*Etlik ve yumurtacı piliçlerin leptin geni (ob) bakımından incelenmesi*. Doktora tezi. EÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, İzmir
- Kuo, AY., Cline, MA., Werner, E., Siegel, PB., Denbow, DM., 2005.Leptin effects on food and water intake in lines of chickens selected for high or low body weight. *Physiology & Behavior*,**84**(3):459-464pp.
- Küçük Kurt, İ., 2015.Leptin ve diğer hormonlar üzerindeki etkileri. *Kocatepe Vet J* **8**(1): 75-83.
- Lamosova, D., Zeman, M., 2001. Effect of Leptin and Insulin on Chick Embryonic Muscle Cells and Hepatocytes. *Physiol. Res.* **50**: 183–189.
- Lamosova,D., Cajov, MM., Zeman, M., Mozes. Z., Jezova, D., 2003. Effect of in ovo leptin administration on the development of japanese quail.*Physiol. Res.* **52**: 201-209.
- Lee, G. H., Proenca, R., Montez, J. M., Carroll, K. M., Darvishzadeh, J. G., Lee, J. I., Friedman, J. M. 1996. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice.*Nature*,**379**(6566), 632-635.
- Lei, M. M., Wu, S. Q., Li, X. W., Wang, C. L., Chen, Z., Shi, Z. D. 2014. Leptin receptor signaling inhibits ovarian follicle development and egg laying in chicken hens.*Reproductive Biology and Endocrinology*,**12**(1), 25.
- Macajova. M., Lamosova. D., Zeman. M., 2003.Physiological Effects of Leptin. Insulin and Triamcinolon on Adult Male Japanese Quail.*Acta Veterinaria*,**72**: 515-522.
- Meijerhof, R., 2006. Chick size matters. *World Poultry Science Journal*, **22**:30-31.
- Mercer, JG., Hoggard, N., Williams, LM., Lawrence, CB., Hannah, LT., Trayhurn, P., 1996. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Letters*, **387**; 113-116.
- McMurtry, J., Ashwell, C., Richards, M., 2000. Hormonal and developmental regulation of leptin gene expression in the chicken. *In: Proceeding of the 7th International Symposium on Avian Endocrinology*.Gupta. D. Varanasi. India.
- Molenaar, R., Reijrink, AM., Meijerhof, R., Van Den Brand, H., 2010. Meeting embryonic requirements of broilers throughout incubation. a review. *Brazilian Journal of Poultry Science*,**12** (3): 137 -148.
- Moosanezhad, MK., Salahı, A., Mousavi, SN., 2011.The influence of egg shell crack types on hatchability and chick quality.*Turk. J. Vet. Anim. Sci*, **36**(3): 289-295.

- Morrison, CD., Daniel, JA., Holmber., BJ., Djiane, J., Raver, N., Gertler, A., Keisler, DH., 2001. Central infusion of leptin into well-fed and undernourished ewe lambs: effects on feed intake and serum concentrations of growth hormone and luteinizing hormone. *The Journal of Endocrinology*, **168**: 317-324.
- Muller, G., Ertl, J., Gerl, M., Preibisch, G., 1997. Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem*, **272**: 10585-10593.
- Noy, Y., Uni, Z., 2010. Early Nutritional Strategies. World's. *Poultry Science Journal*. **66**:639-646.
- Ninov, K., Ledur, MC., Alves, HJ., Rosario, MF., Nones, K., Coutinho, LL., 2008. Investigation of leptin gene in broiler and layer chicken lines. *Scientia Agricola*. **65**: 214-219.
- Ohkubo, T., Tanaka, M., Nakashim, K., 2000. Structure and tissue distribution of chicken leptin receptor (cOb-R) mRNA. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1491**:303-308.
- Ohkubo, T., Adachi, H., 2008. Leptin signaling and action in birds. *The journal of poultry science*, **45**:230-240.
- Ohkubo, T., Murase, M., Hirota, K., Adachi, H., Takeda, TN., Sugita, S., 2014. Avian blood induced intranuclear translocation of STAT3 via the chicken leptin receptor. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 174 9–14.
- Ohta, Y., Kidd, MT., 1999. Optimum site for in ovo amino acid injection in broiler breeder eggs. *Poultry Sci.* **80**:1425–1429
- Ohta, Y., Kidd, MT., Ishibashi, T., 2001. Embryo growth and amino acid concentration profiles of broiler breeder eggs. embryos. and chicks after in ovo administration of amino acids. *Poultry Sci.* **80**:1430– 1436.
- Onagbesan. O., V. Bruggeman. L., De Smit. M., Debonne. A., Witters. K., Tona. N., Everaert, E., 2007. Decuypere.gas exchange during storage and incubation of avian eggs. effects on embryogenesis. hatchability. chick quality and post-hatch growth. world's. *Poultry Science Journal*, **63**; 557-573.
- Paczoska-Eliasiewicz, HE., Gertler, A., Proszkowiec, M., Proudman, J., Hrabia, A., Sechman, A., Mika, M., Jacek, T., Cassy, S., Raver, N., Rzasca, j., 2003. Attenuation by leptin of the effects of fasting on ovarian function in hens (*Gallus domesticus*). *Reproduction*, **126**(6):739-51.
- Paczoska-Eliasiewicz, HE., Proszkowiec-Weglarz, M., Proudman, J., Jacek. T., Mika, M., Sechman, A., Rzasca, J., Gertler, A., 2006. Exogenous leptin advances puberty in domestic hen. *Domestic Animal Endocrinology*, **31** (3).211-226.
- Park, HK., Ahima, RS., 2014. Leptin signaling. *F1000Prime Reports*, **6**:73 doi:10.12703
- Patel, B., Koemig, J., Kaplan, L., Hooi, S., 1998. Increase in plasma leptin and Lep mRNA concentrations by food intake is dependent on insulin. *Metabolism*, **47**: 603-607.
- Peebles, ED., McDaniel, CD., 2004 A Practical manual for understanding the shell structure of broiler hatching eggs and measurements of their quality. *Bulletin* 1139.
- Piekarski, A., Nagarajan, G., Ishola, P., Flees, J., Greene, E. S., Kuenzel, W. J., Dridi, S. 2018. AMP-activated protein kinase mediates the effect of leptin on avian autophagy in a tissue-specific manner. *Frontiers in physiology*, 9.

- Rabie, MH., Ismail, FSA., Ahmed, AAS., 2015. Effect of In ovo Injection of L-Carantine at Different Incubational Ages on Egg Hatchability in Broiler Breeders and Post-Hatch Performance. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances Volume, 10* (12): 875-884.
- Rasha, E., Azab, Fattahalla, MM., Azab, M.E., Ismail, RS., 2012. Physiological studies on the effect of in ovo leptin administration in Japanese quail. *Benha veterinary medical journal, 23*. no. 2: 71-78.
- Ricks, CA., Mendu, N., Phelps, PV., 2003. The Embryonated Egg: A Practical Target for Genetic Based Advances to Improve Poultry Production. *Poultry Science, 82*:931-938
- Richards, MP., Poch, SM., 2003. Molecular cloning and expression of the turkey leptin receptor gene. *Comparative Biochemistry and Physiology, 136*, 833-847.
- Richards, MP., 2003. Genetic regulation of feed intake and energy balance in broiler. *Poultry Science, 82*:907-916.
- Salmanzadeh, M., 2012. The effects of in-ovo injection of glucose on hatchability, hatching weight and subsequent performance of newly-hatched chicks. *Brazilian Journal of Poultry Science, 4*, 71-158.
- SAS., 2009. SAS/STAT User's Guide, Version 9.1.3. SAS Institute Inc., Cary, NC
- Sato, K., Nishida, M., Akiba, Y., 2003. Nutritional modulation of leptin messenger RNA in broiler chickens. *The Journal of Poultry Science, 40*: 13-20.
- Seroussi, E., Cinnamon, Y., Yosefi, S., Genin, O., G Smith, JG., Rafati, N., Bornelöv, S., Andersson, L., Einat, FM., 2016. Identification of the Long-Sought Leptin in Chicken and Duck: Expression Pattern of the Highly GC-Rich Avian leptin Fits an. *Autocrine/Paracrine Rather Than Endocrine Function. Endocrinology, 2*:737-751.
- Shafey, TM., Mahmoud, AH., Alsobayel, AA., Abouheif, MA., 2014. Effects of in ovo administration of amino acids on hatchability and performance of meat chickens. *South African Journal of Animal Science* (No. 2).
- Shadi, S., Yarandi, MD., Gautam Hebbbar, MD., Cary, G., Sauer, MD., Conrad, R., Cole, MD., 2011. Diverse roles of leptin in the gastrointestinal tract: Modulation of motility, absorption, growth, and inflammation. *Nutrition, 27* 269-275.
- Sharma, JM., Burmester, BR., 1982. Resistance to Marek's disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpesvirus. *Avian Diseases, 26*. 134-149.
- Sharma, JM., Lee, LF., Wakenell, PS., 1984. Comparative viral, immunologic, and pathologic responses of chickens inoculated with herpesvirus of turkeys as embryos or at hatch. *Am. J. Vet. Res. 45*. 1619-1623.
- Smirnov, A., Tako, E., Ferket, P., Uni, Z., 2006. Mucin gene expression and mucin content in the chicken intestinal goblet cells are affected by in ovo feeding of carbohydrates. *Poult. Sci. 85*: 669-673.
- Sirotkin, AV., Grossman, R., 2015. Interrelationship between feeding level and the metabolic hormones leptin, ghrelin and obestatin in control of chicken egg laying and release of ovarian hormones. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 184:1-5.
- Sims, W., Yi, J., Cline, MA., Gilbert, ER., 2017. Central injection of a synthetic chicken partial leptin peptide does not affect food intake in chicks. *Neuroscience Letters, 656*:165-168.

- Slieker, L.J., Sloop, K.W., Surface, P.L., Kriauciunas, A., LaQuier, F., Manetta, J., Stephens, T.W., 1996. Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *Journal of Biological Chemistry*, **271**(10):5301-5304.
- Su, La., Raoa, K., Guoa, F., Lia, X., Ahmeda, A.A., Nia, Y., Grossmann, R., Zhaoa, R., 2012. In ovo leptin administration inhibits chorioallantoic membrane angiogenesis in female chicken embryos through the STAT3- mediated vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway. *Domestic Animal Endocrinology*, **43** 26–36.
- Surai, P.F., Fisinin, V., Karadas, F., 2016. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. vitamin e. carotenoids and selenium. *Animal Nutrition*, **2**(1): 1-11.
- Tako, E., Ferket, P., Uni, Z., 2004. Effects of in ovo feeding of carbohydrates and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on the development of chicken intestine. *Poult. Sci.* **83**. 2023–2028.
- Tako, E., Ferket, P.R., Uni, Z., 2005. Changes in chicken intestinal zinc exporter mRNA expression and small intestinal functionality following intra-amniotic zinc-methionine administration. *J. Nutr. Biochem*, **16**: 339–346
- Tako, E., Glahn, R. P., 2012. Intra-amniotic administration and dietary inulin affect the iron status and intestinal functionality of iron-deficient broiler chickens. *Poultry science*, **91**(6), 1361-1370..
- Taouis, M., Chen, J.W., Daviaud, C., Dupont, J., Derouet, M., Simon, J., 1998. Cloning the chicken leptin gene. *Gene*. **208**: 239-242.
- Taouis, M., Dridi, S., Cassy, S., Benomar, Y., Raver, N., Rideau, N., Picard, M., Williams, J., Gertler, A., 2001. Chicken leptin: properties and actions. *Domestic Animal Endocrinology*, **22**: 319-327.
- Taouis, M., Dupont, J., Gillet, A., Derouet, M., Simon, J., 1998. Insulin receptor substrate 1 antisense expression in an hepatoma cell line reduces cell proliferation and induces overexpression of the Src homology 2 domain and collagen protein (SHC). *Mol Cell Endocrinol*, **137**:177–86.
- Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Tepper, R.I., 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor. *OBR. Cell*. **837**:1263-1271.
- Tartaglia, L. A., 1997. The leptin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **272**(10), 6093-6096.
- Tülüceoğlu, E.E., Calapoğlu, N.Ş., 2018. Leptin ilişkili Sinyal Yolaklarının Obezitedeki Rolü. *Gelecek Vizyonlar Dergisi*, **2**:(1).
- Tona, K., Decuypere, E., Coucke, W., 2001 The effects of strain, hen age and transferring eggs from turning to stationary trays after 15 to 18 days of incubation on hatchability. *Br. Poultry Sci*, **42**; 663 – 667.
- Uni, Z., Ferket, P.R., 2003. *Enhancement of development of oviparous species by in ovo feeding*. US patent number 6.592.878.
- Uni, Z., Ferket, P.R., 2004. Methods for early nutrition and their potential. world's. *Poultry Science Journal*, **60**: 101-111.
- Uni, Z., Ferket, P.R., Tako, E., Kedar, O., 2005. In Ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. *Poultry Science*, **84**:764–770.
- Výboh, P., Zeman, M., Bilčík, B., Šárníková, Košťál, L., 2010. Angiogenic effect of leptin in the quail chorioallantoic membrane. *Acta Vet. Brno*, **79**: 13–17;

- Wakeneil, P.S., Bryan, T., Schaeffer, J., Avakian, A., Williams, C., Whitfill, C., 2002. Effect of in ovo vaccine delivery route on HVT/SB-1 efficacy and viremia. *Avian Dis.* **46**:274–280.
- Wang, F., Lu, L., Yuan, H., Tian, Y., Li, J., Shen, J., Tao, Z., Fu, Y., 2011. Molecular cloning, expression, and regulation of goose leptin receptor gene in adipocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **353**: 267-274.
- Willemsen, H., Everaert, N., Witters, A., De Smit, L., Debonne, M., Verschuere, F., Garain, P., Berckmans, D., Decuypere, E., Bruggeman, V., 2008. Critical Assessment of Chick Quality Measurements as an Indicator of Posthatch Performance. *Poultry Science*. **87**:2358-2366.
- Willemsen, H., Kamers, B., Dahlke, F., Han, H., Song, Z., Ansari Pirsaraei, Z., Tona, K., Decuypere, E., Everaert, N., 2010. High- and low-temperature manipulation during late incubation, Effects on embryonic development, the hatching process, and metabolism in broilers. *Poultry Science*, **89** :2678–2690.
- Yalçın, S., Siegel, P. B. 2003. Developmental stability of broiler embryos in relation to length of egg storage prior to incubation. *The Journal of Poultry Science*, **40**(4), 298-308.
- Yalçın, S., Koçak, Ç., 2009. *Etlik Piliç Üretimi*. Hasad Yayıncılık. 978-975-8377-71-8.
- Yan, M., Zhang, J., Yang, H., Sun, Y., 2018. The role of leptin in osteoarthritis. *Medicine*, **97**:14.
- Yang, S.J., Denbow, D.M., 2007. Interaction of leptin and nitric oxide on food intake in broilers and Leghorns. *Physiology & Behavior*, **92**(4):651-657.
- Yang, A., Dunnington, E. A., Siegel, P.B., 1997. Developmental stability in stocks of white leghorn chickens. *Poult. Sci.* **76**:1632–1636.
- Yosefi, S., Hen, G., Rosenblum, C.I., Cerasale, D.J., Beaulieu, M., Criscuolo, F., Friedman-Einat, M., 2010. Lack of leptin activity in blood samples of Adelie penguin and bar-tailed godwit. *Journal of Endocrinology*, **20**: 113–122.
- Yuana, L., Wang, Y., Hu, Y., Zhao, R., 2017. In ovo leptin administration modulates glucocorticoid receptor mRNA expression specifically in the hypothalamus of broiler chickens. *Neuroscience Letters*, **6** 181–188.
- Zhai, W., Bennett, L.W., Gerard, P.D., Pulikanti, R., Peebles, E.D., 2011. Effects of in ovo injection of carbohydrates on somatic characteristics and liver nutrient profiles of broiler embryos and hatchlings. *Poultry Science*, **90**: 2681–2688
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J. M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. **372**: 425-432.
- Zhang, Y., Sharma, J. M., 2001. Early posthatch protection against Marek's disease in chickens vaccinated in ovo with a CVI988 serotype 1 vaccine. *Avian diseases*, 639-645.
- Zheng, J., Fang, J., Yin, Y.J., Wang, X.C., Ren, A.J., Bai, J., 2010. Leptin protects cardiomyocytes from serum-deprivation-induced apoptosis by increasing antioxidant defense. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **37**:955–962.

ÖZ GEÇMİŞ

1975 yılında Van' da doğdu ilk ve orta öğrenimini Van'da bitirdi. 1993 /1995 yıllarında YYÜ Erciş Meslek Yüksek Okulu Elektrik Bölümü bitirdikten sonra 1998 yılında YYÜ Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümüne yerleşti 2002 yılında mezun olduktan sonra 2004 yılında Gıda ve Orman Bakanlığında Ziraat Mühendisi olarak çalışmaya başladı. Halen bu göreve devam etmekte 2015 yılında YYÜ Zootekni Bölümünde yüksek lisans yapmaya başlamıştır.



T.C
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih:14/11/2018

Tez Başlığı / Konusu: Kuluçkalık Yumurta İçi (In Ovo) Leptin Enjeksiyonunun Etlik Piliç Embriyolarının Gelişimleri Ve Fizyolojik Parametreleri Üzerine Etkisi.

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana, bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 28 sayfalık kısmına ilişkin, 13/11/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 3 (yüzde üç) dür.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın

herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Bülent CELLAK

Öğrenci No: 159101048

Anabilim Dalı: Zootekni

Programı: Hayvan Yetiştirme ve Islahı

Statüsü: Y. Lisansx Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR

Dr. Öğr. Üyesi Elif BABACANOĞLU

(Unvan, Ad Soyad, İmza)