

138226

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**YUMURTAYA VERİLEN AFLATOKSİN B<sub>1</sub>' İN, ETÇİ PİLİÇLERİN KEMİK  
DÖKULARININ EMBRİYONİK GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

YASEMİN ÖZNURLU

DANIŞMAN

PROF. DR. İLHAMİ ÇELİK

KONYA-2003

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**YUMURTAYA VERİLEN AFLTATOKSİN B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)'İN ETÇİ PİLİÇLERİN KEMİK  
DÖKULARININ EMBRİYONİK GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

YASEMİN ÖZNURLU

DANIŞMAN

PROF. DR. İLHAMİ ÇELİK

KONYA-2003

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

**YUMURTAYA VERİLEN AFLATOKSİN B<sub>1</sub>' İN, ETÇİ PİLİÇLERİN  
KEMİK DOKULARININ EMBRİYONİK GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ  
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

YASEMİN ÖZNURLU

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 18.12. 2003 tarihinde sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oy birliği ile kabul edilmiştir.

(S.B.E. Yön. Kur. Karar tarih ve No:.....)

**Tez Jürisi: Jüri Başkanı**

Prof. Dr. Refik SOYLU

Danışman

Prof. Dr. İlhami ÇELİK

Üye

Prof. Dr. Hasan CÜCE

Üye

Prof. Dr. Mine YAKIŞIK

Üye

Doç. Dr. Halis OĞUZ

**KISALTMALAR**

<b>AF:</b>	Aflatoksinler
<b>AFB<sub>1</sub>:</b>	Aflatoksin B <sub>1</sub>
<b>TD:</b>	Tibial Kondrodisplazi
<b>MFO:</b>	Mixed Function Oxidase
<b>AST:</b>	Aspartat amino transferaz
<b>ALT:</b>	Alanin amino transferaz
<b>ALP:</b>	Alkalen fosfataz
<b>ACP:</b>	Asit Fosfataz
<b>GGT:</b>	Gama glutamil transferaz
<b>ICD:</b>	İzositrik dehidrogenaz
<b>LDH:</b>	Laktat Dehidrogenaz
<b>IARC:</b>	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
<b>G<sub>6</sub>PDH:</b>	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
<b>MDH:</b>	Malik dehidrogenaz
<b>PGIM:</b>	Fosfolukozizomeraz
<b>PTH:</b>	Parathormon
<b>CT:</b>	Kalsitonin
<b>Vit. D<sub>3</sub>:</b>	Kolekalsiferol
<b>STH:</b>	Somatotropik hormon
<b>IGF I-II:</b>	Somatomedinler
<b>OC:</b>	Osteokondrozis

## İÇİNDEKİLER

1.	GİRİŞ.....	1-2
2.	LİTERATÜR BİLGİ.....	3-42
2.1.	Küflerin İnsan ve Hayvan Sağlığı Açısından Önemi, Mikotoksinler ve Mikotoksikozisler.....	3
2.2.	Aflatoksinler.....	4
2.2.1.	Aflatoksinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	5
2.2.2.	Aflatoksinlerin Sindirim Kanalından Emilimleri ve Metabolizmaları.....	5
2.2.3.	Aflatoksinlerin toksikasyon mekanizmaları .....	9
2.2.4.	Aflatoksinlerin etkileri .....	10
2.2.4.1.	Akut ve kronik toksik etkileri.....	10
2.2.4.2.	Aflatoksinlerin Teratojenik ve Embriyotoksik Etkileri.....	13
2.2.4.3.	Aflatoksinlerin Mutajenik etkileri.....	14
2.2.4.4.	Aflatoksinlerin Karsinojenik etkileri.....	15
2.2.4.5.	Aflatoksinlerin İmmünoşüpresif etkileri.....	15
2.3.	Kemik dokusu.....	17
2.3.1.	Kemik dokusunun embriyonik gelişimi .....	18
2.3.1.1.	Memelilerde kemiğin embriyonik gelişimi .....	19
2.3.1.1.1.	İntramembranöz (primer, dezmal) Ossifikasyon.....	19
2.3.1.1.2.	İntrakartilaginöz (Kondral, Sekonder) Kemikleşme.....	20
2.3.1.1.2.1.	Perikondral kemikleşme.....	20
2.3.1.1.2.2.	Enkondral kemikleşme.....	21
2.3.1.2.	Kanatlılarda kemik dokusunun embriyonik gelişimi .....	22

2.4.	Kemik büyümesi .....	26
2.5.	Büyüme plakası .....	27
2.5.1	Büyüme plakasının vaskülarizasyonu .....	31
2.6.	Kemiğin gelişmesini etkileyen faktörler.....	32
2.6.1.	Ca <sup>+2</sup> metabolizması ve bunu düzenleyen hormonlar.....	32
2.6.2.	Parathormon .....	33
2.6.3.	Kalsitonin .....	34
2.6.4.	Vitamin D <sub>3</sub> .....	34
2.6.5.	Vitamin A .....	36
2.6.6.	Vitamin C.....	36
2.6.7.	Beslenme .....	37
2.6.8.	Gonadal hormonlar .....	37
2.6.9.	Somatotropik hormon .....	37
2.7.	Kanatlılarda iskelet sistemi bozuklukları.....	38
3.	<b>MATERYAL ve METOT .....</b>	<b>43-45</b>
3.1.	Materyal .....	43
3.1.1.	Yumurta materyali .....	43
3.1.2.	Aflatoksin B <sub>1</sub> .....	43
3.2.	Metot .....	43
3.2.1.	Aflatoksin B <sub>1</sub> solüsyonlarının hazırlanması .....	43
3.2.2.	Deney gruplarının oluşturulması ve AFB <sub>1</sub> solüsyonlarının yumurtalara verilmesi.....	43
3.2.3.	Yumurtaların açılması ve doku örneklerinin alınması .....	44
3.2.4.	İstatistiksel analizler.....	45

4.	<b>BULGULAR</b> .....	<b>46-53</b>
4.1.	Embriyonik Ölüm Oranları .....	46
4.2.	Rölatif embriyo ağırlıkları .....	46
4.3.	Tibia'dan Elde Edilen Bulgular.....	48
4.4.	Tibia'nın Proksimal Büyüme Plakasında Yapılan Ölçüm Sonuçları.....	50
5.	<b>TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	<b>54-62</b>
6.	<b>ÖZET</b> .....	<b>63-65</b>
7.	<b>SUMMARY</b> .....	<b>66-67</b>
8.	<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>68-82</b>
9.	<b>ŞEKİLLER</b> .....	<b>83-103</b>
10.	<b>TABLOLAR</b> .....	<b>104-110</b>
11.	<b>GRAFİKLER</b> .....	<b>111-115</b>
12.	<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>116</b>
13.	<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>117</b>

## TABLO ve GRAFİK LİSTESİ

<b>Tablo 2.1:</b>	Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan yedirme denemelerinde, değişik hayvansal dokular ve hayvansal gıdalarda tespit edilen AF düzeyleri.....	<b>8</b>
<b>Tablo 2.2:</b>	Bazı hayvan türleri için AFB <sub>1</sub> 'in LD <sub>50</sub> değerleri .....	<b>11</b>
<b>Tablo 2.3:</b>	Farklı deney hayvanı türlerinde AF'in kanser oluşturan dozları ile verilme süreleri .....	<b>15</b>
<b>Tablo 2.4:</b>	Bazı hayvan türleri ile insanda, embriyonik gelişme döneminde gerçekleşen kemik gelişiminin önemli aşamaları.....	<b>26</b>
<b>Tablo 3.1:</b>	Çalışmada oluşturulan gruplar ve bu gruplardaki yumurtalara uygulanan işlemler.....	<b>44</b>
<b>Tablo 4.1:</b>	Grupların yumurta sayıları, ölü embriyo sayıları, infertil yumurta sayıları ve infertilite hariç mortaliteleri (%).....	<b>104</b>
<b>Tablo 4.2:</b>	Kuluçkanın farklı dönemlerinde tespit edilen ortalama rölatif embriyo ağırlıkları (g).....	<b>104</b>
<b>Tablo 4.3:</b>	Kuluçkanın farklı dönemlerinde tespit edilen ortalama tibia uzunlukları (mm). .....	<b>105</b>
<b>Tablo 4.4:</b>	Kuluçkanın farklı dönemlerinde tespit edilen ortalama tibia ağırlıkları (g)...	<b>105</b>
<b>Tablo 4.5:</b>	Kuluçkanın farklı dönemlerinde tibianın proksimali, orta bölgesi ve distal bölgelerinin ortalama genişlikleri (mm).....	<b>106</b>
<b>Tablo 4.6:</b>	Kuluçka sonrası dönemde tespit edilen ortalama civciv ağırlıkları (g).....	<b>107</b>
<b>Tablo 4.7:</b>	Kuluçka sonrası dönemde tespit edilen ortalama tibia uzunlukları (mm).....	<b>107</b>
<b>Tablo 4.8:</b>	Kuluçka sonrası dönemde tespit edilen ortalama tibia ağırlıkları (g). .....	<b>108</b>



<b>Tablo 4.9:</b>	Kuluçka sonrası dönemde tibia'nın proksimali, orta bölgesi ve distal bölgelerinin ortalama genişlikleri (mm).....	<b>108</b>
<b>Tablo 4.10:</b>	Kuluçkanın farklı dönemlerinde tibial büyüme plakasındaki hücre zonlarının genişlikleri ( $\mu\text{m}$ ).....	<b>109</b>
<b>Tablo 4.11:</b>	Kuluçka sonrası dönemlerde tibial büyüme plakasındaki hücre zonlarının genişlikleri ( $\mu\text{m}$ ).....	<b>110</b>
<b>Grafik 4.1:</b>	Kontrol ve Deney Gruplarında Mortalite Değerleri.....	<b>111</b>
<b>Grafik 4.2:</b>	Kontrol ve Deney Gruplarında Saptanan Embriyonik Ölümün Hamburger-Hamilton Skalasına Göre Belirlenen Embriyonik Gelişme Evrelerindeki Dağılımları .....	<b>112</b>
<b>Grafik 4.3:</b>	Kontrol ve Deney Gruplarında Günlere Göre Ortalama Rölatif Embriyo ve Cıvıv Ağırlıkları.....	<b>113</b>
<b>Grafik 4.4:</b>	Kontrol ve Deney gruplarında Günlere Göre Ortalama Tibia Uzunlukları....	<b>114</b>
<b>Grafik 4.5:</b>	Kontrol ve Deney Gruplarında Günlere Göre Ortalama Tibia Ağırlıkları.....	<b>115</b>

## 1. GİRİŞ

Kanatlı yem ham maddeleri ve yemlerinin uygun olmayan koşullarda depolanmasının ortaya çıkardığı önemli sorunlardan biri, bunlarda üreyen küflerin ürettikleri mikotoksinlerin neden oldukları toksikasyonlardır. Yem ve yem ham maddelerinde en sık ve en fazla oranda tespit edilen mikotoksinler, *Aspergillus* cinsi küflerin sentezlediği metabolitler olan aflatoksinlerdir (AF). Bunların da en sık oranda rastlanılanı ve en toksik olanı aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) dir. Gıdaların, yemlerin ve yem ham maddelerinin bozulmalarına sebep olan aflatoksinler ve özellikle AFB<sub>1</sub>, yem kalitesini düşürmeleri yanında, kanatlı sektöründe yumurta verimini ve damızlık yumurtaların kuluçka randımanını düşürmektedir. Ayrıca, belli oranlarda yumurtaya geçen AFB<sub>1</sub>, civcivlerin normal embriyonik gelişimlerini olumsuz yönde etkilemesi yanında, immün sistemi de baskılamakta ve etkilenen hayvanların iskelet sistemleri de zayıf gelişmektedir. Dolayısıyla böyle hayvanlardan istenilen verim düzeyine ulaşmak mümkün olmadığından, karlılık olumsuz yönde etkilenmektedir.

Hem memeliler ve hem de kanatlılarda mezenkimden köken alan kemik dokusu, vücudu destekleme, şekillendirme, koruma, Ca ve P iyonu için depolama görevi yapma ve kemik iliğini barındırma gibi önemli fonksiyonlara sahiptir. Kanatlılarda embriyonik dönemin erken evrelerinde ekstremite tomurcuklarının merkezi bölgelerine doğru mezenkimal hücrelerin göçü başlamakta ve buralarda kemikler subperiostal kemikleşme yoluyla gelişmektedir. Ekstremitte kemiklerinin öncelikle hiyalin kıkırdak modelleri oluşmakta ve kıkırdak doku tedricen kemik dokuya dönüşmektedir. Ancak kemikleşme, encondral yolla değil, subperiostal yolla gerçekleşmekte ve kıkırdak modelin yüzeyinde, kemiğin diyafizini oluşturacak bölgesinde başlamaktadır. Kemikleşmenin ilerlemesiyle, kemiğin proksimal ve distal uçlarında koni biçimli kıkırdak dokusu, embriyonik yaşam boyunca ve kuluçka sonrası 5-7. güne kadar mineralize olmadan varlığını sürdürmektedir. Kemiğin epifizi ile metafizi arasındaki bu kıkırdak kütlesi "büyüme plakası" olarak isimlendirilmektedir. Kemiğin boyuna (longitudinal) büyümesini sağlayan büyüme plakası, değişik kondrosit tiplerinin şekillendirdiği, farklı zonların bir araya gelmesiyle organize olmuş bir yapıdır. Plakadaki her zon, kondrositlerin diferensiyasyon sürecinin farklı bir evresine karşılık gelmektedir. Memelilerde bu kondrosit zonları düzenli iken, kanatlılarda hücre sütunları daha uzun ve nispeten daha düzensiz bir tertiplenme gösterir.

Broiler yetiştiriciliği, kanatlı sektöründe son yıllarda büyük önem kazanmış ve ülkemizin hayvancılık ekonomisinde önemli bir yere sahip olmuştur. Kısa sürede kesim

ağırlığına ulaşan bu hayvanlar, bu dönem içerisinde bol miktarda yem tüketmekte; bu durum da daha yüksek miktarda mikotoksin alınmasına neden olmaktadır. Damızlık tavukların yemlerinde bulunan ve yumurtaya geçen mikotoksinler ve özellikle de AFB<sub>1</sub>, embriyotoksositeye neden olmaları yanında embriyonun kemik gelişimini de olumsuz yönde etkilemekte, çıkan civcivlerin iskelet sistemlerinde gelişme geriliği ortaya çıkmaktadır. Hızlı bir büyüme sürecine giren civcivlerin zayıf olan kemikleri, hızla artan vücut ağırlığını taşıyamaz hale gelmektedir.

Sonuç olarak; oluşan iskelet sistemi bozukluklarına bağlı olarak ortaya çıkan çeşitli deformasyonlarla kırık ve yaralanmalar, hayvanların yemden yararlanma oranlarını düşürmelerinin yanı sıra, et verimi ve et kalitesini düşürerek önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu iskelet sistemi bozukluklarından biri olan tibial diskondroplazi (TD), henüz etyolojisi tamamen aydınlatılmamış ve broiler yetiştiriciliğinde önemli kayıplara yol açan bir hastalıktır. Hastalık, henüz aydınlatılmamış olan nedenlerle tibianın büyüme plakasındaki avasküler tranzisyonel zonun genişlemesi, Tip X kollagen sentezinin baskılanması, endokondral ossifikasyonun aksaması sonucu büyüme plakasının genişlemesiyle karakterizedir. Lezyon bölgesindeki damarlaşmanın zayıf olmasının bir sonucu olarak, buradaki kondrositler apoptozis veya nekrozla ölümler ve plakada nekrotik odaklar ve yırtılmalar meydana gelir. Hastalığın ortaya çıkışında manganez ve bakır yetmezliklerinin önemli olduğu bilinmekle beraber, temel neden tranzisyonel zondaki kondrositlerin diferensiyasyonunda ortaya çıkan bir aksamadır. Yemdeki mikotoksinlerin kanatlı iskelet sisteminin gelişimi üzerinde zararlı etkilerinin olduğu bilinmekle birlikte, embriyonik dönemdeki iskelet gelişimi üzerindeki etkileri ve özellikle de büyüme plakasının gelişimi üzerindeki etkileri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Daha önceki çalışmalarda AFB<sub>1</sub>'in hücre diferansiyasyonu bozan etkilerinin olabileceği ileri sürüldüğünden, bu toksinin büyüme plakasının embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin aydınlatılması, AFB<sub>1</sub>'in broilerlerdeki çeşitli iskelet sistemi bozuklukları ve özellikle de TD'nin ortaya çıkışındaki hazırlayıcı rollerinin belirlenmesinde önemli katkılar sağlayacaktır.

## 2. LİTERATÜR BİLGİ

### 2.1. Küflerin Sağlık Açısından Önemleri, Mikotoksinler ve Mikotoksikozisler

Yem ham maddesi olarak kullanılan arpa, buğday, mısır gibi tahıllar hasat sırasında, hasat sonrasında ve depolama aşamasında sıklıkla küflerle kontamine olabilmektedirler (Adams 1983). *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Helminthosporium* ve *Rhizophus* gibi küflerin tarlada, *Aspergillus* ve *Penicillium* küflerinin ise çoğunlukla depolama aşamasında ürettiği kaydedilmiştir (Birbir ve ark 1995). Bu küfler dünyanın her yerinde yaygın olarak bulunmakta ve hemen hemen her çeşit yem, yem hammaddesi ve besinlerde, çevre koşulları (sıcaklık, rutubet ve oksijen miktarı) uygun olduğu takdirde üreyerek mikotoksinleri sentezlemektedirler (Aldemir 1992). Örneğin *Aspergillus* cinsindeki küflerin çoğalıp aflatoksinleri üretebilmeleri için gerekli olan optimum koşullar arasında, depolanan yem maddesinin nem oranının %12-14 (Reddy 1992), depolama ortamının nispi nem oranının (RH) %80-85, depolama sıcaklığının 24-25°C, ortamın havasının oksijen oranının %20-90 düzeyinde olması ve depolanan yemin dane bütünlüğünün bozulması oldukça önemlidir (Ellis ve ark 1991, Aldemir 1992). Yem ham maddelerinden özellikle mısır, pamuk tohumu, ayçiçeği küspesi, soya fasulyesi ve balık unu ile et-kemik unu gibi yem hammaddeleri ve bunları içeren karma yemler daha çabuk küflenerek mikotoksinlerle kontamine olmaktadır (Şanlı 1995).

Gıdalar, yem ham maddeleri ve yemlerin bozulmalarına sebep olan küfler, yem kalitesini düşürmeleri yanında oluşturdukları mikotoksinlerle de hem insan sağlığını tehdit etmekte ve hem de hayvancılık sektöründe verimi ve karlılığı olumsuz yönde etkilemektedirler. Mikotoksikozisler, küflerle ve dolayısıyla da mikotoksinlerle kontamine olan gıda ve yemlerin tüketilmesi sonucunda ortaya çıkan toksikasyonlardır (Wogan 1977, Hamilton 1982, Adams 1983). Mikotoksinlerin bir çoğu kümülatif etkilidirler ve çoğunlukla da kronik toksikasyonlara yol açarlar (Giambrone ve ark 1985a, Dafalla ve ark 1987, Ellis ve ark 1991). Evcil hayvanlarda gelişen mikotoksikozisler çoğunlukla sporadik olarak ortaya çıkar. Ancak; mevsime ve bölgeye bağlı olarak pek çok yem hammaddesi ve karma yem çeşidinin yaygın bir şekilde küflenmesi sonucu, özellikle kanatlılar gibi duyarlı türlerde epidemik mikotoksikozisler de görülebilmektedir (Robb 1993).

Farklı hayvan türlerinde gözlenen mikotoksikozisler üzerinde yapılan çalışmalarda (Hamilton 1982), bunların büyük çoğunluğunun *Aspergillus* cinsi küflerin toksinleri olan

aflatoksinlerden kaynaklandığı saptanmıştır. Çünkü bu toksinleri üreten *Aspergillus* cinsi küfler, karma yemlerin en önemli bileşeni olan tahıllarda daha çabuk üremektedirler. Bu yüzden, gerek hayvan ve gerekse de insan sağlığı açısından *Aspergillus* cinsi küfler daha fazla önem kazanmıştır.

## 2.2. Aflatoksinler

Aflatoksinler (AF), ilk olarak 1960 yılında İngiltere’de 100.000 hindinin ölümüne yol açan ve o dönemde etkeni belirlenemediği için “Hindi-X Hastalığı” (Turkey-X Disease) olarak isimlendirilen bir toksikozis olayı ile gündeme gelmişlerdir. Bu olaydan kısa bir süre sonra benzeri ölümlere ördek palazları, sülünler, piliçler, sığır, koyun ve domuzlarda da rastlanmıştır. Toksikasyona neden olan etken olarak, hayvanların yemlerinde yaygın olarak kullanılan Brezilya yer fıstığından şüphe edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda yemlerde toksik bir madde izole edilmiş ve bunun kaynağının da *Aspergillus flavus* küfü olduğu ortaya çıkarılmıştır. *Aspergillus flavus*’tan kaynaklanan bu toksik maddeye 1962’de “Aflatoksin” adı verilmiştir (Hsieh ve ark 1977, İstanbulluoğlu ve Arda 1979, Leeson ve ark 1995).

Aflatoksinler, esas olarak *Aspergillus* cinsi içinde yer alan ve özellikle *A. flavus* ve *A. parasiticus* cinsi mantarlar tarafından sentezlenen güçlü hepatotoksik özelliğe sahip olan metabolitlerdir. Bu mantarlardan başka bazı *Penicillium* ve *Rhizopus* türleri tarafından da sentezlenmektedir. “Aflatoksin” kelimesi, *Aspergillus flavus*’un “A-”, “-fla” ve “toksin” hecelerinin birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Onsekiz ayrı aflatoksin türü bulunmasına karşın, yemlerde ve yem hammaddelerinde en sık rastlanan ve en fazla oranda bulunanlar aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>’dir (Ellis ve ark 1991, Demet ve ark 1995, Leeson ve ark 1995).

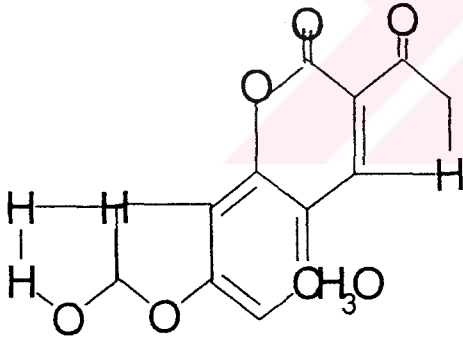
Bu 4 ana aflatoksin türü dışında, aflatoksinli yemlerle beslenen hayvanların sütlerinde tespit edilen ve “süt toksini-milk toxin” olarak da isimlendirilen M<sub>1</sub> ve M<sub>2</sub> türleri de bulunmaktadır (Şanlı 1995). Bu türevlere ek olarak, *A. flavus*’un kültür ortamlarından, aflatoksin G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>’nin hidroksil türevleri olan aflatoksin GM<sub>1</sub> ve GM<sub>2</sub> ile dihidroksil-aflatoksin GM<sub>1a</sub> ve GM<sub>2a</sub> metabolitleri de izole edilmiştir. Benzer şekilde, aynı mantarın kültür ortamında aflatoksin B<sub>2</sub> ve G<sub>2</sub>’nin hidroksil türevleri olan ve nispeten daha az toksik olan aflatoksin B<sub>2a</sub> ve G<sub>2a</sub> alt tiplerinin de bulunduğu bildirilmektedir (Hatch 1988). Gerek doğal kültür ortamlarında ve gerekse de biyotransformasyon sonucu şekillenen B<sub>3</sub> analogu yanında, aflatoksin B<sub>1</sub>’in (AFB<sub>1</sub>) metabolik parçalanma ürünü olan aflatoksikol (R<sub>0</sub>) gibi

türevleri de bilinmektedir. Ayrıca AFB<sub>1</sub>'in farklı hayvan türlerinde P<sub>1</sub> ve Q<sub>1</sub> metabolitlerinin de şekillendiği bildirilmiştir (Hatch 1988, Oğuz 1997).

### 2.2.1 Aflatoksinlerin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Bir aflatoksin molekülü, biri reaktif özellikteki bifuran halka sistemi ile diğeri de bir kumarin türevi olan pentanon (B serisi) veya lakton (G serisi) halkası olmak üzere iki halkadan ibarettir (Şekil 1). Furan halkasındaki 8. ve 9. karbon atomları arasındaki çift bağ ile lakton halkası, toksik etkilerinin ortaya çıkışından sorumlu olan esas yapılarıdır ( Hatch 1988, Leeson ve ark 1995, Oğuz 1997). Suda hiç çözünmeyen bu bileşikler kloroform, benzen ve aseton gibi organik çözücülerde kolayca çözünürler ve bu formda yapılarını uzun süre korurlar. Metil sellüloz ve propilende de kolaylıkla çözünmekle birlikte, bu çözücülerle hazırlanan çözeltilerinde kısa sürede bozulurlar (Hatch 1988). Benzoil peroksit, osmium tetroksit, fenolik asitler ile amonyum sülfat, sodyum hipoklorid, potasyum permanganat ve sodyum borat gibi antioksidanlarla temas etmeleri halinde etkinliklerini kaybederler (Hatch 1988, Samarajeewa ve ark 1990).

Şekil 2.1. Aflatoksin molekülünün kimyasal yapısı.



AF yüksek ısılarla oldukça dayanıklıdır. AFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> için erime noktaları sırasıyla 269, 280, 245 ve 239°C' dir. İnce tabaka kromatografisinde ultraviyole ışığı (UV) altında B serisinde bulunan AF'ler mavi, G serisindekiler ise yeşil floresans vermekteler (Ellis ve ark 1991).

### 2.2.2 Aflatoksinlerin Sindirim Kanalından Emilimleri ve Metabolizmaları

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

AF, büyük oranda yumuşak dokular ve yağ dokularında birikirler. Ancak asıl birikim yerleri bu toksinlerin biyotransformasyonunun gerçekleştiği karaciğer ve böbreklerdir (Leeson ve ark 1995). Nitekim, doğada en bol bulunan ve en fazla kontaminasyona yol açan AF olduğundan, toksikoknetiği ve metabolizması üzerinde en yoğun biçimde çalışılmış olan AFB<sub>1</sub>'in gastro-intestinal kanaldan emilerek, düşük moleküler ağırlıklı kan plazması proteinlerine bağlanmak suretiyle portal dolaşıma geçtiği ve bu yolla hepatositlere taşındığı ortaya konmuştur (Busbee ve ark 1990). Her ne kadar atılım hızları yüksek olan toksinler iseler de AF'in kümülatif etkileri olduğundan, az miktarlarda uzun sürelerle alındıklarında kronik zehirlenmelere de neden olmaktadır. Diğer bir ifade ile AF'in kendileri değil etkileri kümülatif özelliindedir.

AFB<sub>1</sub>'in biyotransformasyonu, Faz-I ve Faz-II reaksiyonları olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Faz-I reaksiyonları hidroksilasyon, O-demetilasyon, epoksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarını içerir. Bunlardan hidroksilasyon, O-demetilasyon ve epoksidasyondan sorumlu olan enzim, agranüler endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P-450 iken; redüksiyon olaylarından sitosolik redüktazlar sorumludurlar (Leeson ve ark 1995).

Faz-I reaksiyonları ile AFB<sub>1</sub>'den, AFM<sub>1</sub>, AFQ<sub>1</sub>, AFP<sub>1</sub> ve aflatoksikol (R<sub>0</sub>) gibi suda çözünen metabolitler oluşurlar. Bunlardan AFM<sub>1</sub> ve AFQ<sub>1</sub> hidroksilasyon sonucu, AFP<sub>1</sub> ise O-demetilasyon reaksiyonları ile meydana gelirken; R<sub>0</sub> olarak da bilinen aflatoksikol ise redüksiyon reaksiyonu ile şekillenir. R<sub>0</sub>, mikrozomal dehidrojenazlar tarafından tekrar AFB<sub>1</sub>'e dönüştürülebildiği gibi AFM<sub>1</sub> ve AFH<sub>1</sub>'e de metabolize edilebilir. Epoksidasyon reaksiyonu ile de 8,9-epoksid türevi oluşur ki, bu türevler DNA'nın nükleofilik bölgelerine büyük affinite gösteren ve AFB<sub>1</sub>'in karsinojenik etkisinden sorumlu olan türevleridir (Leeson ve ark 1995).

AF'in biyotransformasyonlarında rol alan Faz-II reaksiyonlarında ise, Faz-I reaksiyonlarında şekillenen metabolitlerden vücuttan atılımı kolay olan maddeler sentezlenir. Bu reaksiyonlarla Faz-I reaksiyonlarında şekillenen metabolitler, glukuronik ve amino asitler yanında sülfat, metil veya asetil grupları ya da glutathion ile konjuge edilirler (Ellis ve ark 1991).

AFB<sub>1</sub>'in metabolizma ürünlerinin çoğu safra ile atılır. Alınan AFB<sub>1</sub>'in %85-90'ı ilk 24 saatte dışkıya geçerken, %15-20'lik kısmı idrarla atılır. Özgün bileşikler ve metabolitlerin tamamen atılabilmeleri için yaklaşık bir haftalık sürenin geçmesi gerekmektedir (Dafalla ve

ark 1987, Oğuz ve ark 2000a). Ayrıca çeşitli hayvansal dokular (Stubblefield ve ark 1983) ile süt (Harvey ve ark 1991) ve yumurta (Hamilton 1982) gibi hayvansal ürünlere insan sağlığını tehdit edebilecek ve özellikle de tavukçulukta kuluçka randımanında düşüşe neden olan ve kontamine yumurtalardan çıkan civcivlerin immün sistemlerinin gelişimini baskılayacak düzeylerde AFB<sub>1</sub> ve metabolitleri geçebilmektedir (Tablo 2.1). Sığırlarda yem ile alınan AFB<sub>1</sub>'in yaklaşık olarak %0.18'i, koyunlarda ise %0.1'i süte geçmektedir (Kaya 1982). Kaya (1982), 106 süt ineği yemi örneği ve 38 çiğ süt örneği üzerinde yaptığı bir çalışmada, yemlerin %19.6'sında ölçülebilir düzeylerde aflatoksin, sütlerin ise %5.7'sinde aflatoksin metaboliti olan AFM<sub>1</sub> tespit ettiğini bildirmektedir. Daha detaylı bir çalışmada (Stubblefield ve ark 1983) Holstein ırkı sığırlara 3 gün süreyle 0.35 mg AFB<sub>1</sub>/kg canlı ağırlık dozunda AFB<sub>1</sub> alacakları miktarda yem verilmiş ve son yedirmeden 24 saat sonra alınan beyin, kalp, bağırsak, böbrek, karaciğer, akciğer, dalak, meme dokusu, iskelet kası dokusu, meme lenf yumrusu, dil dokusu örnekleri ile süt, safra salgısı, kan, dışkı ve rumen içeriğinde değişik düzeylerde hem AFB<sub>1</sub> ve hem de AFM<sub>1</sub> düzeyleri belirlenmiştir. Bu çalışmada (Stubblefield ve ark 1983) en yüksek AFB<sub>1</sub> ve AFM<sub>1</sub> düzeyleri böbrek, meme ve karaciğer dokularında; sırasıyla 57.9, 25.1 ve 13.2 ng/g doku olarak bulunmuştur. Süt inekleri üzerinde yapılan bir başka yedirme çalışmasında (Harvey ve ark 1991) ise, 7 gün süre ile 100 ve 200 µg/kg (ppb) düzeyinde aflatoksin içeren yemle beslenen sığırların sütlerinde sırasıyla 0.91 µg/L ve 1.85 µg/L düzeyinde AFM<sub>1</sub> tespit edilmiştir. Chattopadhyay ve ark (1985), 2.5 mg/kg (ppm) düzeyinde AFB<sub>1</sub> içeren yemle 2 hafta süreyle besledikleri Broiler civcivlerin kan serumlarındaki AFB<sub>1</sub> seviyesini 9.89 ng/ml olarak saptamışlardır. Yumurta tavuklarında yem ile alınan AFB<sub>1</sub> ve metabolitlerinin yumurtaya geçiş oranının belirlenmesi amacıyla oldukça fazla sayıda çalışma yapılmıştır. Aldemir (1992), günde 500 µg AFB<sub>1</sub> alan tavukların karaciğer ve böbrekleri ile kırmızı ve beyaz kaslarında yedirme sonrası 4. güne kadar ölçülebilir düzeyde (>0.01 ppb) AFB<sub>1</sub> tespit etmiştir. Jacobson ve Wiseman (1974) ise 100 ve 400 µg/kg (ppb) düzeyinde AFB<sub>1</sub> içeren yemle besledikleri tavukların yumurtalarında 0.2-0.3 µg/kg (ppb) düzeyinde AFB<sub>1</sub> tespit etmişlerdir. Söz konusu çalışmada (Jacobson ve Wiseman 1974), 100 µg/kg (ppb) AFB<sub>1</sub> içeren yemle beslenen tavukların yumurtalarında yedirmenin 10. gününde dahi 9 ng/yumurta düzeyinde AFB<sub>1</sub>'e rastlanmıştır. Yumurtacı tavuklar üzerinde yapılan bir başka çalışmada (Trucksess ve ark 1983) ise, 7 gün süre ile 8000 µg/kg (ppb) düzeyinde AFB<sub>1</sub> içeren yemle beslenen hayvanların gerek yumurtalarında gerekse de tüketime sunulan yenilebilir dokularında hem AFB<sub>1</sub> ve hem de aflatoksikol (R<sub>0</sub>) miktarları belirlenmiştir. Sonuçlar, en yüksek AFB<sub>1</sub> ve R<sub>0</sub> düzeylerinin karaciğer ve yumurtada bulunduğunu göstermektedir. Yumurtadaki en yüksek düzey olan 0.2 ng



AFB<sub>1</sub>/yumurta düzeyine toksin içeren yem tüketiminin 4-5. günlerinde rastlanmıştır. Sudhakar (1992), 600 µg/kg (ppb) düzeyinde AFB<sub>1</sub> içeren yemle beslenen tavukların yumurtalarında 5 ng/gr yumurta miktarında AFB<sub>1</sub> tespit ettiğini bildirirken; Oliveira ve ark (2000), 500 µg/kg (ppb) AFB<sub>1</sub> içeren yemle beslenen tavukların yumurtalarının 6 ng/yumurta düzeyinde AFB<sub>1</sub> içerdiğini ileri sürmektedirler. Qureshi ve ark (1998) ise, 14 gün boyunca 10 µg/kg (ppb) AFB<sub>1</sub> içeren yemle besledikleri Broiler anaçların yumurtalarında 7. gün sonunda 0.15-0.48 ng/yumurta düzeyinde AFB<sub>1</sub>, 0.22-0.51 ng/yumurta düzeyinde R<sub>0</sub> belirlemişlerdir. Yukarıdaki çalışma sonuçları dikkate alınarak yapılacak olan bir hesaplama, yemle alınan aflatoksin'in yumurtaya geçiş oranınının 1/2000 ile 1/2500 arasında olduğunu ortaya koymaktadır (Hamilton 1982, Çelik ve ark 2000a).

**Tablo 2.1:** Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan yedirme denemelerinde, değişik hayvansal dokular ve hayvansal gıdalarda tespit edilen AF düzeyleri.

Araştırmacı	Hayvan türü	Yedirme süresi	Doz veya yemdeki AF düzeyleri	Hayvansal doku ve gıdalarda tespit edilen AF rezidü düzeyleri
Jacobson ve Wiseman (1974)	Tavuk	10 gün	100 ve 400 ppb AFB <sub>1</sub>	Yumurta: 9 ng AFB <sub>1</sub> /yumurta
Stubblefield ve ark (1983)	Süt ineği	3 gün	0.35 mg AFB <sub>1</sub> /kg canlı ağırlık	Böbrek: 57.9 ng AF /g Meme: 25.1 n g AF /g Karaciğer: 13.2 ng AF /g
Trucksess ve ark (1983)	Tavuk	7 gün	8000 ppb AFB <sub>1</sub>	Yumurta: 0.2 ng AFB <sub>1</sub> /yumurta
Chottapadhyay ve ark (1985)	Tavuk	2 hafta	2,5 mg AFB <sub>1</sub> /kg	Kan Serumu: 9,89 ng AFB <sub>1</sub> /ml
Harvey ve ark (1991)	Süt ineği	7 gün	100 ve 200 ppb AF	Süt: 0.91 ve 1.85 µg AFM <sub>1</sub> /L
Aldemir (1992)	Tavuk	4 gün	500 µg/gün AFB <sub>1</sub>	Karaciğer, böbrek, kas: >0.01 ppb AFB <sub>1</sub>
Sudhakar (1992)	Tavuk	3 hafta	600 ppb AFB <sub>1</sub>	Yumurta: 5 ng AFB <sub>1</sub> /g yumurta
Qureshi ve ark (1998)	Tavuk	7 gün	10 ppb AFB <sub>1</sub>	Yumurta: 0,15-0,48 ng AFB <sub>1</sub> /yumurta
Oliveira ve ark (2000)	Tavuk	8 hafta	500 ppb AFB <sub>1</sub>	Yumurta: 6 ng AFB <sub>1</sub> /g yumurta

Ülkemizde yumurtacı tavuklar için karma yemlerde bulunmasına izin verilen total aflatoksin düzeyinin 50 µg/kg yem (ppb) ve AFB<sub>1</sub> düzeyinin de 20 µg/kg yem (ppb) olduğu dikkate alınarak; bu düzeylerde AF ile kontamine olan yemden günde 130 gr tüketerek gün aşırı yumurtladığı varsayılan bir tavuğun yumurtasında, yumurtaya geçiş oranı 1/2000 olarak kabul edilmek suretiyle yapılan hesaplama sonuçları, yumurtada bulunması muhtemel olan AFB<sub>1</sub> düzeyinin 2,6 ng/yumurta (Hamilton 1982, Çelik 2000a), toplam AF düzeyinin de 6.5 ng/yumurta olduğunu göstermektedir. Broiler yemlerinde yapılan tarama sonuçları (Kaya ve ark 1990, Nizamlioğlu 1996, Oğuz ve Kurtoğlu 2000), AF düzeyinin 5 ile 100 µg/kg (ppb) yem arasında değiştiğini, çoğunlukla da 50µg/kg (ppb) yemin altında olduğunu göstermektedir.

### 2.2.3 Aflatoxinlerin Toksikasyon Mekanizmaları

Aflatoxinlerin tamamı, insan ve hayvan türlerinin hemen hemen tamamında geniş spektrumlu biyolojik etkiye sahiptirler. En şiddetli toksik özelliğe sahip olan AFB<sub>1</sub>, karaciğerde sitokrom P-450'ye bağımlı (keçilerde P-448) karma işlevli oksidaz (mixed function oxidase, MFO) enzim sistemiyle okside edilerek; daha güçlü sitotoksik, mutajenik ve karsinojenik etkileri olan epoksit türevlerine (AFB<sub>1</sub>-8,9-epoksit) dönüştürülür (Kaya 1998, Leeson ve ark 1995). Bu maddelerin çok yönlü toksik etkileri, hücredeki nükleo proteinler ile nükleik asitler gibi makro moleküllerle kolayca ve hızla tepkimeye girerek protein sentezini bloke etmelerinden ve hücre bütünlüğünün bozulmasına yol açmalarından kaynaklanmaktadır (Hsieh ve ark 1977, Neldon-Ortiz ve Qureshi 1992a). Çelik ve ark (2000a), döller tavuk yumurtalarına verdikleri AFB<sub>1</sub>'in, embriyonik gelişimin ilk günlerinde yüksek oranda embriyonik ölümlere neden olduğunu tespit etmişlerdir. Bu dönemde, özellikle de embriyonik dönemin ilk 5 gününde karaciğer henüz fonksiyonel olmadığından, araştırmacılar (Çelik ve ark 2000a), AFB<sub>1</sub> molekülünün metabolize edilmeden de güçlü embriyotoksik etki gösterdiğini ileri sürmüşlerdir.

AFB<sub>1</sub>'in sitotoksik etkisinin, yapısında bulunan bifuran halkasından ileri geldiği ve bu halkanın, DNA'nın N<sup>7</sup>-guanin bölgesine bağlanmak suretiyle, bu molekülün normal biyokimyasal işlevlerini değiştirdiği, RNA sentezini ve sonuç olarak da protein sentezini baskıladığı bildirilmektedir (Huff ve ark 1988, Samarajeeva ve ark 1990 ).

Nitekim, daha önce yapılan çalışmalarda (Huff ve ark 1986, Kubena ve ark 1993, Keçeci ve ark 1998) yemlerine AFB<sub>1</sub> ilave edilen kanatlıların kan serumunda hepatositlerdeki

yıkılmaya işaret eden aspartat aminotransferaz (AST), alanin amino transferaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP), asit fosfataz (ACP), gama-glutamil transferaz (GGT), izositrik dehidrogenaz (ICD), laktat dehidrogenaz (LDH) gibi karaciğer fonksiyon enzim düzeyleri ile bilirubin düzeyleri yükselirken; hepatositlerce sentezlenen ya da bunların metabolitleri olan serum total protein, lipit, kolesterol, albümin, amino asit, üre ve vit. A ile koagülasyon faktörlerinin seviyelerinin düştüğü, aynı zamanda serum proteinlerinin demir bağlama kapasitelerinin de azaldığı saptanmıştır. AFB<sub>1</sub>, hepatotoksik etkisinin yanında nefrotoksik etki de göstermekte ve Ca-P metabolizmasını da bozmaktadır (Glahn ve ark 1990 ve 1991, Bilgiç ve Yeşildere 1992). Ca ve P metabolizması üzerindeki zararlı etkilerini, kan paratiroid hormonu düzeyini düşürmesi ve böbrek dokusunun bu hormona olan duyarlılığını azaltarak; karaciğerde 25-hidroksil vitamin D, böbrekte ise 1,25-dihidroksil vitamin D'nin sentezini engelleyerek göstermektedir. Tüm bu olaylara bağlı olarak; aflatoksinlerle kontamine olan yemlerle beslenen hayvanlarda kolekalsiferol metabolizmasının bozulduğu, kan Ca ve P düzeylerinin düştüğü ve özellikle de Broiler civcivlerde kemiklerin kolayca kırılabilir bir duruma geldiği, yumurtacı tavuklarda ise yumurta kabuğu kalitesinin bozulduğu bildirilmektedir (Hamilton 1982, Glahn ve ark 1990, 1991).

#### **2.2.4. Aflatoksinlerin Etkileri**

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

- 2.2.4.1. Akut ve kronik toksik etkileri,
- 2.2.4.2. Teratojenik ve embriyotoksik etkileri,
- 2.2.4.3. Mutajenik etkileri,
- 2.2.4.4. Karsinojenik etkileri,
- 2.2.4.5. İmmunosüpresif etkileridir.

##### **2.2.4.1. Akut ve Kronik Toksik Etkileri**

AF, hem halk sağlığı ve hem de hayvan sağlığı açısından oldukça önemli sorunlara yol açmaktadırlar. AF'e duyarlılıkları bakımından hayvan türleri arasında belirgin farklar vardır. En fazla duyarlı türler arasında ördek, tavşan, hindi, alabalık, kedi, ve köpekler başta gelirken; orta derecede duyarlı türler at, sığır, koyun, keçi, kobay, rat, bildircin, New Hampshire ve Legorn ırkı tavuklardır (Hatch 1988). Fare ve maymunlar ise nispeten daha dirençlidirler (Çetin 1990).

Evcil hayvan türlerinden AF'e en duyarlı olanı ördek palazlarıdır (Tablo 2.2). Çünkü bu türün karaciğer hücrelerindeki mikrozomal MFO enzim düzeyleri, diğer türlere nazaran oldukça yüksektir (Reddy 1992). Bu türün dışında piliç ve hindi (Hatch 1988 ), bıldırcın (Dashek ve ark 1983), tavşan (Krisha ve ark 1991), alabalık (Bilgiç ve Türkmen 1993), sığır (Van Halderen ve ark 1989), koyun (Suliman ve ark 1987), keçi (Miller ve ark 1984 ) gibi ekonomik önemi olan çiftlik hayvanları da duyarlı türler arasındadır. Tablo 2. 2'de bazı hayvan türleri için AFB<sub>1</sub>'in hayvanların %50'sini öldüren dozları (LD<sub>50</sub> ) verilmiştir (Hatch 1988).

**Tablo 2.2:** Bazı hayvan türleri için AFB<sub>1</sub>'in LD<sub>50</sub> değerleri (Hatch 1988).

Hayvan Türü	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	Hayvan Türü	LD <sub>50</sub> (mg/kg)
Ördek palazı (1 günlük)	0,3-0,6	Sığır (buzağı)	0,5-2
Gökkuşuğu Alabalığı, 100 g	0,5-1	Koyun	2
Tavşan	0,3-0,5	Keçi	2
Köpek	0,5-1	Maymun	2,2-7,8
Tavuk (New Hampshire) ergin	2	Rat (yeni sütten kesilmiş)	5,5
Tavuk (Legorn) 16 haftalık	6,5-16,5	Fare (ergin)	9

Gerek insan ve gerekse de evcil hayvanlarda akut zehirlenmeler kronik olanlardan daha seyrek ve genellikle sporadik olarak ortaya çıkarlar. Ancak kronik zehirlenmelerle pratikte daha çok karşılaşmaktadır. Bu durum, kronik aflatoksikozisin hayvan yetiştiriciliği ve insan sağlığı açısından önemini daha da arttırmaktadır (Hamilton 1982 ). Çünkü bu tür zehirlenmeler kolayca fark edilmediğinden, ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır.

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

düzensizlik, anemi, depresyon, hafif derecede sarılık ve sürüde ölüm oranlarının artması gibi klinik belirtiler görülür (Huff ve ark 1986, Sahoo ve ark 1993, Fernandez ve ark 1994).

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

Akut ve kronik aflatoksikozis olgularında en belirgin patolojik bozuklukların karaciğerde şekillendiği kaydedilmektedir (Rao ve Gehring 1971, Slowik ve ark 1985, Ortatatlı ve Oğuz 2001). Kanatlılardaki aflatoksikozislerde, karaciğerin renginin soluklaşım büyümesi sonucu kenarlarının kütleşmesi (Krishna ve ark 1991, Oğuz 1997) safra kesesinin dolgun olması ( Krishna ve ark 1991, Tuzcu 1999 ), böbreklerin büyümüş ve ödemli olmaları (Bilgiç 1991, Bilgiç ve Yeşildere 1992, Tuzcu 1999), dalağın büyümesi (Sahoo ve ark 1993, Oğuz 1997) yanında bağırsakların koyu bir içerikle dolu olması (Tuzcu 1999) dikkati çeken otopsi bulgularıdır. Aflatoksikozisin erken dönemlerinde karaciğerde ortaya çıkan renk değişikliği, toksikasyonun ileri safhalarında kaybolmaktadır (Bilgiç 1991, Tuzcu 1999).

Önemli histopatolojik bulgular arasında ise hepatositlerin hidropik dejenerasyonu (Dashek ve ark 1983) ve yağlanmaları (Shank ve ark 1971, Dashek ve ark 1983), safra kanalı epitel hücrelerinin proliferasyonu (Dashek ve ark 1983, Yakışık 1992, Ortatatlı ve Oğuz 2001); böbrek tubulus epitellerinin dejenerasyonu ve nekrozuyla birlikte glomerulusların büyümesi (Tuzcu 1999); dalağın kırmızı pulpasının nispi olarak genişlemesi (Sahoo ve ark 1993), lenf folikülleri (Dafalla ve ark 1987) ve periarteriyoler lenfoid kılıftaki (PALS) lenfositlerde azalma (Tuzcu 1999, Sur 2001); beyin ödemi (Shank ve ark 1971) ve nöron dejenerasyonudur (Tuzcu 1999). Yukarıdaki bulgulara ek olarak, tavuklarda b. Fabricii'deki lenf foliküllerindeki lenfositlerle, timusun medullar timositlerinde azalma (Okoye ve ark 1988, Sur 2001) dikkati çekmektedir. Timus ve b. Fabricii'nin histolojik yapısında ortaya çıkan söz konusu değişiklikler, bu organların atrofisine yol açtıklarından (Oğuz 1997, Ortatatlı ve Oğuz 2001), aflatoksinin kanatlılarda neden olduğu immünoşüpresyonun açıklanmasında önemli histolojik ipuçları sağlamaktadırlar (Kubena ve ark 1990, Sur 2001).

Broiler yetiştiriciliğinde, hayvanların kısa bir süre içerisinde tüketim ağırlığına ulaşması amaçlandığından; besleme dönemi esnasında ortaya çıkabilecek olan her türlü

olumsuz faktör, gelişmeyi engellemekte ve sonuç olarak verimi ve kârlılığını önemli oranda düşürmektedir. Broiler sektöründe besleme süresinin kısa, yem tüketimi hızının da yüksek olması nedeniyle yemde düşük düzeyde AF bulunsa bile hayvanların yüksek miktarda AF almaları sonucunu doğurmaktadır. AF, hem direkt toksikasyona sebep olmaları ve hem de immün sistemi baskılayarak dolaylı yoldan sürünün hastalıklara karşı duyarlılığını arttırmaları nedeniyle de önemli sorunlara yol açmaktadırlar. Aflatoksikozisli broilerlerde dikkati çeken ilk belirtiler, yem tüketimi ile canlı ağırlık kazancının ve yemden yararlanma oranının düşmesidir (Diener ve Davis 1985, Oğuz ve Kurtoğlu 2000). Hepatoksik etkisinin bir sonucu olarak; bir yandan karaciğer yağlanması gelişirken, diğer yandan da protein sentezi önemli ölçüde aksamaktadır. Pıhtılaşma proteinleri sentezinin azalması ve kapillar damarlarda oluşan çatlama sonucunda hayvanlarda peteşiyel kanamalar ve anemi şekillenir. Karkas kalitesi bozulur, karkasta oluşan kanamalar nedeniyle çürüme ve esmerleşme gözlenir. Bu durumun kesimden 2 hafta öncesinde AF'li yem tüketen piliçlerde bile görülebildiği bildirilmektedir (Huff ve ark 1986, Demet ve Oğuz 1995, Şanlı 1995). Toksinin yem içindeki dağılımı, yemdeki diğer mikotoksinler, yemin bileşimi, kümesteki sağlık problemleri, aşılama, stres faktörleri ve toksine maruz kalma süresi, hayvanların AF'e duyarlılığını etkilemektedir.

Yukarıdaki bulgulara ilaveten AF'lerin genotoksik etkilerinin olduğu da gösterilmiştir. Nitekim, yem ile alınan AFB<sub>1</sub>'in horoz spermatozoonlarının dölleme yeteneklerini azalttığı bildirilmiştir (Hamilton 1982, Ortatlı ve ark 2002).

#### **2.2.4.2. Aflatoksinlerin Teratojenik ve Embriyotoksik Etkileri**

Gerek memeli hayvanlar ve gerekse de kanatlılarda yapılan deneysel çalışmaların (Ellis ve Dipaolo 1967, Mayura ve ark 1998, Çelik ve ark 2000a, Sur ve Çelik 2003) sonuçları, AF'nin ve özellikle de AFB<sub>1</sub>'in oldukça güçlü embriyotoksik etkilerinin olduğunu ortaya koymaktadır. Ellis ve Dipaolo (1967), hamsterlere gebeliğin 8. gününde, intraperitoneal yolla 4 mg/kg dozunda AFB<sub>1</sub> vererek 17. günde fötüsler üzerinde yaptıkları incelemede; fötüslerin %52.9'unun normal, %29.4'ünün yapısal kusurlu, %17.6'sının ölü veya rezorbe durumda olduğunu tespit etmişlerdir. En sık rastlanan anomalilerin; anensefali, ektopiya kordis, genel gelişme geriliği, mikrosefali ve umbilikal herni gibi malformasyonlar olduğu bildirilmiştir (Ellis ve Dipaolo 1967). Rat embriyo kültür ortamına ilave edilen AFB<sub>1</sub> ise, embriyonik hücrelerin protein ve DNA sentezlemelerini önemli oranda inhibe etmekte ve özellikle tubulus nöraliste önemli malformasyonlara neden olmaktadır (Geissler ve Faustman 1988).

Kanatlılarda, memelilerdeki gibi bir ftal-maternal ilişki bulunmamakla birlikte, yemler ile alınan AF'in belirli miktarları yumurtaya geçtiğinden, yumurtadaki AF kanatlıların embriyonik geliŐmelerinde ciddi problemlere yol açmaktadırlar. Yumurtaya geçen AFB<sub>1</sub>, özellikle kuluçkanın erken dönemlerinde yüksek oranlarda embriyonik ölümlere ya da embriyonik gelişme geriliğine yol açmaktadır (Cilieveci ve ark 1980, elik ve ark 2000a, Sur 2001). elik ve ark (2000a) inkübasyonun başlangıcında yumurtaya verdikleri 10 ng ve 100 ng/yumurta dozundaki saf AFB<sub>1</sub>'in sırasıyla %74.5 ve %98 oranında erken embriyonik ölümlere yol açtığını bildirmişlerdir. Sur (2001) ise, yine inkübasyon başlangıcında; 5 ng, 10 ng, 20 ng ve 40 ng/yumurta düzeyinde AFB<sub>1</sub> enjekte ettiği dll tavuk yumurtalarının embriyonik mortalitelerini sırasıyla % 41.66, % 43.47, % 80.43, % 91.22 olarak tespit etmiştir. Sur ve elik (2003), 20 ng ve 40 ng AFB<sub>1</sub> enjekte ettikleri gruplardaki yumurtalarda embriyonik disk sahasının *area opaca* bölgesindeki hücrelerin aşırı çoğalarak, yüzük biçiminde ve periferde doğru yayılan kalın bir hücre katmanı oluŐturduĐunu ve *area pellucida*'nın orta bölümünün dışa doğru fitiklaŐtıĐını tespit etmişlerdir. Cilieveci ve ark (1980), inkübasyonun 96. saatinde 0.01 ve 0.002 ppm olmak üzere iki farklı düzeyde AFB<sub>1</sub> verdikleri yumurta gruplarının embriyonik mortalitelerini sırası ile %35 ve %26 olarak bildirmişlerdir. Jelinek ve ark (1985) ise 3-30 ng/yumurta dozunda aflatoksin verilen grubun embriyonik mortalitesinin %33, kalp anomalisi oranının %12 ve vücut anomalisi oranının ise % 4 olduğunu kaydetmişlerdir.

#### 2.2.4.3. Aflatoksinlerin Mutajenik Etkileri

AFB<sub>1</sub>'in mutajenik etkilerinin, bu maddenin epoksit türevlerinin hücrede yeni DNA zincirlerinin sentezi sırasında sentezlenmekte olan DNA zincirlerine bağlanmak suretiyle, DNA polimeraz enziminin aktivitesini inhibe etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Dietert ve ark 1985, Ellis ve ark 1991). DNA'nın taŐıdıĐı Őifre bozukluğundan, hem DNA ve hem de RNA'da mutasyonların ŐekillenebileceĐi ileri sürülmektedir (Haworth ve ark 1989, Iwaki ve ark 1990, Gradelet ve ark 1998).

Sonuç olarak; AFB<sub>1</sub>'in DNA'da yol açtığı hasarlar, genetik bozukluklarla sonuçlanabilmektedir. Nitekim, Albertini ve ark (1988), *in vitro* ortamda AFB<sub>1</sub>'in mitoz mekiğinin Őekillenmesini, tubulinlerin organizasyonunu inhibe etmek suretiyle bozarak domuz nöronlarının bölünmeleri sırasında anploidiye neden olduğunu göstermişlerdir.

#### 2.2.4.4. Aflatoksinlerin Karsinojenik Etkileri

AF'ler özellikle karaciğer ve böbrek kanserlerine neden oldukları bilinen en güçlü doğal karsinojenlerdir. Nitekim Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) aflatoksinleri 1B grubu karsinojenler içinde değerlendirmektedir (IARC 1993). Aflatoksinlerin primer ajan olarak insanlarda kansere yol açtıkları henüz gösterilememiştir. Bununla birlikte; epidemiyolojik çalışma sonuçları, aflatoksinle kontamine besinlerin fazla miktarda tüketildiği Afrika, Güneydoğu Asya Ülkeleri ve Hindistan'da yaşayanlarda hepatokarsinoma insidansının oldukça yüksek olduğunu göstermektedir (Hsieh ve ark 1977, Aksoy 1984).

AF'in karsinojenitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan deneysel çalışmalarda kullanılan deney hayvanı türleri ve verilen dozlar ile kanser gözlenme oranları Tablo 2.3'te verilmiştir.

**Tablo 2.3:** Farklı deney hayvanı türlerinde AF'in kanser oluşturan dozları ile verilme süreleri (Ellis ve ark 1991).

Hayvan Türü	Doz (µg/kg)	Aflatoksin verilme süresi	Tümör Gelişme Sıklığı (Tümör Gelişen Hayvan Sayısı/Toplam Hayvan Sayısı)	Tümör gelişme oranı (%)
Ördek	30	14 ay	8/11	%72
Alabalık	8	12 ay	27/65	%40
Maymun	100-800	24 ay	3/42	%7
Rat	100	12-22 ay	28/28	%100

#### 2.2.4.5. Aflatoksinlerin İmmünoşüpressif Etkileri

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

Aflatoksinlerin direkt immünoşüpressif etkilerinin, hücresel bağışıklık sistemi üzerinde daha belirgin olduğu kabul edilmektedir (Corrier 1991). Özellikle düşük dozlarda toksine uzun sürelerle maruz kalınması sonucu ortaya çıkan bu durumdan (Giambone ve ark 1985b,c, Corrier 1991) makrofajların fagositik ve mikrobisidal kapasitelerinde meydana



gelen önemli düşüşler sorumlu tutulmaktadır (Neldon-Ortiz ve Qureshi 1992a, Çelik ve ark 1996, Dugyala ve Sharma 1996). Ayrıca kemik iliği ( Dugyala ve ark 1994), timus (Sur 2001) ve bursa Fabricii (Campbell ve ark 1983, Ram ve ark 1988, Çelik ve ark 2000b, Sur ve Çelik 2003) gibi merkezi lenfoid organlarda meydana gelen hasarlarla bu hasarların sonucu olarak lenfosit popülasyonlarında ortaya çıkan azalma (Campbell ve ark 1983, Keçeci ve ark 1995, Sur 2001) da aflatoksinlerin immüno-supressif etkilerinin ortaya çıkışında önemli rol oynamaktadır. Total lenfosit popülasyonundaki düşüşlerin özellikle T-lenfositlerin sayılarında meydana gelen düşüşlerden kaynaklanması (Mc Loughin ve ark 1984, Çelik ve ark 2000b, Oğuz ve ark 2000a, Sur 2001), aflatoksinlerin hücresel bağışıklık sistemi üzerindeki baskılayıcı etkisinin daha belirgin olduğunu destekleyen önemli bulgulardır.

AFB<sub>1</sub>'in humoral immünite üzerindeki immüno-supressif etkilerinin mekanizması hakkında farklı görüşler ileri sürülmüştür. Komplement aktivitesi (Steward ve ark 1985) yanında immunglobulin A (Ig A), Ig G ile diğer gamaglobülin düzeylerinde (Corrier 1991) ve serum proteinlerinden plazma albümini ve globülinleri düzeylerinde meydana gelen belirgin düşüşlerin (Reddy ve ark 1987, Ghosh ve ark 1990, Oğuz ve ark 2003) nedeni olarak karaciğer hasarı gösterilmektedir. AFB<sub>1</sub>'in karaciğerde metabolize edilmesiyle oluşan toksik metabolitleri, DNA ve RNA'ya bağlanarak DNA-bağımlı RNA polimeraz enziminin aktivitesini baskılamak suretiyle RNA sentezini ve sonuçta da protein sentezini aksatmakta ve gerekli çoğalma faktörleri salgılanmadığından, lenfoid hücrelerin çoğalıp farklılaşmaları da baskılanmaktadır. Bu baskılanmada özellikle, immün sistem hücreleri arasındaki iletişimi sağlayan sitokinlerin sentezinin baskılanması da önemli rol oynamaktadır (Corrier 1991, Dugyala ve Sharma 1996).

Yemlerle alınan AF'lerin kemik dokusunun gelişimi üzerinde önemli zararlı etkilerinin olduğu ileri sürülmekle birlikte, bu konuda yapılmış olan çalışmalarda (Wyatt ve Jensen 1990, Farquharson 1999), kemik dokusunun embriyonik gelişimi üzerindeki etkileri hakkında detaylı bilgi bulunmamaktadır. Ancak AFB<sub>1</sub>'in düşük dozlarının dahi broiler civcivlerde kemiklerin dayanıklılığını azalttığı ve kırılganlıklarını arttırdığı bildirilmiştir (Huff ve ark 1980, Maurice ve ark 1983, Wyatt ve Jensen 1990, Farquharson 1999).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda (Çelik ve ark 2000a, Sur 2001) AFB<sub>1</sub>'in, sitotoksik etkileri yanında hücre diferansiyasyonu üzerinde de zararlı etkilerinin olabileceği ileri sürülmüştür. AFB<sub>1</sub>'in, hücre diferansiyasyonu üzerindeki zararlı etkisinin, embriyonik

dönemde gelişmekte olan uzun kemiklerin büyüme plakaları üzerindeki olumsuz etkileri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

### 2.3. Kemik Dokusu

Diğer destek dokuları gibi mezenkimden köken alan (Dekleer 1982, Slatter 1985) kemik dokusu; destekleme, şekillendirme, koruma, iskelet kaslarına bağlantı noktaları sağlama, Ca ve P iyonu için depo görevi yapma, kemik iliğini barındırma gibi fonksiyonlara sahiptir. Bu doku vücudun en sert dokularındandır (Olsson 1982, Slatter 1985, Erbenği ve ark 1987, Tekelioğlu 1993, Farquharson 1999, Pines 1999, Plavnik 1999). Bu özelliğini;  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonlarının,  $PO_4^{-2}$  ve  $HCO_3^{-}$  iyonlarıyla oluşturdukları tuzlarının, matriks adı da verilen hücreler arası bölgelerde hidroksilapatit kristalleri halinde özel bir biçimde tertiplenmeleriyle kazanır. Bu ara bölgedeki  $Ca^{+2}$  ve  $PO_4^{-2}$  iyonları ihtiyaç halinde mobilize olarak kana geçerler ve gerekli bölgelere taşınarak, buralarda çok önemli fizyolojik fonksiyonları yerine getirirler. Bu bakımdan kemik dokusu, bu iki iyon için depo görevi de yapmaktadır. Kemik dokusunun diğer önemli bir fonksiyonu da hemopoetik sistemin önemli bir bileşeni olan myeloid dokuyu barındırmasıdır (Kul 1996, Farquharson 1999).

Kemik dokusunda bulunan hücreler; osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır (Dekleer 1982, Slatter 1985, Erbenği ve ark 1987, Paker 1990, Cireli 1997, Sağlam ve ark 1997). Osteoprogenitör hücreler embriyonik mezenkimden köken alırlar ve osteoblastlara farklılaşarak kemiğin matriks proteinlerini salgırlar. Osteoblastlar, kemik matriksinin organik kısmının bileşimine giren kollagen, glikoprotein ve proteoglikanların yapımından sorumlu olan hücreler olup; yeni osteoid dokunun yapımı sonucu bu organik matriksle kuşatılırlar. Matriksin kalsifikasyonundan da sorumlu olan bu hücreler osteoid doku içinde hapsolup yassılaşarak, uzantılı hücreler haline dönüşürler ve kemik boşluklarına, “lacuna ossium” yerleşirler. Şekillenen bu yeni hücreler, olgun kemik dokusu hücreleri olarak bilinen osteositlerdir. Osteoklastlar ise kanın monositlerinden köken alan ve kemik matriksinin rezorpsiyonundan sorumlu olan çok çekirdekli hücrelerdir. Çoğunlukla kemiklerin yüzeyindeki sığ çukurlarda (Howship lakunaları) yerleşirler (Dekleer 1982, Slatter 1985, Erbenği ve ark 1987, Hall 1987).

Kemik dokusunun ara maddesinin histolojik özellikleri kıkırdak dokusunun ara maddesine büyük benzerlik göstermekle birlikte; ondan farklı olarak,  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  tuzlarını

da içerir. Matriks de denilen kemik dokusunun ara maddesinin temel iskeleti, şekilli unsurlar olan ve dalgalı seyreden kalın demetler halindeki Tip I kollagen iplikler tarafından oluşturulur. Bu iplikler organik matriksin yaklaşık %95'lik bölümünü oluşturur. Kalan kısmı ise yüksek oranda su tutma özelliğine sahip olan kondroitin-4 sülfat, kondroitin-6 sülfat, keratan sülfat gibi proteoglikanlar ile hyaluronik asit gibi glikozaminoglikanlar (GAG)' dan oluşmaktadır. Ara maddede ayrıca yapıştırıcı özellikteki glikoproteinlerden osteonektin, osteokalsin, osteopontin ve kemik spesifik sialoprotein de bulunmaktadır (Dekleer 1982, Poole 1984, Slatter 1985, Erben ve ark 1987, Hall 1987, Parker 1990, Tekelioğlu 1993, Cireli 1997, Sağlam ve ark 1997) . Osteoblastlar tarafından sentezlenen osteopontin ve osteokalsin, matriks organizasyonunda ve  $Ca^{+2}$  homeostazisinde merkezi rol oynamaktadırlar. Osteopontin, fosforile haldeki bir glikoprotein olup, kırıkdağın kemiğe dönüştüğü bölgelerde ve özellikle de osteoklastların kemik yüzeyine tutundukları noktalarda yoğun olarak bulunur. Osteopontin'in osteoklastlara tutunduğu ve onların kalsifiye durumdaki matriks ile bağlantılarını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Osteokalsin ise, modifiye bir aminoasit olan  $\gamma$ -glutamik asidi içeren küçük bir proteindir. Bu proteinin de osteoklast aktivitesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Osteokalsin, kemik mineral kristallerine bağlanmakta ve osteoklastları bölgeye çekerek aktive etmekte ve böylece de kemik oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (Mercer 1993).

### 2.3.1. Kemik Dokusunun Embriyonik Gelişimi

Tüm bağ ve destek dokuları gibi kemik dokusu da temel olarak mezenkim dokusundan köken almakla birlikte, iskelet sistemini oluşturan kemiklerin embriyonik kökenlerinde farklılıklar görülebilir. Örneğin; ekstremitelerde kemiklerinin tamamı buldukları bölgenin mezenkiminden geliştikleri halde, kraniyofasiyal kemiklerden frontal, parietal, temporal kemikler ve mandibulanın bir kısmı, bu kemiklerin gelişeceği bölgelere göç eden crista nöralis hücrelerinden köken alırlar (Dekleer 1982, Olsson 1982, Hall 1987).

Kraniyofasiyal kemiklerle ekstremitelerde kemiklerinin embriyonik gelişimlerdeki diğer bir fark da şekillenme aşamalarındaki farklılıktır. Pelvis ve ekstremitelerde kemikleri hiyalin kırıkdağ bir modelden gelişirken, kraniyofasiyal kemiklerde böyle bir kırıkdağ modelin şekillenmesi söz konusu değildir (Olsson 1982, Hall 1987).

### 2.3.1.1. Memelilerde Kemiğin Embriyonik Gelişimi

Hem memeli ve hem kanatlılardaki embriyonik kemikleşme olayında birçok ortak aşama var ise de, bu iki türdeki embriyonik kemikleşme arasında belirgin farklar da bulunmaktadır. Memelilerde kemik dokusu; embriyonik dönemde ya intramembranöz yani primer (dezmal) ossifikasyon, ya da intrakartilaginöz yani sekonder (kondral) ossifikasyon yoluyla meydana gelmektedir (Dekleer 1982, Olsson 1982, Erbeni ve ark 1987, Cireli 1997, Sağlam ve ark 1997).

#### 2.3.1.1.1. İntramembranöz (primer, dezmal) Ossifikasyon:

İnsanlarda, embriyonik hayatın 6-7. haftalarında ilk önce clavicula'da ve daha sonra da calvaria'ya ait olan yassı kemiklerin gelişeceği bölgelerde bu tür kemikleşme görülmektedir. Bu kemikleşmede ilk önce kemik dokusunun şekilleneceği bölgedeki mezenkim hücreleri bölgedeki damarlar etrafında toplanarak, buralarda çoğalırlar. Bu dönemde, bölgedeki hücreler arasında şekilsiz temel madde ve ince kollagen iplikler bulunur ki, bu bölgeler "ossifikasyon merkezleri" olarak adlandırılırlar. Bölgedeki hücrelerin bir kısmı osteoprogenitör hücrelere farklılaşır ve bu osteoprogenitör hücreler de irileşerek, bazofilik sitoplazmalı ve poligonal şekilli osteoblastlara dönüşürler (Erbeni ve ark 1987, Hall 1987). Osteoblastlar kemiğin organik matriksini sentezler ve takiben de mineralizasyonunu sağlarlar. Bu hücrelerden salgılanan kollagen ve proteoglikan matriks, başlangıçta mineralize değildir ve "osteoid" olarak isimlendirilir (Olsson 1982, Paker 1990, Mercer 1993). Salgılanan kollagen fibrillerin belli bir doğrultuları olmayıp farklı yönlerde seyrederek. Takiben, osteoblastların enzimatik aktiviteleriyle osteoid doku kalsifiye olur. Bu erken embriyonik gelişim evresindeki kemiğe "lamelsiz kemik, örgülü kemik, primer spongiyöz kemik" denir. Kalsifiye olan matriks içinde hapsolan osteoblastların, içlerinde sıkışıp kaldıkları ve yaşamlarını sürdürdükleri küçük boşluklara "lakuna osseum" adı verilir. Bu hücreler artık osteosit olarak nitelenmektedir (Erbeni ve ark 1987). Osteoblastların tamamı osteosite dönüşmeyip, önemli bir kısmı bu bölgede çoğalır ve oluşan bu ilk kemik dokusunun yüzeyine tek sıra halinde dizilirler. Osteoblastik faaliyet her noktada aynı hızda gerçekleşmediğinden, oluşan ilk kemik dokusu kemikleşme merkezinden çevreye doğru ışınal biçimde uzanan çıkıntılar, yani spiküller (kemik trabekülleri) tarzındadır. Birbirleriyle birleşen trabeküller, süngerimsi bir ağ tarzındaki "spongiyöz kemik" dokusunu oluştururlar (Olsson 1982, Cireli 1997, Sağlam ve ark 1997).

Matriksin şekilsiz unsurları ve kollagen fibrillerin oluşmasından sonra kemik alkalin fosfataz (ALP) enziminin etkisi ile  $Ca^{+2}$  iyonlarının bölgedeki miktarı artar ve bu iyonlar inorganik fosfatlarla birleşerek kalsiyum fosfat ve karbonat tuzlarını oluştururlar. Hidroksilapatit kristalleri halindeki bu tuzlar kollagen fibrillerin üzerine ya da aralarına yerleşirler. Bu yeni oluşan kemik dokusunda osteoblastlar spongiyöz tabakadaki her trabekülün hem serbest uçlarında ve hem de yan yüzlerinde dizilmiş olup, faaliyetlerine devam ederek trabeküle yeni kemik dokusu eklerler. Yan yüzlere lameller halinde yeni kemik dokusu (sekonder kemik) eklendikçe trabeküller arası mesafeler daralır ve kemiğin histolojik yapı karakteri değişir. Oluşan bu yeni kemik türüne “kompakt kemik, sekonder kemik” denir (Moore 1983, Cireli 1997, Sağlam ve ark 1997).

#### **2.3.1.1.2. İntrakartilaginöz (Kondral, Sekonder) Kemikleşme:**

Clavicula ve kafatasının yassı kemikleri dışında kalan, iskeletin diğer bütün kemikleri bu kemikleşme ile gelişmektedir. Bu kemikleşmede, kemiği oluşturacak bölgede kemiğin önce hiyalin kıkırdaktan oluşan bir taslağı şekillenmektedir. Kondral kemikleşme, kıkırdak modelin periferinde başlıyorsa “perikondral kemikleşme”, iç bölgelerinden başlıyorsa “enkondral kemikleşme” olmak üzere iki tipte gözlenmektedir (Olsson 1982, Erbenği ve ark 1987, Cireli 1997, Sağlam ve ark 1997).

##### **2.3.1.1.2.1. Perikondral kemikleşme:**

Bu tip kemikleşmede kemik dokusu oluşumu, şekillenecek olan kemiğin hiyalin kıkırdak modelini çevreleyen kıkırdak zarından (perikondrium) başlamaktadır. Perikondrium'un iç katmanında bulunan mezenkimal hücreleri bölünüp farklılaşarak osteoprogenitör hücrelere, bu hücreler de osteoblastlara dönüşmektedirler. Osteoblastların faaliyeti ile kıkırdak modelin diyafizinin orta bölgesinde modeli çepe çevre saran ince bir “kemik manşon” şekillenir. Diyafizin orta bölgesini çepe çevre kuşatan bu kemik manşon, eklenen yeni kemik lamelleri ile daha da kalınlaşır. Osteoblastların etraflarında hidroksilapatit kristallerinin çökeliş birikmesiyle bu hücrelerin bir kısmı daha sonra osteositlere dönüşür. Oldukça vaskülarize durumdaki bu periostal bağ dokusu, osteoklastların periostal manşonda açtığı deliklerden bölgeye nüfuz eder. Osteoklastlar enzimatik aktiviteleri ile kıkırdak hücrelerinin çevresinde boşluklar oluştururlar ki, içinde damarların seyrettiği bu boşluklar daha sonra Havers ve Volkman kanallarına dönüşürler. Uzunlamasına kesitlerde periostal spongiyöz kemiğin histolojik görünümü enkondral spongiyöz kemiğinkinden oldukça farklıdır. Enkondral spongiyöz kemikte boşluklar ve trabekulalar düzensiz bir sünger

görünümünde olduğu halde, periostal spongiyöz kemikte boşluklar ve trabekulalar birbirlerine paralel ve düzenli bir seyir takip ederler (Olsson 1982, Hall 1987).

Kıkırdak taslağın perikondrium'u, kemiğin oluşumunun tamamlanmasından sonra periosteum adını alır. Perikondral kemikleşmede, uzun kemiklerin diafiz kısımlarındaki kalınlaşma daha belirgin iken, metafizlere doğru bu kalınlaşma daha az belirgindir.

#### 2.3.1.1.2. 2. Enkondral kemikleşme:

Perikondriumdan başlayan perikondral kemikleşme ile diafizde gerçekleşen enkondral kemikleşme olayları, başlangıçları ve devamları açısından birbirleriyle uyum içinde gerçekleşirler. Kıkırdak modelin diafiz bölgesine karşılık gelen orta kısmının yüzeyinde, önce perikondral kemikleşmeyle spongiyöz kemik yapısındaki kemik manşet şekillenir. Takiben de, diafizin tam ortasında yeni bir kemikleşme olayı başlar (Olsson 1982, Cireli 1997, Hall 1987). Kıkırdak dokusunun içinde gerçekleşen bu kemikleşme olayı "enkondral kemikleşme" olarak adlandırılmaktadır.

Periosteumdan kıkırdak dokuya nüfuz eden damarlar yoluyla gelen mezenkim hücreleri iki yönde diferensiyasyon olurlar: Bu hücrelerden ilki kondroklastlardır. Bu hücreler salgılarıyla kıkırdak dokusunu yıkımlar ve kıkırdak temel maddesinin büyük kısmını eritirler. İkinci hücre tipi ise osteoblastlardır. Kondroklastların faaliyeti sonucu, dejenere olan kıkırdak yavaş yavaş rezorbe edilerek ortadan kaldırılır (Moore 1983). Esas olarak metafizleri oluşturan enkondral kemikleşme, kıkırdağın ortasında şekillenen kemikleşme merkezlerinden başlar ve çift yönlü olarak metafizlere doğru genişlemek suretiyle ilerler. Boyuna kesitlerde, ilerleme sahası tepe noktaları diafizde birbirine bakan ve tabanları metafizlerde bulunan iki üçgen şeklinde görülür. Burada oluşan kemik, yıkımlanan kıkırdak kitlesinin yerini tamamen dolduramaz. Çünkü gelişmekte olan kemik bir yandan da rezorbe edilmektedir. Rezorpsiyon sonucunda kemik bölmeleri arasında küçük boşluklar oluşur. Boşlukları işgal eden mezenkim doku sonradan kemik iliğine farklılaşır. Böylece metafizlerin substantia spongiosa şekillenmiş olur (Hall 1987).

Epifizlerin enkondral yolla kemikleşmesi, metafizlerinkinden çok daha geç gerçekleşmektedir. Yeni doğanlarda çıplak gözle görülebilecek büyüklükte olan ve "kemikleşme çekirdeği" de denen merkezi bölgeden başlayarak bütün epifizini kaplamaktadır.

Bu merkeze “sekonder ossifikasyon merkezi” denmektedir (Moore 1983, Erbenđi ve ark 1987, Cireli 1997, Sağlam ve ark 1997).

### 2.3.1.2. Kanatlılarda Kemik Dokusunun Embriyonik Gelişimi

Bu türde de uzun-yuvarlak ve yassı kemikler embriyonik dönemde farklı yollarla oluşurlar. Kanatlılarda uzun kemiklerin gelişmesi, ilk kez Fell tarafından 1925 yılında detaylı biçimde tanımlanmıştır (Pechak ve ark 1986a). Kanatlı embriyosunda ekstremite tomurcuklarından köken alan kemikler subperiostal yolla gelişmektedir. Yani kemiklerin önce hiyalin kıkırdak modelleri oluşmakta ve bunlar kemik dokuya dönüşmektedir. Ancak, söz konusu kemikler kıkırdak modellerden gelişmelerine rağmen, bu türde encondral kemikleşme gözlenmemektedir. Primer kıkırdak model, embriyonik yaşam boyunca mineralize olmadan varlığını sürdürmektedir. Kuluçkadan çıktıktan sonra, kan damarlarının invazyonunun artışıyla birlikte matriksin mineralizasyonu ve bütünlüğünün bozulması, sonuçta da kıkırdağın kemikleşmesi art arda gerçekleşen olaylardır. Subperiostal kemik, kıkırdak modelin orta kısmında yani kemiğin diyafizini oluşturacak bölgede kıkırdak modelin yüzeyinde gelişmekte ve kıkırdakla, bu dönemde artık periosteum olarak isimlendirilen yapı arasında yayılmaktadır. Kıkırdağa damarların ilk invazyonu periosteum'daki damarların kıkırdak modele nüfuz etmesiyle gerçekleşir. Bu nedenle kıkırdak matriksine ulaşan ilk osteojenik hücreler periosteum'dan köken almaktadır. Takiben, kan kökenli osteoprogenitör hücreler kemikleşme sahasına gelirler. Bu hücreler, yıkılanan kıkırdak matriksinin kalıntıları üzerine toplanarak buralarda osteoblastlara dönüşürler. Daha sonra bu hücre toplulukları kemik spiküllerini (trabekülleri) meydana getirirler. Ardından da birbirleriyle anastomozlaşan bu trabeküller süngerimsi tabiattaki ağımsı bir yapı oluştururlar (Hall 1987).

Hamburger Hamilton (HH) skalasına göre yapılan sınıflamanın 23-26. evreleri arasında (inkübasyonun 4-5. günleri) tavuk embriyolarının ekstremite tomurcuklarının merkezi bölgelerine doğru mezenkimal hücrelerin göçü başlamakta ve bu hücreler kondrositleri oluşturmak üzere çoğalıp farklılaşmaktadırlar. Kanatlılarda, embriyonik dönemde kemik doku oluşumunun önemli bir göstergesi olan kalsifikasyonun tibiada HH-33. evreye kadar (inkübasyonun 7,5-8. günleri) gözlenmediği ifade edilmekle (Syftestad ve ark 1985, Pours ve ark 1998) birlikte; Hall (1987) tavuk embriyosunda kalsifikasyonun, inkübasyonun 5,5-6. günlerinde (HH-28-29) başladığını ileri sürmektedir. Ancak; kanatlılarda ilk kemikleşmenin embriyonik dönemin 5,5-8. günleri (HH- 28-34) arasında başladığını gösteren güçlü bulgular da elde edilmiştir. Bu bulgular;

1. Perikondrium'da inkübasyonun 5,5-6. günlerinde (HH-28-29), normalde kırıkta dokusunda bulunmayan Tip I kollagen tespit edilmiştir (Tachetti ve ark 1987). Ayrıca osteoblastlarda bulunan ALP enzimine de yine aynı dönemde, perikondrial hücrelerde de rastlanmaktadır (Hall 1987).

2. Kemik dokusunun şekillenmeye başladığını gösteren bir bulgu olan diyafizin ortasındaki kondrositlerin irileşip, hipertrofik hal almaları, inkübasyonun 6-6,5. günlerinde (HH-29-30) gözlenmektedir (Tachetti ve ark 1987, Haynes 1990).

3. İnkübasyonun 6,5. gününde (HH-30); perikondrium dışta ipliksel, içte hücresel özellikteki iki katmandan oluşan bir yapıya sahiptir. Perikondrium'un dış katmanı yassılmış hücreler içerir. Bu hücreler, kırıkta çevreleyen fibröz kapsülün ipliksel unsurları ile şekilsiz temel maddesini üretirler. Perikondrium'un iç katmanı ise kırıkta büyümesini sağlayan kondroblastlara diferensiyel olan hücreleri içerir. Kemikleşme sürecinde perikondrium periosteum'a dönüştüğünden dış katman fibröz karakterini korurken, iç tabakadaki hücreler osteojenik özellik kazanırlar (Hall 1987).

4. İnkübasyonun 6,5-7. günlerinde (HH-30-31) diyafizin orta bölgesinde ilk osteoid alanlar belirir. Bu alanların ortaya çıkışını takiben, çift katlı perikondrium artık periosteum olarak isimlendirilir. Bu dönemde osteoblast karakteri kazanan hücreler periosteum'un kırıkta bakan iç yüzünde görülürler (Hall 1987).

5. İnkübasyonun 7,5-8. günlerinde (HH-33) ise osteoid'de mineralizasyon başlar (Hall 1987, Pechak ve ark 1986a).

Yukarıda da ifade edildiği gibi inkübasyonun 8. gününde (HH-34) mineralizasyonun başladığı kanatlı tibia'sında 10. günde (HH-36) manşon şeklindeki mineralize kemik halka açıkça görülmektedir. Bu mineralize kemik manşonun yüzeyi, büyüme merkezleri olarak kabul edilen mineralizasyon alanları, yani kalsifikasyon sahalarını içerir. Buradaki kemikleşme merkezleri daha sonra, dışta şekillenecek olan ikinci bir mineralize manşonu destekleyecek olan sütunları şekillendirmek üzere dışa doğru genişler. Oluşan ikinci mineralize halka ilkinden biraz daha geniştir. İnkübasyonun 11. gününde (HH-37), periostal kemik trabekülleri uzar ve kemik taslağının diyafizeal bölgesi ard arda eklenen silindirik



manşonlar nedeni ile kalınlaşır. Bu kalınlaşma süreci kuluçkadan çıkışın 2. gününe kadar devam eder. İnkübasyonun 10 ve 11. günlerinde (HH-36-37), periosteumun altındaki kıkırdağa vasküler invazyonun ve kıkırdak dokusunda erozyonunun başlaması olaylarıyla, mineralize durumdaki silindirik biçimli bölgelere besleyici arterlerin girerek kemik iliği boşluğunun şekillenmeye başlaması olayı, kanatlılardaki embriyonik kemikleşme sürecinde ortaya çıkan önemli olaylardandır (Courtin ve ark 1997). Bu olaylar sonucunda tipik primer Havers kanalları sistemine sahip olan kortikal kemik gelişmesine devam eder (Courtin ve ark 1997).

Pechak ve ark (1986a)'na göre uzun kemiklerin kıkırdak modellerinin kemikleşmesi esnasında gerçekleşen en belirgin histolojik değişiklikler, HH- skalasına göre 32. evre ile 44. evreler (7-18. gün) arasında başlamakta ve kuluçkadan çıkışın 2. gününe kadar devam etmektedir. HH- 32. evrede (7. gün), kıkırdak kütlesi hipertrofik kondrositlerden oluşmuştur ve osteoblastlar ile vasküler alanlardan oluşan yüzük şeklindeki mineralize osteoid doku tarafından sarılmış haldedir. HH- 35. evrede (8-9. gün) vaskülarizasyon yaygın olup, kemik yapımında rol oynayan hücre tiplerinin tamamı kemikleşme sahasındaki kıkırdak dokusunda gözlenir. HH- 37. evrede (11. gün), kemik iliği boşluğu kıkırdak modelin diyafizinin orta bölgesini tamamen işgal eder. Periosteum'un yüzeyindeki mineralizasyon ise HH- 44. evreye (18. gün) kadar devam etmektedir.

Syftestad ve ark'na (1985) göre tavuk embriyolarındaki kemik gelişimi sırasında ilk kalsifikasyon. HH-33. evrede (inkübasyonun 7,5-8.günleri) dış periostal membranda başlamaktadır. Mineral depolanmasından sonra, perikondrium'un periosteum'a dönüşmesi ile diyafizeal bölgede ard arda eklenen silindirik kemik dokusu ile periosteal kemik kalınlaşması başlamaktadır. Daha sonra kemik trabekülleri boyunca belirgin bir damarlaşma başlamaktadır. Bu olaylar, gelişmekte olan iskeletin osteogenezisinin başladığını göstermektedir. Kıkırdak dokusu endokondral kemikleşme yoluyla kemik dokusuyla yer değiştirmektedir. Bu olaylar, bir yandan diafizeal korteksin şekillenmesinde subperiostal kemik dokusunun ilavesine katkıda bulunurken; diğer yandan da hemopoietik dokunun infiltrasyonu için gereken kemik iliği boşluğunu oluşturmaktadır.

Pechak ve ark (1986b), tavuk embriyosunda uzun kemiğin gelişimini incelemişler ve HH-28. evrede diyafizin orta bölgesinde her biri farklı hücrelerden oluşan 3 bölge tanımlamışlardır. Bunlar;

1. Yumuşak mezenkimal ve miyojenik hücreler katmanı,
2. Osteoprogenitör hücre katmanı,
3. Koni şeklindeki kıkırdak doku bölgesidir.

Araştırmacılara göre (Pechak ve ark 1986b) şekillenen ilk kemik, kıkırdak dokusunun çevresinde yer alır. Diyafizin ortasında, içte yaralan ve başlangıçta osteoid doku halindeki bu doku, Tip I kollajenden oldukça zengindir. Kan damarları daha sonra mineralize olan bu bölgeye infiltre olurlar ve bu durumda osteoid, kan damarları ağıyla trabeküler kemiğin ikinci tabakasını şekillendirecek hücre sıraları arasında uzanır. Ancak bu merkezi bölgedeki kıkırdak dokusunun yerini kemik dokusu değil kemik iliği dokusu almaktadır.

Tacchetti ve ark (1987) ise, tibiadaki hipertrofik kondrositlerin bir dizi hücre diferensiyasyonu ile oluştuğunu ileri sürmüşlerdir. Araştırmacılar, HH-22. evre ile - 25. evre arasında iskelet tomurcuklarının merkezi bölgelerine mezenkimal hücre göçlerinin başladığını ve buralarda kondrosit proliferasyonunun gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Kondrogenesis sürecinin, ekstraselüler matriks makromoleküllerinin miktar ve yapılarındaki değişikliklerle başladığını ve hipertrofik kondrositler tarafından salınan matriks veziküllerinin, Ca<sup>+2</sup> iyonu birikiminin gerçekleştiği ilk merkezler olduklarını ortaya koymuşlar ve kalsifiye olan bölgedeki hücrelerin dejenere olarak, yerlerinin geniş kan damarları tarafından işgal edildiğini bildirmişlerdir. Summerlee (2001) ve Caplan ile Pechak (1987) tarafından embriyonik dönemde gerçekleşen kemik gelişiminin önemli evreleri ile bu evrelerdeki belirgin olaylar aşağıdaki tabloda (Tablo 2. 4) verilmiştir.

**Tablo 2.4:** Bazı hayvan türleri ile insanda, embriyonik gelişme döneminde gerçekleşen kemik gelişiminin önemli aşamaları.

Kemik gelişimi evreleri	Kemik gelişimi aşamaları	Türlerin embriyonik gelişme dönemleri (gebeliğin yada kuluçkanın günleri)		
		Kanatlı	Fare	İnsan
Evre 1-4	İskelet tomurcuklarının belirginleşmesi	3-4,5	12-14	40
Evre 5-8	Kıkırdak merkezinin şekillenmesi ve osteoid tabakanın üretimi	4,5-7	14-15	40-50
Evre 9	Kıkırdak hücrelerinde hipertrofinin başlaması	6,5	15	50
Evre 10	Osteoid tabakanın distale ve proksimale doğru ilerlemesi	7-16	15-16	50
Evre 11	Osteoidin mineralizasyonu	7,5	15	50
Evre 12-14	Mineralize kemik manşonuna damarların invazyonu	8-8,5	15-16	50-57
Evre 15	Trabeküler osteoidin 2. tabakasının şekillenmesinin başlaması	9	16	57-58
Evre 16-17	Vasküler manşonla bağlantılı kemik iliği unsurlarının şekillenmesi	8,5-9	16	60
Evre 18	Vasküler penetrasyon ve kıkırdak dokusunun yıkımlanması	9	15	56
Evre 19	Kıkırdağın yerini kan damarları ve kemik iliğinin alması	9-14	16-17	60
Evre 20	Trabeküler kemik yapımının devam etmesi	9-19	-	-
Evre 21	Diyafizdeki ilk şekillenen kemik manşonun yıkımlanması	11	-	-

#### 2.4. Kemik Büyümesi

Uzun ve yuvarlak kemikler enine (transversal) büyümeyle kalınlıklarını artırırken, boyuna (longitudinal) büyümeyle de boylarını uzatırlar. Longitudinal kemik büyümesi; uzun kemiklerin büyüme plakalarındaki kondrositlerin proliferasyonu ve diferensiyasyonlarını (Farquharson ve Jefferies 2000, Tachetti ve ark 1987), hücre zarı ALP enzimi ( Farnum ve Wilsman 1987, Farquharson ve Jefferies 2000) ile tip X kollagen sentezi artışı ve tip II kollagen sentezindeki yavaşlamanın yanı sıra osteonektin sekresyonunu, vitamin D reseptörlerinin ekspresyonunu, matriks veziküllerinin salınımı ve mineralizasyonları (Ohyama ve ark 1997) ile kondrositlerin hipertrofilerini ve programlı hücre ölümüyle (apoptozis) yıkımlanmalarını kapsayan oldukça karmaşık olaylar zinciri sonucunda gerçekleşir (Monson ve ark 1993, Germiller ve Goldstein 1997, Erenpreisa ve Roach 1999, Farquharson ve Jefferies 2000).

Epifizeal büyüme plakasında gerçekleşen yukarıdaki olaylar zinciri sonunda büyüme plakasındaki kıkırdak dokusunun büyümesi tamamlanmakta ve geçici kemikleşme (provizyonel kalsifikasyon) bölgesi olan kalsifiye kıkırdak dokusunun yerini tedricen kemik dokusu almaktadır. Diferensiye olan kondrositler, kıkırdağın uzamasını düzenli olarak sürdürdürebilmek için yer değiştirmek zorundadırlar. Eğer bu süreç bozulacak olursa, takibeden kemik formasyonu olumsuz yönde etkilenmektedir. Bazı araştırmacılar (Cancedda ve ark 1995), hipertrofik kondrositlerin kemik hücrelerine dönüştüğünü ileri sürmektedirler. Roach ve ark (1995) göre farklılaşmanın son aşamasına gelmiş olan iki kardeş hipertrofik kondrositten biri ölürken, diğeri osteoblasta dönüşmektedir. Buna karşın, Farnum ve Wilsman (1987) ise, başlangıçta diferensiye olan kondrositlerin apoptozis ile öldüklerini ve bunların artıklarının elimine edilmesi ile kemik formasyonunun kemik uçlarına doğru ilerlediğini bildirmektedirler.

Uzun kemiklerin enine büyümesi ise, periostal kemik trabeküllerinin art arda eklenip giderek kalınlaşması sonucu gerçekleşmektedir. Kemik uzunlamasına büyürken, aynı hızla da enine kalınlaşma devam eder ve böylece orantılı bir şekilde büyüme gerçekleşir (Courtin ve ark 1997).

## 2.5. Büyüme Plakası

Tibianın orta bölümünü oluşturan ve ilik kanalını (canalis medullaris) barındıran kompakt kemik yapısındaki diyafizin her iki ucunda süngerimsi kemik yapısındaki metafizler bulunur. Metafizlerin dışında yer alan ve eklem yüzlerine bakan kısımlar ise epifizlerdir ki, bu bölgeler hiyalin kıkırdak yapısındaki dıştan eklem kıkırdaklarıyla kaplanmıştır. Epifiz ile metafiz arasında yer alan ve uzun kemiklerin uzamasından sorumlu olan kıkırdak dokusuna, “büyüme plakası” adı verilmiştir (Olsson 1982, Brighton 1985). Çoğu kemikte hem proksimalde hem de distalde olmak üzere ikişer adet büyüme plakası bulunurken, metatarsal ve metakarpal kemikler ile falanks kemiklerinde birer adet büyüme plakası mevcuttur (Olsson 1982).

En hızlı büyüyen kemikler olan femur ve tibianın büyüme plakalarındaki kondrositlerin çoğalma ve diferensiyasyon hızları, bu kemiklerin hem büyüme hızlarını ve hem de ulaşabilecekleri uzunlukları belirler. Bu kemikler aynı zamanda basınca en fazla maruz kalan kemikler olduklarından, özellikle tibanın proksimal büyüme plakası, iskelet sisteminin gelişimini bozan faktörlerden en fazla etkilenen bölgedir. Özellikle etçi tavuklarda; tibial diskondroplazi, osteokondrozis, raşitizm, epifiz ayrılması, tibia rotasyonu, tibia bükülmesi, gastroknemius tendonunun yırtılması ve kayması olguları sıklıkla rastlanan iskelet bozukluklarıdır. Bu nedenle tibianın proksimal büyüme plakası, gerek deneysel çalışmalarda ve gerekse de iskelet sistemi hastalıklarının teşhisinde özel bir öneme sahiptir (Leterrier ve Nys 1992).

Büyüme plakasının epifize ya da metafize ait olduğu konusunda yapılan tartışmalar kesin bir sonuca ulaşmamıştır. Zira, tibianın embriyonik gelişiminin başından itibaren gerçekleşen olaylar zinciri dikkate alındığında büyüme plakasının “metafizel büyüme plakası” olarak isimlendirilmesi (Olsson 1982) uygun olmakla birlikte; plakanın rezerv zonunun epifiz kıkırdağıyla komşu olması ve onunla devam etmesi, “epifizel büyüme plakası” ifadesinin daha uygun olacağını akla getirmektedir. Ancak çoğu araştırmacı (Haynes ve ark 1985, Haynes 1990, Julian 1998, Orth 1999), tibiadaki büyüme plakalarından proksimaldekini “proksimal tibial büyüme plakası”, distaldekini de “distal tibial büyüme plakası” olarak adlandırmaktadır. Tibial büyüme plakası kanatlıların kuluçka dönemi boyunca, uzun kemiklerin uç kısımlarında koni şeklindeki kıkırdak kütleleri halindedir. Bu kıkırdak kütleler, kuluçka sonrası 5-7. günlere kadar varlıklarını sürdürürler. Bu dönemden sonra ise büyüme plakası histolojisini kazanırlar (Riddell 2003).

Büyüme plakasında yeni kemik doku oluşumu tek yönlü, yani unipolardır. Büyüme, ekstremitelerde kemiklerinde proksimal ya da distal yöne doğru, vertabraların korpuslarında ise kranial veya kaudal yönlerde doğrudur (Olsson 1982).

Büyüme plakasında, değişik kondrosit tiplerinin şekillendirdiği farklı zonlar bulunur ve her bir zon, farklı diferensiyasyon evrelerindeki kıkırdak hücrelerini barındırır (Germiller ve Goldstein 1997). Kanatlılardaki epifizeal büyüme plakasının yapısını daha iyi tanımlayabilmek için, memelilerdeki büyüme plakasının yapısı ile karşılaştırmak yararlıdır. Memeli tibiasındaki büyüme plakasında; rezerv zon (dinlenme fazındaki hücrelerin oluşturduğu zon), proliferasyon zonu (proliferatif zon), tranzisyonel zon, hipertrofik zon, dejenerasyon zonu ve provizyonel kalsifikasyon zonu (kalsifiye kıkırdak zonu) olmak üzere farklı zonlar tanımlanmıştır (Olsson 1982). Her ne kadar Orth (1999), kanatlıların tibial büyüme plakasında, memelilerdeki rezerv zona karşılık gelen dinlenme fazındaki hücrelerin oluşturduğu zon, proliferatif zon, ve hipertrofik zon olmak üzere 3 zon bulunduğunu bildirmişse de çoğu araştırmacı (Haynes ve ark 1985, Leach ve Gay 1987, Germiller ve Goldstein 1997, Farquharson ve Jefferies 2000), proliferatif zonla hipertrofik zon arasında bir tranzisyonel zonu bulunduğunu ifade etmektedirler. Hücrelerin olgunlaşma sırası, kanatlı ve memeli türlerinin her ikisinde de düzenli katmanlar halinde olmakla birlikte; kanatlıdaki hücre sütunları daha uzun olup, nispeten daha düzensiz dizilmiş olan hücre sütunlarından meydana gelirler (Kember ve ark 1990). İki türün büyüme plakalarının hücre sütunlarındaki kondrosit sayıları arasında da farklar vardır. Örneğin, 4-7 haftalık broiler piliçlerle beyaz Legorn'ların hücre sütunlarında 200 hücre bulunurken, 6 haftalık ratta hücre sayısı 25 kadardır (Leach ve Gay 1987). Kanatlılarda metafizeal kan damarları daha geniştir ve büyüme plakasının içine daha fazla penetre olmuşlardır. Legornlar'da zonlar arasındaki geçiş ve hipertrofiye hücre zonundaki vasküler penetrasyon daha düzenlidir. Broilerlerde, düzensiz bir kondrosit sütun yapısı bulunmasının yanında, kıkırdak matriksinin kalsifikasyonu da düzensizdir (Leach ve Gay 1987).

Büyüme plakasındaki epifize komşu olan ilk zon, rezerv zondur. Bu zon germinal hücre zonu olarak da isimlendirilmektedir. Kanatlılarda embriyonik dönemde bulunmayan (Germiller ve Goldstein 1997) bu zondaki hücreler, kuluçkadan çıkıştan sonra gerçekleşen kemik büyümesinden sorumlu olan hücrelerdir. Bu zondaki hücreler yassı olup; bölgenin hücre yoğunluğu diğer zonlarla karşılaştırıldığında daha düşüktür (Leach ve Gay 1987,

Farquharson ve Jefferies 2000). Bu zonun ekstraselüler matriksi diğer zonlara oranla daha fazladır ve buradaki hücrelerin sitoplazmaları glikojence oldukça zengindir. Elektron mikroskopta bu hücrelerin granüler endoplazmik retikulum bakımından (gER) da oldukça zengin oldukları ve aktif olarak protein sentezledikleri görülmektedir. Bu hücrelerin; glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G<sub>6</sub>PDH), malik dehidrogenaz (MDH), fosfoglukozizomeraz (PGIM), alkali fosfataz (ALP) ve asit fosfataz (ACP) enzimleri ile total ve inorganik fosfat, kalsiyum klorür, potasyum ve magnezyum iyonları bakımından fakir oldukları bildirilmektedir (Olsson 1982, Brighton 1985). Bu zonun matriksi, diğer zonlarınkinden daha az miktarda lipid, glikozaminoglikan, protein ve polisakkarit içermekte ve düşük lizozomal aktivite göstermektedir. Büyüme plakasındaki en yüksek hidroksilpirolin içeren bölge rezerv zondur. Bölgenin matriksindeki kollagen iplikler rastgele tertiplenme göstermektedirler (Brighton 1985).

Büyüme plakasındaki her bir kondrosit, rezerv zondan itibaren kademe kademe bir sonraki zona doğru ilerler. Nitekim, rezerv zondaki yassı kondrositler, diferensiyasyon olarak proliferatif zonun yassı-oval kondrosit sütunlarını oluşturmaktadırlar. Bu ilerleyişin hızı türlere göre büyük değişiklikler göstermektedir. Örneğin, broiler tavuklarda bu süre yaklaşık 21 saat iken, insanda 20 gün, ratlarda 2 gündür (Farquharson ve Jefferies 2000). Proliferatif zondaki hücreler oval bir nükleus ile yoğun ve eozinofilik bir sitoplazmaya sahiptirler (Brighton 1985, Haynes ve ark 1985, Farquharson ve ark 1992). Kondrosit sütunları, kemiğin uzun eksenine paralel, yani longitudinal tarzda dizilmişlerdir. Memelilerde bu sütunlar oldukça düzenli iken, kanatlılarda düzensiz ve daha fazla hücre içerdiğinden, bölge daha az ekstraselüler matrikse sahiptir (Farquharson ve Jeffries 2000). Nitekim, bu zon, büyüme plakasının hücresel yoğunluğu en yüksek olan zondur (Haynes ve ark 1985). Matriks bazofilik olup, kollagen ipliklerden de zengindir. Kollagen iplikler ve matriks vezikülleri rastgele dağılmışlardır. Bu zondaki hücrelerin sitoplazmaları da glikojence oldukça zengindirler. H<sup>3</sup>-timidin ile yapılan otoradyografik çalışmalarda, proliferatif zonda bulunan kondrositlerin bazı özel durumlar dışında, büyüme plakasının bölünebilen tek hücre tipi olduğunu ortaya konmuştur (Brighton 1985, Farquharson ve ark 1992).

Proliferatif zonun distal sınırıyla komşu durumdaki tranzisyonel zon, poligonal kondrositlerin oluşturduğu düzensiz tertiplenmiş vertikal sütunlardan oluşur. Tranzisyonel zondaki kondrositler; santral lokalizasyonlu bir veziküler nükleusa ve çok sayıda iri vakuole sahip olan eozinofilik sitoplazmalı hücrelerdir. Ayrıca tranzisyonel zondaki kondrositlerin

çoğu, uçları lakunların sınırlarına ulaşan ince sitoplazmik uzantılara sahiptirler. Bu zonun non mineralize durumdaki matriksi, proliferatif zonun matriksinden daha fazladır (Haynes ve ark 1985).

Hipertrofik zon, kondrosit farklılaşmasının son aşamasındaki hücrelerin oluşturduğu ve tranzisyonel zondakinden daha iyi tertiplenmiş hücre sütunlarından oluşur. Bu zondaki iri hücreler daha yuvarlaktır ve daha fazla sitoplazmik vakuol içerirler. Vakuolasyon metafize doğru daha da artar. Hücreler nükleer fragmantasyonu takiben ölürler (Haynes ve ark 1985). Bu zonun matriksi, metafizde başlayan ve distale doğru artan mineralizasyon nedeniyle oldukça serttir. Bu zondaki hücreler Tip II kollagen, Tip X kollagen ve alkalin fosfataz enzimini sentezlerler (Castagnola ve ark 1986, Haynes 1990). Ayrıca bu zonu oluşturan hipertrofik kondrositler, diğer kıkırdak hücrelerinin (kondrosit ve kondroblast) sentezlediği “antivasküler invazyon faktörü”nü sentezlemezler. Bu faktör, damar endotellerinin proteaz grubu enzimleri sentezlemesini baskılayarak, kıkırdak matriksine kan damarlarının invazyonunu engellemektedir. Proteazlar, matriksi parçalayan ve damarların doku içinde yayılmasını kolaylaştıran bir enzim grubudur. Hipertrofik kondrositler antivasküler invazyon faktörünü sentezleyemediklerinden, bu zonda hızlı bir vaskülarizasyon gelişerek matriksin mineralizasyonu hızlanır. Hipertrofik kondrositler hayvan türüne ve şekillendikleri kemik bölgesine bağlı olarak ya ölürler, ya da osteoblastlara dönüşürler. Bundan dolayıdır ki, bu zon oldukça dardır (Hall 1987).

Memelilerde kemiklerin longitudinal büyüme hızları, hipertrofik kondrositlerin proliferasyon hızı ve hacimlerdeki artışlarla belirlenmektedir. Bu yüzden, memelilerde kemiğin uzama hızı ile büyüme plakasındaki hipertrofik zonun uzunluğu arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır. Bununla birlikte, kanatlılarda kemiğin uzama hızını belirleyen faktörler, proliferatif hücre zonundaki hücrelerin bölünme ve büyüme hızlarıdır (Kember ve ark 1990, Germiller ve Goldstein 1997, Farquharson ve Jefferies 2000).

Hipertrofik zonun orta hattına kadarki bölgede bulunan kondrositlerin sitoplazmaları glikojen bakımından oldukça zengin olduklarından güçlü PAS (+) reaksiyon vermektedirler. Ancak orta hattın hemen altındaki hücreler bu yeteneklerini kaybetmektedirler. Transmisyon elektron mikroskopunda ise, hipertrofik zonun ortasına kadarki bölgede lokalize olan kondrositler normal görünürler ve sitoplazmik organellerin hemen tamamını içerirler. Metafize yaklaştıkça hücreler mitokondriyonları dışındaki diğer sitoplazmik organellerini

kaybederler ve hücre membranları yoğun bir fragmantasyon gösterir. Sütunun dibindeki hücreler öldüklerinden, hipertrofik zon ölü hücrelerin oluşturduğu dejenerasyon zonunda sonlanır (Brighton 1985, Farnum ve Wilsman 1987).

Dejenerasyon zonu, apoptozisle ölen, dejenere hücrelerin oluşturdukları zondur. Kanatlılarda oldukça ince olan bu zon çok az sayıdaki hücreden oluşur.

### 2.5.1. Büyüme Plakasının Vaskülarizasyonu

Arka ekstremitelerin kan ihtiyacı 2 ana arterden sağlanmaktadır. Bu arterler arteria ischiadica ve A. iliaca externa olup, bölgenin sadece anterior kısmını beslerler. A. ischiadica, A. poplitea kolunu verir ve bu damar da 3 kola ayrılarak A. genu suprema, A. tibialis anterior ve A. tibialis medialis'i oluşturur. Bu 3 arter ve diğerleri tibia'nın anterior kısmını çevreler ve tibia'nın proksimal metafizi ile epifizini besleyen küçük besleyici damarları gönderirler (Howlett ve ark 1984). Büyüme plakası birbirlerinden bağımsız iki intraosseöz vasküler kanal tarafından beslenmektedir. Bu vasküler kanallar arasında olgun ve hipertrofik kondrositlerden oluşan ince bir avasküler zon bulunur. Epifiz ve metafizden gelen damarlar perikondral ve periostal bölgede, kemik dışında birbirleriyle anostomoz yaparlar.

Her ne kadar, kıkırdak dokusunun kan damarı içermediği ifade edilse de, bu düşünce soluk borusundaki kıkırdak halkalar ve eklem kıkırdağı için geçerlidir. Çoğu hayvan türünün büyüme plakasındaki kıkırdak dokusunda vasküler kanallar bulunmaktadır. Hindi ve tavukların büyüme plakalarında, epifizden gelen kan damarları, tranzisyonel zona kadar penetre olabilirler. Hipertrofik zon ise metafizden gelen kan damarlarıyla vaskülarize edilmektedir. Bu metafizeal arterler, tranzisyonel zon-hipertrofik zon hattına kadar penetre olurlar (Haynes ve ark 1985).

Büyüme plakasını sınırlandıran epifizdeki kanallardan giren arterler, dallara ayrılarak kıvrımlı seyreden çok sayıda küçük damarlara ayrılırlar ki, bunlar da rezerv zon hücrelerinin yakınlarında sonlanırlar. Arterlerin seyrettikleri kanallarda ve onların tersi yönde seyreden venalar büyüme plakasının venöz kanını epifize taşırlar. Her bir son uç arter, 5 ya da 6 proliferasyon zonu sütununu şekillendirecek kadar kondrositi besleyebilir.

Her ne kadar hindi ve tavukların büyüme plakalarının histolojik kesitlerinde, metafizeal ve epifizeal kan damarları arasında anostomozlaşma varmış gibi görünse de,



epifizden gelerek büyüme plakasını vaskülarize eden kan damarları ile metafizden gelerek provizyonel kalsifikasyon sahasına penetre olan metafizeal kan damarları arasında anastomoz bulunmamaktadır (Olsson 1982). Bununla birlikte, bu iki kanatlı türünün büyüme plakalarının kesitlerinde epifizden gelen geniş kan damarlarının bazen plakayı tamamen katederek metafize ulaştıkları görülmekteyse de, yüksek büyütmelelerde yapılan incelemelerde epifizeal bir damarın ucu ile metafizeal damarın ucu arasında direkt bağlantının olmadığı ve çok yakın lokalizasyonlu da olsalar iki, damar arasında zayıf eozinofilik ince bir bölmenin mutlaka bulunduğu görülür. Zira, tibianın çoğunlukla kırıkardan oluştuğu 4 günlükten küçük kanatlılarda; üçgen şekilli kırıkdağın derin bölgeleri bile epifizeal arterlerle vaskülarize edilmektedir (Olsson 1982). Ancak; Howlett ve ark (1984), epifizyal ve metafizyal damarların birbirlerine çok yakın seyrettikleri bölgede ve bu damar pleksusları arasında kum saati benzeri daralmış bir bağlantı bölgesinin bulunduğunu ileri sürmektedir.

Büyüme plakasının kan damarları, plakanın genişlemesi ve kemiğin büyümesinin regülasyonunda hayati bir role sahip olmaları yanında, uzun kemiklerin belli hastalıklarının patogenezisinde de önemli roller oynamaktadırlar (Howlett ve ark 1984).

## **2.6. Kemiğin Gelişmesini Etkileyen Faktörler**

Kemik metabolizması, endojen ve eksojen birçok faktör tarafından düzenlenmektedir. Bu faktörler, kemiğin yeniden yapılanma (remodelling) sürecinde gerçekleşen formasyon ve rezorbsiyon olaylarını hızlandırmak ya da yavaşlatmak suretiyle etkilerini göstermektedirler (Capen ve Weisbrode 1982).

### **2.6.1. Kalsiyum Metabolizması ve Bunu Düzenleyen Hormonlar**

Kalsiyum, canlı organizmanın en önemli minerallerinden biridir ve kemiklerde %99 oranında hidroksilapatit kristalleri şeklinde bulunur (Kul 1996, Farquharson 1999). Memelilerde total serum  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu ortalama 10 mg/dl'dir ve bu düzey kemik dokusunda  $Ca^{+2}$  depolanması veya mobilizasyonu suretiyle fizyolojik limitler arasında tutulmaktadır (Doğan ve Yetişir 1983, Norman ve Hurwitz 1993).  $Ca^{+2}$  iyonları kas kontraksiyonunda, kanın koagülasyonunda, enzimlerin aktive edilmelerinde, hormonların salınmasında, sinir uyarımlarının iletimi ve hücredeki membranların geçirgenliklerinde önemli roller oynamaktadır (Capen ve Weisbrode 1982).

Kan  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun fizyolojik limitler arasında tutulmasını sağlayan endokrin mekanizmalar arasında; paratiroid hormonu, kalsitonin ve Vit D önemli yer tutarlar. Bu hormonlar kan  $Ca^{+2}$  seviyesinin kontrolünde direkt etkili olmalarına rağmen; adrenal kortikosteroidler, östrojenler, tiroksin, somatotropin ve glukagon gibi diğer hormonlar da belli şartlar altında  $Ca^{+2}$  homeostazisinin sağlanmasına katkıda bulunurlar (Capen ve Weisbrode 1982, Kul 1996, Seahorn 1997, Williams ve ark 1999). Bu hormonlar kan plazması ile başlıca 3 organ arasındaki (kemik, bağırsaklar, böbrekler)  $Ca^{+2}$  alış verişini düzenlerler. Besinlerle alınan  $Ca^{+2}$  iyonlarının organizma sıvılarına dahil edilmesinde bağırsaklar, depolanmaları ile kullanılmasında kemikler ve reabsorbsiyon ya da ekskresyon işlemlerinde de böbrekler fonksiyon görürler (Capen ve Weisbrode 1982, Kul 1996).

### 2.6.2. Parathormon (Para Thyroide Hormone, PTH)

Bu hormon paratiroid bezinden salgılanır. Molekül, 84 aminoasitten oluşan tek bir polipeptid olup, molekül ağırlığı 9500 daltondur. PTH, paratiroid bezinin sekretorik hücrelerinde üretilir ve küçük miktarlarda depo edilir. Hormonun direkt olarak regülatör etki gösterdiği yerler kemik ve böbrekler olup, indirekt etkisini gösterdiği yer ise ince bağırsaklardır (Capen ve Weisbrode 1982, Noyan 1993).

PTH'nun en önemli biyolojik etkileri arasında P iyonunun üriner yolla atılımını ve  $Ca^{+2}$ 'un tubuler reabsorbsiyonunu artırmak, kemik yenilenmesi (remodelling) ve kemik rezorpsiyon hızını artırmak, kemik yüzeyinde osteoklastların sayı ve aktivitelerini artırarak osteolizisi hızlandırmak ve hidroksilprolinin üriner yolla atılımını hızlandırmak sayılabilir (Capen ve Weisbrode 1982, Kul 1996, Pines 1999). Böylece kan  $Ca^{+2}$  iyonu konsantrasyonu yükselirken, kan P iyonu konsantrasyonu düşer.

Ekstraselüler sıvıdaki  $Ca^{+2}$  iyonu ve Vit.D metabolitlerinin düzeyleri, PTH salgılanmasını ayarlamaktadır. Paratiroid bezinin aktivitesi  $Ca^{+2}$  tarafından kontrol edilir (Wilson ve Duff 1991). Ekstraselüler sıvıdaki  $Ca^{+2}$  iyonu azaldığında, PTH salınımı artar. PTH kemik, böbrek ve bağırsak üzerine etki ederek ekstraselüler sıvıdaki  $Ca^{+2}$  düzeyini artırır.  $Ca^{+2}$  düzeyi belirli bir seviyeyi aşarsa, negatif geri bildirim (negative feed-back) yoluyla PTH salınması baskılanır. Bu kontrol mekanizması sayesinde ekstraselüler sıvıdaki  $Ca^{+2}$  düzeyi çok dar sınırlar arasında tutulur (Capen ve Weisbrode 1982, Wilson ve Duff 1991).

PTH, kemik yüzeylerinde osteoklast sayısını artırmak suretiyle osteolitik aktiviteyi yükseltir. PTH reseptörleri, büyüme plakasının hipertrofik zonundaki kondrositlerde bulunmaktadır. Osteosit-osteoblast pompasının fonksiyonuna bağlı olarak,  $Ca^{+2}$ 'un kemiklerin merkezinden yüzeyine taşınmasını sağlarken, komşu ekstraselüler sıvılardaki sitrik asit miktarını artırmak suretiyle de asit bir ortam oluşturup, minerallerin çözünmelerini, kemik rezorpsiyonunu sağlar ve sonuçta da  $Ca^{+2}$ 'un plazma konsantrasyonunun yükselmesine neden olur (Capen ve Weisbrode 1982, Kul 1996, Yiğit 1998).

### 2.6.3. Kalsitonin (Calcitonin, Thyrocalcitonin)

Kalsitonin, memelilerde tiroid bezinin "C hücreleri" yada parafoliküler hücrelerinden salgılanan bir hormondur. C hücreleri, tiroidin, tri-iodotiroksin ve tetraiodotiroksin salgılayan foliküler hücrelerinden farklı hücrelerdir. Bu hücreler; çoğunlukla folliküller arasında (interfoliküler, parafoliküler alanlar) küçük hücre grupları halinde lokalize olurlar (Capen ve Weisbrode 1982, Noyan 1993, Kul 1996).

Kalsitonin (CT), 32 aminoasitten oluşan ve 3600 dalton molekül ağırlığındaki bir polipeptid hormondur (Noyan 1993). PTH gibi kemik ve böbreği etkileyerek kan  $Ca^{+2}$  düzeyini ayarlar. Paratiroid hormonu ve CT'nin kemik rezorpsiyonundaki etkileri birbirleriyle antagonisttir. Ancak fosforun renal tubuler reabsorpsiyonunun azaltılmasında sinerjik etkilidirler. CT, kan  $Ca^{+2}$  düzeyini düşürürken, bir yandan da böbrekte  $Ca^{+2}$  ve fosfatın geri emilimini önleyerek, bu iki iyonun idrarla atılım hızlarını artırır. Kemiklerden mineral maddelerin mobilizasyonunu engelleyen CT, özellikle  $Ca^{+2}$ 'dan zengin besin maddelerinin alınmasından sonra mide-barsak kanalından  $Ca^{+2}$  rezorpsiyonunun arttığı hallerde hiperkalsemiyi önleyici etki yapar. Bu etkisini osteoklastik aktivitedeki primer inhibisyon yoluyla gösterir (Capen ve Weisbrode 1982, Noyan 1993). Memelilerin osteoklastları çok sayıda CT reseptörüne sahip olmakla birlikte, kanatlı osteoklastlarının CT reseptörlerine sahip olup olmadıkları henüz açık değildir (Norman ve Hurwitz 1993, Kul 1996).

### 2.6.4. Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol)

$Ca^{+2}$  metabolizmasının regülasyonu ve kemiğin yeniden yapılanmasında görev alan önemli hormonlardan biri de kolekalsiferol yada Vit. D<sub>3</sub>'tür. Kolekalsiferol, küçük miktarlarda besinlerle alınabildiği gibi kolesterol kaynaklı olan 7-dihidrokolesterolden, ultraviyole ışınlarının katalizörlüğünde, derinin epidermis tabakasında da sentezlenir (Capen

ve Weisbrode 1982, Pellegrino ve Biltz 1983, Norman ve Hurwitz 1993, Farquharson ve ark 1993).

Eksojen olarak gıdalarla alınan kolekalsiferol, barsaklardan emilerek kan dolaşımına geçer. Suda erimeyen kolekalsiferolün, kan dolaşımıyla taşınabilmesi için taşıyıcı bir proteine (Vit. D binding protein-DBP) bağlanması gerekir. Vit.D<sub>3</sub>'ün mineral metabolizmasına katılabilmesi için metabolik aktivasyonu gereklidir. Bu amaçla kolekalsiferol karaciğerde 25-hidroksilkolekalsiferole dönüştürülür. İkinci önemli aşama ise böbrekte gerçekleşir. Bu aşamada 25-hidroksilkolekalsiferol proksimal tubullerde 1- $\alpha$ -hidroksillaz enziminin etkisiyle 1,25-dihidrokokolekalsiferole (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), yani kalsitrole aktive edilir. Vit.D<sub>3</sub>'ün son formasyon aşaması karmaşık olup, Ca<sup>+2</sup>, P ve PTH'un kan seviyeleri ile ilgilidir. Böbrekler, kan Ca<sup>+2</sup> düzeyi normal yada yüksek ise, kalsitrol yerine inaktif 24-25-dihidrokokolekalsiferol üretirler. Yüksek P düzeyi renal 1- $\alpha$ -hidroksillazı inhibe ederken, östrojen ve prolaktin bu enzimin etkinliğini artırır (Norman ve Hurwitz 1993).

Vit. D ve bunun aktif metabolitleri barsaktan Ca<sup>+2</sup> ve P absorpsiyonunu artırır ve böylece ekstraselüler sıvıda bu elektrolitlerin konsantrasyonlarının belirli seviyelerde tutulmasını sağlarlar. Hurwitz (1989) tarafından yapılan bir çalışmada, kanatlıların Vit. D'nin yokluğunda normal plazma Ca<sup>+2</sup> konsantrasyonunu sürdürmede başarısız olduğu bulunmuştur. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, Ca<sup>+2</sup> homeostazisi mekanizmasındaki olayların çoğuna Ca<sup>+2</sup>'un absorpsiyonunu etkileyerek katkıda bulunur (Norman ve Hurwitz 1993).

Sağlıklı genç bir kanatlıda, Ca<sup>+2</sup>'un %70'nin absorpsiyonu Vit.D'ye bağlı iken; ratlarda bu oran % 10'dan daha azdır. Vit.D, Ca<sup>+2</sup> absorpsiyonunu artırması yanında, bağımsız olarak kanatlı barsağından P'un emilimini de artırır. Nitekim, Peterlik ve Wasserman (1978) de P'un barsaktan trasportunun Vit.D'ye bağlı olduğunu bulmuşlardır. Vit.D ve metabolitleri, kemiğin hem formasyonu hem de rezorpsiyonundan sorumlu olan hücresel elementlerin diferansiyasyonunu kontrol ederek kemik gelişimini direkt yolla etkilemektedir (Norman ve Hurwitz 1993).

Hem 1,25 dihidroksilkolekalsiferol (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) ve hem de 24,25 dihidroksilkolekalsiferol (24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)'ün normal büyüme plakasındaki kondrositlerin gelişimi ve alkale fosfataz enziminin sentezi için gerekli olduğu gösterilmiştir (Monsonigo ve ark 1993). Gerstenfeld ve ark (1996) ile Rennie ve ark (1993)'na göre

dihidrokokalsiferolün metabolitleri, kondrosit diferansiyasyonunda rol alan genlerin hipertrofik fenotipe doğru yönelmesini artırarak kondrosit olgunlaşmasında rol oynamaktadır.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , spesifik olarak Tip II kollagenin transkripsiyonunu stimüle eder. Ayrıca kol ve bacak tomurcuklarının şekillenmesi olaylarında, mezenkimal hücrelerin morfolojik kondrogenesisini artırır (Norman ve Hurwitz 1993, Farquharson ve ark 1993, Farquharson ve Jefferies 2000).  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , hem memelide ve hem de kanatlıda kondrosit proliferasyonu ve diferansiyasyonunda direkt etkilidir (Farquharson ve ark 1993, Farquharson ve ark 1995).  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda kemik rezorpsiyonunu stimüle ettiği de bildirilmiştir (Capen ve Weisbrode 1982, Norman ve Hurwitz 1993, Noyan 1993, Kul 1996, Yiğit 1998).

#### 2.6.5. Vitamin A (retinol)

Vit. A'nın kemik metabolizmasına etkisi; osteoblastik aktivitenin artırılması suretiyle, kemik gelişimi ile vücut büyümesinin desteklenmesi şeklindedir. *In vitro* çalışmalarda retinolün kemik ve kırıkta rezorpsiyonunu stimüle edici etkisi olduğu ortaya konmuştur. Retinolün bu etkisinin ortaya çıkışında  $1,25$  dihidrokoksiferol ve PTH'nun da rolü vardır. Osteoblast ve osteoklastların aktivitelerini kontrol altında tutan Vit.A, bu hücrelerin yapısal bütünlüklerini korumalarını da sağlar. Eksikliği durumunda büyüme plakasının proliferasyon zonundaki hücre çoğalması durduğundan, endokondral kemik yapımı da durur ve kemikler uzayamaz.

Hiper vitaminozis-A durumunda ise, kırıkta proliferasyonu aksar, osteoblastik aktivite azalır; ancak osteoklastik aktivitenin artışı sonucu kemik yıkımı hızlanır (Capen ve Weisbrode 1982, Parker 1990). Ayrıca, büyüme plakasının ossifikasyonunun hızlandığı; fakat büyüme plakasındaki kırıktağın yerini çok hızlı bir şekilde kemik dokusunun aldığı ve büyümenin durduğu da bildirilmektedir. Bu nedenle A vitamininin hem yetersizliği ve hem de toksik dozları, gelişme geriliğine ve kısa boyluluğa (nanizm) neden olmaktadır (Parker 1990, Yiğit 1998).

#### 2.6.6. Vitamin C

Vit.C kollagen sentezini direkt olarak etkilediğinden, yetersizliğinde kemik matriksinin kollagen yapımı bozulur. Kemik büyümesi yavaşlar ve kırık iyileşmesi gecikir (Yiğit 1998).

### 2.6.7. Beslenme

Hayvanlara verilen rasyonun protein ve kalori açısından yetersiz olduğu durumlarda iskelet gelişimi gecikir. Diyetteki protein yetersizliği, kollagen sentezinde gerekli olan aminoasitlerin noksanlığıyla sonuçlanır ve kemik gelişimi aksar (Erbengi ve ark 1987, Paker 1990, Wilson ve Duff 1991, Kul 1996, Yiğit 1998).

### 2.6.8. Gonadal Hormonlar (Testesteron ve Östrojen)

Her iki hormon da kemik yapımını stimüle eder. Normal gelişim sürecinde büyüme plakasının kapanması belirli bir zaman alır. Bu olay üreme sisteminin gelişimi ile de yakından ilişkilidir. Erken cinsel gelişimin kemik maturasyonunu hızlandırdığı, böyle bireylerde büyüme plakasının çabuk kapandığı ve sonuç olarak da kısa boyluluğun ortaya çıktığı bildirilmektedir (Paker 1990). Testislerin az geliştiği olgularda (hipoplazik testis) yada pubertiden önce testisin çıkarılması (kastrasyon) durumlarında ise büyüme plakası geç kapanır.

Östrojenin etkisi ise tam olarak bilinmemektedir. Ancak; östrojen, osteoblastlarca sentezlenen ve osteoklastların gelişimini uyaran bir sitokin olan "interlökin-6 (IL-6)" sentezini baskılamaktadır. Böylece hem kemik yapımı ve hem de kemik rezorpsiyonu, kemik kütlelerinin devamlılığını sağlayacak ölçüde dengelenmiş olur (Mercer 1993). Östrojen seviyesinin azaldığı menapoz döneminde kemiklerde osteoporozis görülmektedir (Paker 1990, Yiğit 1998, Archer ve ark 2001). Bununla birlikte Olsson (1982), östrojenlerin, kondrosit maturasyonunu arttırdığını ve matriks kalsifikasyonunu desteklediğini bildirmektedir.

### 2.6.9. Somatotropik Hormon (Büyüme Hormonu, GH, STH)

Büyüme hormonu (STH) başta kemik, kıkırdak ve iskelet kası olmak üzere büyüme yeteneğine sahip olan vücut hücrelerini doğrudan değil, "somatomedin" adı verilen bir peptid grubu aracılığı ile etkilemektedir. Somatomedinler, büyüme hormonunun uyarıcı etkisiyle karaciğer ve diğer dokulardan salınarak kandaki taşıyıcı proteinlere bağlanırlar. Büyüme hormonunun etkisiyle salınan somatomedinler (Insuline like growth factor-I ve IGF-II) kıkırdak ve kemiklerin büyümesi için gerekli olan kondroitin sülfat ile kollagenin sentezi ve depolanmasını sağlarlar (Monsonogo ve ark 1993). Büyüme çağındaki insan ve hayvanlarda IGF-I, özellikle kıkırdak ve kemik büyümesini, IGF-II ise doku gelişimi ve onarımını hızlandırır. Kıkırdaktaki kök hücreler IGF-I'e yanıt verebilen hücrelere dönüşür, daha sonra

yerel olarak IGF-I salınır ve dolaşımdaki IGF-I'de uzun kemiklerin uçlarındaki kıkırdak dokunun gelişimini ve uzamasını artırır. STH ayrıca, periosteum'un hemen altındaki osteoblastların etkinliğini artırır. Böylece yeni trabekül oluşumu gerçekleştiği gibi, kemik dış zarından yeni kemik dokusu gelişimiyle de kemik kalınlaşması da sağlanmış olur (Loveridge ve ark 1993, Mercer 1993). Büyüme hormonunun, büyüme döneminde fazla salgılanması "devlik" (gigantism); büyüme durduktan sonra (büyüme plakası kapandıktan sonra) salgılanması ise el ve ayakların aşırı büyümesi "akromegali"; büyüme döneminde az salgılanması da "cücelik (dwarfizm)" ile sonuçlanır (Olsson 1982, Paker 1990, Monson ve ark 1993, Yiğit 1998, Yılmaz 1999).

## 2.7. Kanatlılarda İskelet Sistemi Bozuklukları

Yapılan yoğun genetik seleksiyon çalışmalarıyla geliştirilen Broiler ırklarının büyüme hızları, son 50 yıldır yaklaşık ikiye katlanmıştır. Bu ilerlemede, yemlerin besleyici değerleri yanında fiziksel özelliklerinin de iyileştirilmesi sonucu artan yem tüketim hızının da önemli etkisi vardır. Yüksek kas oranı elde etmek amacıyla yapılan seleksiyon ve hayvanın tüm ihtiyaçlarını içeren yüksek kalorili rasyonlar, kardiyovasküler hastalıklardan ölüm oranını artırmıştır. Özellikle; tavuklarda ani ölüm sendromu, ascitese yol açan pulmoner hipertansiyon sendromu, aorta yırtılması, hindilerde spontan kardiyomiyopati (yuvarlak kalp hastalığı) ve ani ölümle sonuçlanan miyopatilerin neden olduğu mortaliteler oldukça yüksektir. Yüksek yem tüketimi ile sağlanan hızlı büyüme ciddi topallıklara, kemiklerde defekt ve deformitelere neden olabilir. Mekanik olarak oluşan ve travma ilişkili problemler de broilerlerde sık görülürler (Julian 1998). Bu yüzden, günümüzde broilerlerin önemli bir yüzdesinde çeşitli derecede iskelet anormallikleri gözlenmektedir.

En sık rastlanan bozukluklar; kronik ağırlı topallıklar, distal tibio-tarsusun angular deformiteleri, tibial diskondroplazi (TD) ve osteokondrozis (OC), tibia rotasyonu, spondilolistezis, epifizyal ayrılma, gastroknemius tendonunun rupturu ve kayması ile ilişkilidir. Bu hastalıklar arasında en sık görüleni ise TD'dir (Wardale ve Duance 1996, Farquharson 1999). Bu bozuklukların önemli bir kısmının sebebi, hayvanın kemik gelişim hızının, kas gelişim hızından yavaş olmasıdır.

Bu anormalliklerden iskeletteki bütün kemikler eşit oranda etkilenmemektedir. En yaygın bozukluklar bacak kemikleri ile buradaki eklemlerle, torasik vertebralarda ortaya

çıkılmaktadır. Özellikle femur, tibiotarsus ve tarsometatarsus ile dördüncü torasik vertebra en fazla etkilenen kemiklerdir.

Doğal olarak ortaya çıkan bir bozukluk olduğu ilk olarak Leach ve Nesheim (1965) tarafından bildirilen TD, en fazla uzun kemikleri etkilemektedir (Rennie ve ark 1993). Bununla birlikte, genç broilerlerde, en hızlı büyüyen kemik olan tibiotarsus'ta (Pourus ve ark 1998) daha fazla görüldüğünden dolayı hastalık, tibial diskondroplazi (TD) olarak isimlendirilmiştir (Edwards ve Veltman 1983, Farquharson ve Jefferies 2000). Hastalık çoğunlukla tibiotarsusun büyümesine en çok katkıda bulunan proksimal büyüme plakasının genişlemesiyle karakterizedir (Farquharson 1999).

TD anormal bir kıkırdak gelişiminden kaynaklanmaktadır. TD lezyonu, mineralize olmayan, avasküler bir kıkırdak kütesinin büyüme plakasından metafize doğru yayılması şeklinde gözlenir (Leach ve Gay 1987). Lezyonun büyüklüğü, olgudan olguya değişiklik göstermekte ve küçük bir kıkırdak kütlesi olabileceği gibi metafize kadar uzayan bir kıkırdak kütlesi halinde de görülebilmektedir (Farquharson ve Jefferies 2000). Küçük lezyonlar subklinik seyrederken, geniş lezyonlar önemli kemik deformasyonları topallıklara neden olmaktadır (Lynch ve ark 1992).

TD' de oluşan hücresel defektin sebebi belli değildir. Bu konuda birçok hipotez ileri sürülmüştür. Haynes ve ark (1985), 3 hipotez ileri sürmüşlerdir. Bunların ilki; metafizyal damarlardaki bozukluğun sonucu olarak damarların büyüme plakasına invazyonlarında oluşan bozukluktur. İkincisi ise; kan damarları normal yapıya sahip olmalarına rağmen, büyüme plakasındaki anormal gelişim sonucu metafizeal damarların büyüme plakasına invaze olamamalarıdır. Üçüncü hipotez de; kıkırdak dokusunun, kondroklastlar tarafından yetersiz derecede rezorbe edilmesidir. Sonuçta, metafizeal damarlar büyüme plakasına invaze olamadığından, kıkırdak dokusunun yıkılarak yerini kemik dokusunun alması gecikmekte ve etkilenen hayvanlarda büyüme plakası genişlemektedir. Nitekim, Farquharson (1999) ile Farquharson ve Jefferies (2000), TD'nin vaskülarizasyonla mineralizasyonu başlatan ve terminal diferensiyasyon aşamasındaki kondrositlerin maturasyonunda oluşan bir aksamadan kaynaklandığını ileri sürmektedirler. TD lezyonunun histolojik görünümü, prehipertrofik kondrositlerin artışı sonucu ortaya çıkan tranzisyonel zondaki genişlemedir. Bu yüzden, lezyon bölgesinde bol miktarda, prehipertrofiye ve immatür kondrosit topluluklarına rastlanır. Bu anormal immatür kondrosit artışı, normal kondrosit farklılaşması ve



olgunlaşması sürecinde oluşan bir aksamadan kaynaklanmaktadır (Rennie ve ark 1993, Farquharson ve Jefferies 2000). Nitekim, normal büyüme plakasındaki kondrositlerin ortalama çapı 50 µm iken, TD lezyonundaki kondrositlerin çapı 20 µm' dir. Lezyon sahasındaki kondrositlerin çoğu nekrotik hücrelerdir (Hargest ve ark 1985, Farquharson ve Jefferies 2000). TD lezyonunun bu karakteristik yapısı, büyüme plakasındaki proliferatif ve hipertrofik zonların genişlemesiyle ortaya çıkan kalınlaşma ile karakterize olan hipokalsemik ve hipofosfatemik raşitizm lezyonlarından ayırmaktadır. Hipokalsemik raşitizmde proliferatif zondaki kondrositler rastgele dizilerek birikirlerken, hipofosfatemik raşitizmde hipertrofik zonun genişlemesi söz konusudur (Farquharson 1999, Farquharson ve Jefferies 2000).

Kondrosit olgunlaşmasında aksamaya yol açan ve henüz aydınlatılmamış olan problem, hastalığın etiyolojisinde primer etken olarak dikkate alınırken; vaskülarizasyondaki aksama ve mineralizasyon eksikliği, sekonder etken olarak kabul edilmektedir.

Otuz yıl önce önemsiz bir sağlık problemi olan TD, günümüzde broilerlerin en az %50'sini çeşitli derecelerde etkilemektedir (Leach ve Nesheim 1965). Leach ve Nesheim (1972), TD insidensinin, büyük oranda henüz identifiye edilememiş olan rasyon kaynaklı faktörlere bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Yüksek enerjili rasyonlar insidensi arttırmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar (Edwards ve Veltmann 1983, Edwards 1988), TD'nin insidensinin ve neden olduğu kayıpların broiler rasyonlarının ve beslenme programlarının modifikasyonu (örneğin erken dönemde yem kısıtlaması yoluyla büyümenin baskılanması) ile büyük ölçüde azaltılabileceğini göstermiştir. Ancak; ilginçtir ki, TD görülme sıklığı ile vücut ağırlığı arasında önemli bir genetik korelasyon bulunamamıştır (Farquharson 1999).

Rasyondaki Ca/P oranının düşük olmasının, TD'nin görülme sıklığını artırdığı, rasyona Ca<sup>+2</sup> ilavesinin ise TD'nin görülme sıklığını azalttığı bildirilmektedir (Edwards 1988). Hastalığın ortaya çıkışında rasyondaki bakır yetersizliğinin de önemli bir rolü olduğu bildirilmektedir. Bakır, kollagen moleküllerinin birbirleriyle çapraz bağlar kurmasında görev alan lizil oksidaz enziminin bir ko-faktörüdür. Rasyonda bakırın yetersiz oranda bulunması, söz konusu çapraz bağ oluşumunda aksamalara neden olacağı için TD'nin görülme sıklığı da artacaktır. Aynı şekilde sistein ve homosistein gibi gerek bakır yetersizliğine neden olan ve gerekse de lizil oksidaz enzimini inhibe eden maddeler de dolaylı yollardan, TD'nin görülme sıklığını artırmaktadır (Farquharson 1999).

Mikotoksinlerle kontamine olan yemlerle beslenen broiler piliçlerde de TD'nin görülme sıklığı artmaktadır. Lawler ve ark (1988) *Fusarium equiseti* ile kontamine olmuş yemlerle beslenen civcivlerin çoğunda bilateral TD'nin spontan olarak geliştiğini bildirmektedir. Bu etkinin sorumlusu olarak *F. equiseti*'nin toksik metaboliti olan fusarokromanone gösterilmektedir. Bu maddenin TD'yi indüklenme mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen, immün cevapta neden olduğu düşüşle ya da mineral dengesinde neden olduğu bozuklukla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Çünkü rasyonda bakır ve çinko düzeylerinin artırılması, yemdeki fusarokromanonun neden olduğu TD insidensini azaltmaktadır (Walser ve ark 1982, Haynes ve ark 1985, Lawler ve ark 1988, Rennie ve ark 1993, Farquharson 1999).

Vit. D metabolitlerinin rasyona ilavesi de TD'nin görülme sıklığını azaltmaktadır. Vit. D'nin aktif metaboliti olan 1,25- dihidroksikolekalsiferol'ün TD'yi tamamen önleyebileceği, 25-hidroksikolekalsiferol'ün ise TD'nin insidensini azaltabileceği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Newbrey ve ark 1988, Farquharson 1999, Rennie ve ark 1993, Farquharson ve Jefferies 2000).

TD'nin kalıtsal olduğu yönünde güçlü kanıtlar bulunduğundan, genetik seleksiyon ile hastalığa dirençli hatların geliştirilmesine de çalışılmaktadır (Farquharson 1999).

Büyüme plakasını oluşturan zonlardaki kondrositlerin aşama aşama diferansiye oldukları ve programlı hücre ölümü ile yıkımlandıkları açıktır (Erenpreisa ve Roach 1999, Orth 1999). Hücre diferansiyasyonunu aksatan herhangi bir faktör, bu zonların kalınlaşmasına yol açabilir. Düşük dozda yumurtaya verilen AFB<sub>1</sub>'in neden olduğu spesifik bir embriyonik disk anomalisinin, AFB<sub>1</sub>'in hücre diferansiyasyonu üzerindeki etkisine bağlı olarak ortaya çıkabileceği ileri sürülmüştür (Çelik ve ark 2000a, Sur ve Çelik 2003). AFB<sub>1</sub>'in büyüme plakasındaki kondrosit diferansiyasyonu üzerindeki etkileri hakkındaki bilgiler ise oldukça sınırlıdır.

Bu çalışmada, dömlü tavuk yumurtasına farklı dozlarda verilen AFB<sub>1</sub>'in, broilerlerin tibialarının proksimal ve distal büyüme plakaları ile orta hattının embriyonik dönemdeki gelişimi üzerindeki etkilerinin, histolojik ve histometrik çalışmalarla belirlenmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda, kuluçkadan çıkışın ilk günü ile çıkışı takip eden ilk iki haftada alınan kemik dokusu örnekleri de incelenerek kuluçkadan çıkıştan sonraki tibia gelişimi de

incelenmiştir. Bunlara ilave olarak, AFB<sub>1</sub>'in neden olduğu embriyonik ölüm oranları ve oluşan yapısal kusurlarla, rölatif embriyo ağırlıkları üzerindeki etkileri de belirlenmiştir.



### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Yumurta materyali:

Bu amaçla, yemlerinde düzenli olarak aflatoksin kontrolleri yapılan ve ölçülebilir düzeyde (<1 ppb) aflatoksin içermeyen yemle beslenen *Hubboard* ırkı broiler damızlıklara ait toplam 1024 adet kuluçkalık yumurta kullanıldı.

##### 3.1.2. Aflatoksin B<sub>1</sub>:

Çalışmada, kristalize haldeki saf aflatoksin B<sub>1</sub> standardı (Makor Chemical Co., Jerussalem, Israel) kullanıldı.

#### 3.2. Metot

##### 3.2.1. Aflatoksin B<sub>1</sub> solüsyonlarının hazırlanması

Kristalize haldeki saf aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) standardı, benzen içinde çözdürülmek suretiyle 20 µg/ml konsantrasyonunda AFB<sub>1</sub> içeren stok solüsyon hazırlandı. Bu solüsyondan çalışmada kullanılacak olan her bir konsantrasyon grubu için gerekli olan AFB<sub>1</sub>'i içeren miktarlarda farklı tüplere aktararak; karanlıkta bekletildi ve benzenin tamamen uçması sağlandı. AFB<sub>1</sub> içeren tüplere önceden belirlenen miktarlarda %99.9'luk etil alkol ilave edilerek AFB<sub>1</sub>'in tamamen çözünmesi sağlandı. Takiben etil alkol konsantrasyonunu %30'a düşürmek amacıyla, solüsyonlara steril bidistile su ilavesi yapılarak; enjekte edilen 20 µl hacmindeki çözeltide istenilen konsantrasyonlarda AFB<sub>1</sub> içeren çalışma solüsyonları hazırlandı. Bu solüsyonların, istenilen konsantrasyonlarda AFB<sub>1</sub> içerip içermedikleri, standart alüminyum plakalar (Merck) kullanılmak suretiyle İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Chromotography, TLC) ve Floresans Spektrofotometre (Camag II. Basel, Switzerland; emisyon dalga boyu 425 nm, eksitasyon dalga boyu 365 nm) ile kontrol edildi. Çalışma solüsyonları bulunan tüpler alüminyum folyo ile sarılarak, kullanılıncaya kadar buzdolabında +4 °C'de muhafaza edildi.

##### 3.2.2. Deney gruplarının oluşturulması ve AFB<sub>1</sub> solüsyonlarının yumurtalara verilmesi

Bu amaçla yumurtalar 10 gruba ayrıldı. Yumurtaya enjekte edilen AFB<sub>1</sub> miktarları ve içerdikleri yumurta adetleri aşağıdaki tabloda (Tablo 3.1) görülmektedir.

**Tablo 3.1:** Çalışmada oluşturulan gruplar ve bu gruplardaki yumurtalara uygulanan işlemler.

Gruplar	Yumurtalara uygulanan işlem
Kontrol, n=74	Hiçbir işlem uygulanmadı.
Delinip-kapatılan, n=75	Delinip-kapatıldı.
Solvent, n=85	20 µl hacminde %30 ETOH solüsyonu enjekte edildi.
2.5 ng AFB <sub>1</sub> , n=90	20 µl hacminde %30'luk ETOH içerisinde çözdürülen 2.5 ng AFB <sub>1</sub> enjekte edildi.
5 ng AFB <sub>1</sub> , n=95	20 µl hacminde %30'luk ETOH içerisinde çözdürülen 5 ng AFB <sub>1</sub> enjekte edildi.
7.5 ng AFB <sub>1</sub> , n=95	20 µl hacminde %30'luk ETOH içerisinde çözdürülen 7.5 ng AFB <sub>1</sub> enjekte edildi.
10 ng AFB <sub>1</sub> , n=100	20 µl hacminde %30'luk ETOH içerisinde çözdürülen 10 ng AFB <sub>1</sub> enjekte edildi.
15 ng AFB <sub>1</sub> , n=110	20 µl hacminde %30'luk ETOH içerisinde çözdürülen 15 ng AFB <sub>1</sub> enjekte edildi.
17.5 ng AFB <sub>1</sub> , n=150	20 µl hacminde %30'luk ETOH içerisinde çözdürülen 17.5 ng AFB <sub>1</sub> enjekte edildi.
20 ng AFB <sub>1</sub> , n=150	20 µl hacminde %30'luk ETOH içerisinde çözdürülen 20 ng AFB <sub>1</sub> enjekte edildi.

Enjeksiyon işlemlerinden önce tüm yumurtalar hassas terazi (Sartorius, PT 120) ile tartıldı ve takiben küt uçları %96'lık etil alkolle dezenfekte edildi. Tüm enjeksiyonlar hava kamarası yoluyla ve kuluçka başlangıcında gerçekleştirildi. Delikler özel yumurta delicisi ile açıldı ve enjeksiyonu takiben hemen sıvı parafinle kapatıldı. Enjeksiyonlar steril uçlu mikropipetle (Sealpette, Jencons, Finland) gerçekleştirildi. Kuluçka işlemleri, S.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki 1000 yumurta kapasiteli kuluçka makinesinde (Gostyn, Poland), optimal koşullarda (37.8°C sıcaklık ve % 60-84 nispi nem) gerçekleştirildi.

### 3.2.3. Yumurtaların açılması ve doku örneklerinin alınması

Büyüme plakasının embriyonik dönemdeki gelişim aşamalarını incelemek amacıyla kuluçkanın 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 ve 19. günlerinde, her gruptan 5'er adet yumurta açıldı. Hamburger-Hamilton (1951) skalası esas alınarak embriyoların gelişme evreleri belirlendi ve takiben embriyoların tümü hassas teraziyle tartıldı. Kemik dokusunun gelişimini incelemek amacıyla da kuluçkanın 11, 13, 15, 17 ve 19. günlerinde açılan embriyoların tibiaları alındı. Kemikler, yumuşak dokuları uzaklaştırıldıktan sonra hassas teraziyle tartıldılar. Dijital kumpasla (Electronic Digital Caliper, 0-150 mm/6") boy ve kalınlıkları üç farklı bölgede

(proximal bölge, orta hat ve distal bölge) ölçüldü. Daha erken dönemlerde (5, 7 ve 9.günler) açılan yumurtalardan elde edilen embriyolar ise, kemiğin çok küçük olması nedeniyle total olarak tespit edildi ve takiben % 0.1 Alizarin Red-S ile boyandı (Stevens 1990). Boyanan embriyoların tibia boyları Stereo mikroskopta, çizgisel oküler mikrometreyle ölçüldü.

Kuluçkadan çıkışın ilk gününde, her gruptan 5'er ve kuluçkadan çıkışı takip eden 1. hafta ile 2. hafta sonunda da her gruptan 3'er hayvanın tibiaları alındı. Kemikler, yumuşak dokular uzaklaştırıldıktan sonra hassas terazide tartıldı ve dijital kumpas ile boyları ve kalınlıkları üç farklı bölgede (proximal bölge, orta hat ve distal bölge) belirlendi.

Genel histolojik yapının belirlenmesi amacıyla; alınan kemik dokusu örnekleri, fosfat tamponlu (0.1 M, pH: 7.4) formol solüsyonunda tespit edildikten sonra % 5'lik nitrik asit solüsyonunda dekalsifiye edildi. Doku örnekleri; bilinen histolojik yöntemlerle yıkama, dehidrasyon ve parlatma işlemlerini takiben parafinde bloklandı. Bloklardan alınan 6 µm kalınlığındaki kesitler Crossmon'un üçlü boyası (Culling ve ark 1985), hematoksilin-eozin (Culling ve ark 1985), Schmorl'un pikro-tiyonin metodu (Stevens ve ark 1990), Alizarin red-S (Stevens 1990) ve von Kossa (Stevens ve ark 1990) metotlarıyla boyandı.

Hazırlanan preparatlar Leitz Laborlux-12 model araştırma mikroskobunda incelenerek, büyüme plakasındaki zonların genişlikleri, iki lateral taraf ve bir orta hat olmak üzere üç ayrı bölgede çizgi oküler mikrometre ile ölçüldü. Gerekli görülen bölgelerin fotoğrafları, DS-5M dijital kamera ve DS-L1 kamera kontrol ünitesiyle donatılan Nikon E-400 model mikroskopla çekildi.

#### **3.2.4. İstatistiksel analizler**

Grupların embriyonik mortalitelerinin hesaplanmasında gruptaki fertil yumurta sayıları esas alındı. Embriyonik mortalite verilerinin değerlendirilmesinde khi-kare testi uygulanırken, rölatif civciv ağırlıkları ile tibiadan elde edilen sayısal veriler One-Way Anova istatistik yöntemi ile (SPSS 8.0, 1997) analiz edilerek gruplar arası farkların önem dereceleri belirlendi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Embriyonik Ölüm Oranları

Çalışmada tespit edilen infertilite ve mortalite değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir. Tabloda da görüldüğü gibi çalışmada kullanılan 1024 adet yumurtanın 965 adedi fertil olup, ortalama infertilite oranı % 5.76 olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubunda mortalite % 2.85 iken, yumurtaların delinip-kapatıldığı grupta bu değer % 11.11 olarak bulunmuştur (Tablo 4.1). Solvent grubunun mortalitesi % 16.86 olarak hesaplanmıştır. Tablo 4.1'de görüldüğü gibi aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) verilen grupların mortaliteleri, doza bağlı olarak düzenli bir artış göstermekte ve kontrol grupların mortalite değerleri ile karşılaştırıldığında önemli derecede ( $P<0.05$ ) yüksek oldukları dikkati çekmektedir. Bu değerler, 2.5 ng, 5 ng, 7.5 ng, 10 ng, 15 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta gruplarında sırasıyla % 21.68, % 23.65, % 28.08, % 31.52, % 45.19 olarak hesaplanmıştır. Özellikle, 17.5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta ve 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta verilen grupların mortaliteleri (sırasıyla % 60.28 ve % 65.21) diğer gruplarınkilerden oldukça yüksektir ( $P<0.05$ , Grafik 4.1).

Kontrol, delinip-kapatılan ve solvent grubunda embriyonik gelişim Hamburger-Hamilton (1951) (H-H) skalasına uygun bir seyir izlediği halde; AFB<sub>1</sub> gruplarında, doza bağlı olarak artan oranlarda embriyonik gelişme geriliği ve farklı yapısal anomaliler ortaya çıkmıştır (Şekil 1 ve 2). Bu anomali tipleri arasında genel gelişme geriliği yanında makas gaga ve ünilateral anoftalmi en sık rastlanan anomali tipleriydi (Şekil 3).

AFB<sub>1</sub> gruplarından; 2.5 ng, 5 ng, 7.5 ng ve 10 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta gruplarındaki embriyonik ölümler, çoğunlukla kuluçkanın ilk 7 gününde (HH-31'e kadar) yoğunlaştığı halde; 15 ng, 17.5 ng ve 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta gruplarındaki embriyonik ölümlerin daha erken dönemlerde ve özellikle de ilk 4.5 günde (HH-25'ten önce) gerçekleştiği dikkati çekti (Grafik 4.2).

### 4.2. Rölatif Embriyo Ağırlıkları

Kontrol ve deney gruplarındaki embriyoların ortalama rölatif canlı ağırlıklarının kuluçka günlerine göre dağılımları grafik 4.3'de verilmiştir. AFB<sub>1</sub> gruplarındaki embriyonik

gelişimin oldukça baskılanmış olduğu (Şekil 1 ve 2) ve bu grupların rölatif ağırlıklarının, verilen AFB<sub>1</sub>'in dozuna bağlı olarak belirgin bir şekilde düştüğü görüldü (Tablo 4.2, Grafik 4.3).

Kuluçkanın beşinci günündeki ortalama rölatif embriyo ağırlıkları, özellikle 10 ng, 15 ng, 17.5 ng ve 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta gruplarında, kontrol ve diğer gruplarınkilerden önemli derecede ( $P<0,05$ , Tablo 4.2) düşük bulundu.

Kuluçkanın yedinci gününde ise, 17.5 ng ve 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta gruplarının ortalama rölatif embriyo ağırlıkları; kontrol, delinip-kapatılan, solvent ve diğer gruplarınkilerden önemli derecede ( $P<0.05$ ) düşüktü (Tablo 4.2).

Kuluçkanın dokuzuncu gününde de deney gruplarının ortalama rölatif embriyo ağırlıkları; kontrol, delinip-kapatılan ve solvent gruplarınkilerden daha düşük olup; grupların ortalama değerleri arasındaki farklar istatistiksel öneme ( $P<0.05$ ) sahipti (Tablo 4.2).

Kuluçkanın on birinci gününde ise, 10 ng ve daha yüksek dozlarda AFB<sub>1</sub> verilen grupların ortalama rölatif embriyo ağırlıkları; kontrol, delinip-kapatılan, solvent ve diğer AFB<sub>1</sub> gruplarınkilerden önemli derecede ( $P<0.05$ ) düşük bulundu (Tablo 4.2).

Kuluçkanın on üçüncü gününde, deney gruplarının ortalama rölatif embriyo ağırlıkları; kontrol, delinip-kapatılan ve solvent gruplarınkilerden önemli derecede ( $P<0.05$ ) düşüktü (Tablo 4.2).

Kuluçkanın 15, 17 ve 19. günlerinde, AFB<sub>1</sub> verilen grupların ortalama rölatif embriyo ağırlıklarıyla, kontrol, delinip-kapatılan ve solvent gruplarınkiler arasında önemli farklar ( $P<0.05$ ) tespit edildi (Tablo 4.2). Bu dönemlerde de deney gruplarının rölatif embriyo ağırlıkları daha düşüktü.

Kuluçkadan çıkışın ilk gününde, AFB<sub>1</sub> verilen grupların ortalama canlı ağırlıkları 7.5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubundan itibaren kontrol, delinip-kapatılan ve solvent gruplarınkilerden önemli derecede ( $P<0.05$ ) düşüktü (Tablo 4.2).



Kuluçkadan çıkışı takibeden 1. haftada, 10 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta ve daha yüksek dozlarda AFB<sub>1</sub> verilen grupların ortalama canlı ağırlıkları, kontrol, delinip-kapatılan ve solvent gruplarınıninkilerden önemli derecede ( $P<0.05$ ) düşük okduğu halde (Tablo 4.6), kuluçkadan çıkışı takip eden 2. haftada grupların ortalama canlı ağırlıkları arasındaki farklar istatistiksel öneme sahip değildi ( $P>0.05$ , Tablo 4.6). Bununla birlikte; düşük dozda AFB<sub>1</sub> verilen gruplardan yüksek dozlara doğru gidildikçe, grupların canlı ağırlık ortalamalarında dikkati çeken düşüşler gözlemlendi.

### 4.3. Tibia'dan Elde Edilen Bulgular

Kontrol ve deney gruplarının embriyonik dönemdeki tibia uzunlukları ve tibia ağırlıkları grafik 4.4 ve 4.5' te gösterilmiştir. Sonuçlar, AFB<sub>1</sub> verilen gruplarda tibia uzunluğu ile ağırlığının önemli derecede düşük olması yanında, iskelet sisteminin genel gelişiminin de baskılanmış olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4, 5, 6 ve 7). Bu bulguları rölatif embriyo ağırlıklarındaki önemli düşüşler de desteklemektedir.

Kuluçkanın 9 ve 11. günlerinde, AFB<sub>1</sub> gruplarının tibia uzunlukları; kontrol, delinip-kapatılan ve solvent gruplarınıninkinden önemli derecede ( $P<0.05$ ) daha düşük bulundu (Tablo 4.3). On birinci günde, AFB<sub>1</sub> gruplarının tibia ağırlıkları da kontrol gruplarından önemli derecede ( $P<0.05$ , Tablo 4.4) daha düşüktü.

Kuluçkanın on üçüncü gününde 5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubundan itibaren grupların tibia uzunlukları önemli derecede ( $P<0.05$ ) düşük iken (Tablo 4.3); tibia ağırlıkları 17.5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubundan itibaren önemli derecede ( $P<0.05$ , Tablo 4.4) azalmıştı. Bu dönemde tibia'nın proksimal bölgesi, orta hattı ve distal bölgesinin kalınlıkları, 10 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubundan itibaren diğer gruplara göre önemli derecede azalmıştı ( $P<0.05$ , Tablo 4.5).

On beşinci günde, AFB<sub>1</sub> verilen grupların tibia uzunlukları ile tibia ağırlıkları kontrol, delinip-kapatılan ve solvent gruplarınıninkilerden önemli derecede ( $P<0.05$ ) daha düşüktü (Tablo 4.3, 4.4). Tibia'nın proksimal bölgesi, orta hattı ve distal bölgesinin kalınlıkları 10 ng

AFB<sub>1</sub>/yumurta grubundan itibaren diğer gruplara göre önemli derecede ( $P<0.05$ , Tablo 4.5) düşük bulundu.

Kuluçkanın on yedinci gününde, ortalama tibia uzunlukları 15 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubundan itibaren daha yüksek AFB<sub>1</sub> dozlarında diğer gruplarinkilerden önemli derecede düşük olduğu halde ( $P<0.05$ , Tablo 4.3), ortalama tibia ağırlıkları 7.5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubundan itibaren önemli derecede ( $P<0.05$ , Tablo 4.4) düşüktü. Bu dönemde tibia'nın proksimal bölge kalınlığı 17,5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubundan itibaren, orta hat ve distal bölge kalınlıkları ise 15 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubundan itibaren diğer gruplara göre önemli derecede ( $P<0.05$ , Tablo 4.5) azalmıştı.

Kuluçkanın 19. gününde, 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubunun ortalama tibia uzunluğu diğer gruplarinkilerden önemli derecede ( $P<0.05$ , Tablo 4.3) daha düşükken; AFB<sub>1</sub> verilen grupların ortalama tibia ağırlıkları önemli derecede ( $P<0.05$ , Tablo 4.4) azalmış durumdaydı. Tibia'nın orta hattı ile distal bölgeleri AFB<sub>1</sub> gruplarının tamamında önemli derecede ( $P<0.05$ , Tablo 4.5) incelmışti. Tibia'nın proksimal bölge kalınlıkları ise kontrol ve deney gruplarında birbirlerine oldukça yakındı ( $P>0.05$ , Tablo 4.5).

Kuluçkadan çıkışın ilk gününde deney gruplarının ortalama tibia uzunlukları ve ağırlıkları ile proksimal ve distal bölgelerinin kalınlıkları, kontrol, delinip-kapatılan ve solvent gruplarinkilerden önemli derecede düşük bulundu ( $P<0.05$ , Tablo 4.3, 4.4, 4.5). Tibia'nın orta hattının genişliği ise 17,5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta dozundan daha yüksek doz gruplarında önemli derecede ( $P<0.05$ , Tablo 4.5) azalmıştı.

Kuluçkadan çıkıştan sonraki ilk iki haftada elde edilen histometrik verilerin istatistiksel analiz sonuçları, embriyonik dönemdeki sonuçlarla büyük benzerlik göstermekteydi. Tibia uzunlukları ve ağırlıkları 15 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubundan itibaren daha yüksek doz gruplarında önemli derecede ( $P<0.05$ , Tablo 4.7, 4.8) azalmış durumdaydı. Bununla birlikte, ilk haftada AFB<sub>1</sub> verilen gruplarda tibia'nın proksimal bölgesi, 15 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta ve 17,5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta gruplarında önemli derecede ( $P<0.05$ , Tablo 4.9)

daha ince iken, 2. haftada orta hat bölgesi 17,5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubunda diğer gruplara göre daha inceydi (P<0.05, Tablo 4.9).

#### 4.4. Tibia'nın Proksimal Büyüme Plakasında Yapılan Ölçüm Sonuçları

Kuluçkanın beşinci gününde, grupların tamamında tibia'nın kıkırdaktan oluştuğu ve Alizarin Red-S ile yapılan boyamalarda ossifikasyon odaklarının henüz şekillenmemiş olduğu gözlemlendi (Şekil 8).

Kuluçkanın yedinci günde, kontrol ve solvent grupları ile AFB<sub>1</sub> verilen gruplardan alınan embriyoların Alizarin Red-S ile yapılan boyamalarında, diafiz merkezinde zayıf bir ossifikasyon alanı gözlemlendi.

Dokuzuncu günde, Alizarin Red-S ile boyanan embriyolar üzerinde yapılan incelemelerde, önceki dönemdekinden biraz daha genişlemiş haldeki ossifikasyon sahası, kontrol ve solvent grupları ile deney gruplarının tamamında gözlemlendi (Şekil 9). Yapılan mikroskopik incelemelerde, kıkırdak modelin orta bölgesinde ve periosteum'un hemen altında başlayan manşon biçimindeki mineralizasyon sahası belirgin olarak izlendi (Şekil 10). Bölgenin hemen altında oldukça iri, hipertrofik kondrositlere rastlandı (Şekil 11). Bu dönemde kontrol ve solvent gruplarıyla deney gruplarının tibialarının histolojik yapıları arasında belirgin farklar gözlemlenmedi.

On birinci günde, tibia'nın histolojik kesitleri üzerinde yapılan incelemelerde, manşon biçimindeki mineralize sahadan kıkırdağa doğru vasküler invazyonun başlamış olduğu tespit edildi. Sahanın merkezindeki kıkırdak dokusunun yıkımlanmaya başladığı ve bölgenin ilik dokusuyla doldurulmaya başladığı dikkati çekti (Şekil 12). Tibia'nın distal ve proksimal bölümlerindeki koni biçiminde ve hipertrofik kondrositlerden oluşan kıkırdak kütleleri belirgin durumdaydı (Şekil 13). Önceki dönemle karşılaştırıldığında; bu dönemde, daha önce şekillenmiş olan kemik trabeküllerinin genişledikleri, mineralizasyonlarının artmış ve birbirlerine paralel tarzda tertiplendikleri gözlemlendi (Şekil 14). Kontrol ve solvent gruplarıyla deney gruplarının tibialarının histolojik yapıları arasında bu dönemde de belirgin farklar gözlemlenmedi. Ancak; Alizarin Red-S ile boyanan tibia örneklerinde deney gruplarındaki

iskelet sistemi, gelişimdeki gerilemeye bağlı olarak; önemli ölçüde etkilenmiş ve tibialar belirgin biçimde kısalmış gözükmekteydi (Şekil 15 ve 16).

On üçüncü günde, tibia'daki primer kemik dokusu sahasının genişlemiş olduğu ve trabeküller arasında gelişmiş bir kan damarları ağının bulunduğu dikkati çekti. Diyafiz boyunca şekillenmiş olan ilik boşluğu, ilik dokusuyla doldurulmuş durumdaydı (Şekil 17). Koni biçimindeki kıkırdak kitlesi bu dönemde de varlığını sürdürmekteydi. Kıkırdak kitlesine az sayıda kan damarının invaze olduğu dikkati çekti (Şekil 18). Primer kemik dokusu trabekülleriyle kıkırdak kitlesinin yüzeylerinde oldukça yoğun bir osteoblastik aktiviteye rastlandı (Şekil 19). Bu dönemde ve sonraki gelişme dönemlerinde, büyüme plakasını şekillendirecek olan koni biçimli kıkırdak kitlesindeki kondrosit zonları oldukça belirgin durumdaydı (Şekil 20 ve 21). Bu dönemde, deney gruplarının proliferatif zonlarının, kontrol gruplarınıninkilerle karşılaştırıldığında önemli derecede ( $P<0.05$ , Tablo 4.10) daralmış olduğu ve AFB<sub>1</sub>'in dozundaki artışla birlikte, bu zonun daha da incelmesi dikkati çekti. Tranzisyonel zon ise 17.5 ve 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta gruplarında; kontrol, delinip-kapatılan ve solvent grupları ile diğer AFB<sub>1</sub> gruplarından daha genişti ( $P<0.05$ , Tablo 4.10). Grupların büyüme plakalarının hipertrofik zon genişliklerinin ise birbirlerine oldukça yakın ( $P>0.05$ , Tablo 4.10) olduğu belirlendi.

Onbeşinci gündeki kemikleşme, önceki dönemdekinden daha ileri safhada olup, kemik dokusu periost ile kıkırdak kitlesi arasında daha fazla yayılmış durumdaydı. Bütünlüğü bozulmamış olan koni biçimli kıkırdak kitlesi içinde daha fazla sayıda kan damarı kesitine rastlandı (Şekil 22). Primer kemik dokusu özelliğindeki trabeküllerin yüzeylerinde yoğun bir osteoblastik aktivite gözlemlendi (Şekil 23). Büyüme plakasındaki kondrosit zonları bu dönemde daha belirgin durumdaydı (Şekil 24, 25 ve 26). Bu dönemde de kontrol ve deney gruplarının tibia'larının histolojik yapıları birbirlerine oldukça benzemekle birlikte; deney gruplarında, genel gelişme geriliğinin bir sonucu olarak, tibia'daki büyüme de geri durumdaydı. AFB<sub>1</sub> verilen grupların büyüme plakalarının özellikle proliferatif ve hipertrofik zonları, kontrol ve delinip-kapatılan gruplara göre önemli derecede ( $P<0.05$ ) incelmışken; sadece 20 ng/yumurta dozunda AFB<sub>1</sub> verilen grupta tranzisyonel zon, diğer gruplardan istatistiksel olarak önemli derecede ( $P<0.05$ ) daha genişti (Tablo 4.10).

On yedinci günde de periost ile kıkırdak kitlesi arasında yayılmış durumdaki kemik dokusu, primer kemik özelliğindedir. Kıkırdağa daha fazla sayıda kan damarı penetre olmuştur (Şekil 27). Bu dönemde koni biçimli kıkırdak kütlelerinin bütünlükleri bozulmamıştır (Şekil 28). Kemik iliği, diyafizden metafize doğru genişlemiş durumdaydı (Şekil 29). Bu dönemde, kontrol ve solvent grupları ile deney gruplarının tibia'larının histolojik yapıları arasında önemli farklar tespit edilmedi. Büyüme plakasında yapılan ölçüm sonuçları; 15 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta ve bunun üzerindeki dozlarda AFB<sub>1</sub> verilen grupların proliferatif zonlarının önemli derecede ( $P<0.05$ , Tablo 4.10) incelmış olduğunu ortaya koydu. Buna karşın, 17.5 ng ve 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta gruplarının tranzisyonel zonlarında ise diğer gruplarla karşılaştırıldığında belirgin bir genişleme dikkati çekti ( $P<0.05$ , Tablo 4.10). Hipertrofik zonda ise 7.5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubundan itibaren önemli daralma tespit edildi ( $P<0.05$ , Tablo 4.10).

Kuluçkanın on dokuzuncu gününde, tibiada daha önce şekillenmiş olan primer kemik dokusunun yerini yer yer lamelli tipte sekonder kemik dokusunun aldığı tespit edildi (Şekil 30 ve 31). Kemik yapımı devam ederken, aynı hızda da kemik yıkımı olayları sürmekteydi (Şekil 32). Hem metafiz ve hem de epifizdeki vaskülarizasyon belirgindi (Şekil 33). Büyüme plakasında yapılan ölçüm sonuçları; proliferatif zon genişliğinin, kontrol grubundan itibaren diğer gruplarda önemli derecede daraldığını ( $P<0.05$ , Tablo 4.10) ortaya koymaktadır. Tranzisyonel zon genişliği ise 10 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubundan itibaren diğer deney gruplarının tamamında önemli derecede ( $P<0.05$ , Tablo 4.10) genişlediği halde, hipertrofik zon 17.5 ng ve 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta gruplarında önemli derecede daralmış durumdaydı ( $P<0.05$ , Tablo 4.10).

Kuluçkadan çıkışın ilk gününde, daha önce şekillenen kemik dokusu, hemen hemen tamamen sekonder kemik özelliği göstermekteydi (Şekil 34). Bir taraftan kemik yapımı sürerken, diğer yandan da yıkım işlemi gerçekleştiğinden, kesitlerde yer yer primer ve sekonder kemik dokusu alanlarına birlikte rastlandı (Şekil 35). Bu dönemde, koni şeklindeki kıkırdak kütleleri de ileri derecede yıkılmış durumdaydı (Şekil 36). Embriyonik dönemde gözlenmeyen rezerv zon ilk kez bu dönemde belirgin biçimde ayırt edildi (Şekil 37). Metafiz ve epifizin vaskülarizasyonu önceki dönemle karşılaştırıldığında daha da ilerlemiş durumdaydı. Büyüme plakasında yapılan ölçüm sonuçları; rezerv ve proliferatif zonun kontrol ve delinip-kapatılan gruplardan itibaren tüm deney gruplarında önemli derecede ( $P<0.05$ ,

Tablo 4.10) daraldığını, tranzisyonel zonun özellikle 20 ng AFB<sub>1</sub> /yumurta grubunda diğer gruplardan önemli derecede genişlemiş olduğunu (P<0.05, Tablo 4.10), hipertrofik zonun ise 10 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubundan itibaren tüm deney gruplarında önemli derecede incelmış olduğunu (P<0.05, Tablo 4.10) ortaya koymaktadır.

Kuluçkadan çıkıştan sonraki ilk haftada, epifiz ve metafizdeki damar invazyonunun daha da ilerlemiş olduğu; metafizeal damarların, tranzisyonel zon ile hipertrofik zonun birleşme hattına kadar penetre oldukları dikkati çekti (Şekil 38). Epifizdeki vaskülarizasyon da oldukça ilerlemiş durumdaydı. Kıkırdak dokusunun rezorpsiyonu devam ettiğinden, bölgede yer yer primer kemik dokusu odaklarına da rastlanmakla (Şekil 39) birlikte; sekonder kemik dokusu oldukça iyi gelişmiş durumdaydı (Şekil 40). Bu dönemde, büyüme plakasında yapılan ölçüm sonuçları; rezerv ve proliferatif zonun AFB<sub>1</sub> verilen gruplarda kontrol ve delinip-kapatılan gruba göre önemli derecede daraldığı (P<0.05, Tablo 4.11), tranzisyonel zonun ise AFB<sub>1</sub> verilen gruplarda önemli derecede (P<0.05, Tablo 4.11) genişlediği dikkati çekti.

Kuluçkadan çıkışı takip eden ikinci haftada, önceki dönemler boyunca tibianın proksimal ve distal uçlarında gözlenen koni biçimli kıkırdak tamamen yıkılmış durumdaydı. Metafiz vaskülarizasyonu bu dönemde daha da ilerlemiş gözükmekteydi (Şekil 41). Diyafiz tamamen paralel yerleşimli sekonder kemik trabeküllerinden oluşmaktaydı (Şekil 42). Büyüme plakası üzerinde yapılan ölçüm sonuçları; rezerv zon ve proliferatif zonun tüm deney gruplarında, kontrol grubuna göre önemli derecede (P<0.05, Tablo 4.11) daraldığını, tranzisyonel zonun ise 2.5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubundan itibaren önemli derecede (P<0.05, Tablo 4.11) genişlediğini göstermekteydi.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

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

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

Tarım, Orman ve Köy İşleri Bakanlığı'nın konuyla ilgili tebliği (1997) ile ülkemizde karma yemlerde bulunmasına izin verilen total aflatoksin düzeyinin 50 µg/kg (50 ppb) yem ve AFB<sub>1</sub> düzeyinin de 20 µg/kg yem (20 ppb) olduğu dikkate alınarak; bu düzeylerde AFB<sub>1</sub> ve total aflatoksinle kontamine olan yemden günde 130 gr tüketerek gün aşırı yumurtladığı varsayılan bir tavuğun yumurtasında, yumurtaya geçiş oranı 1/2000 olarak kabul edilmek suretiyle yapılan hesaplama sonuçları, yumurtada bulunması muhtemel olan toplam AF düzeyinin de 6.5 ng/yumurta olduğunu göstermektedir (Hamilton 1982, Çelik ve ark 2000a). Ayrıca, doğal aflatoksinlerin %87.4'ünün AFB<sub>1</sub> (Oğuz 1997) olduğu dikkate alındığında müsaade edilen 50 ppb'lik total AF düzeyi, yumurtaya muhtemelen 5.68 ng AFB<sub>1</sub>'in geçmesine neden olacaktır. Eğer yemde bulunmasına müsaade edilen AFB<sub>1</sub> düzeyi olan 20 µg/kg yem (20 ppb) dikkate alınılırsa, yukarıdaki şartlarda yem yiyen ve yumurtlayan bir tavuğun yumurtasında ise 2.6 ng AFB<sub>1</sub> bulunacaktır.

Broiler yemlerinde yapılan tarama sonuçları (Kaya ve ark 1990, Nizamlioğlu 1996, Oğuz ve Kurtoğlu 2000), AF düzeyinin 5-100 µg/kg yem (5-100 ppb) arasında değiştiğini, çoğunlukla da 50 µg/kg'ın (50 ppb) altında olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, AF'in

hayvansal dokular ve hayvansal kökenli gıda maddeleriyle, insanlara kümülatif tarzda geçtiği düşünüldüğünde; pratikte bu seviyelerin bile insan sağlığı açısından önem arz edebileceği ortaya çıkmaktadır. Nitekim yapılan bir tarama çalışmasında (Tuncer 1987) Ankara'da tüketime sunulan yumurta örneklerinde 120 ng/yumurta düzeyine ulaşan AFB<sub>1</sub> tespit edilmiştir. Yumurtaya geçen aflatoksinlerin büyük çoğunluğunu AFB<sub>1</sub>'in aktif metabolitlerinin oluşturduğu dikkate alındığında, olayın ciddiyeti artmaktadır.

Jelinek ve ark'nın (1985), Tavuk Embriyotoksisite Testi-I (Chicken Embryotoxicity Screening Test-I, CHEST-I) ile total aflatoksin için tavuk embriyolarında belirlemiş oldukları embriyotoksik doz sınırları 0,3-30 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta iken, teratojenik doz sınırı 3-30 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta'dır. Bu sonuçlar, yemlerde bulunmasına izin verilen düzeylerde bile, yumurtada embriyotoksik düzeyde AF bulunabileceğini göstermektedir. Yukarıda bildirilen embriyotoksik ve teratojenik doz sınırları arasında tespit edilen mortalite %33, kalp anomalisi oranı %12 ve vücut duvarı anomalisi oranı ise %4 olarak tespit edilmiştir (Jelinek ve ark 1985).

Bu çalışmada da 7 farklı AFB<sub>1</sub> dozu uygulanmış olup, AFB<sub>1</sub> dozundaki artışa paralel olarak embriyonik mortalitenin de arttığı tespit edilmiştir (Tablo 4.1). Kontrol ve delinip-kapatılan grupla, deney gruplarının mortaliteleri arasında farklar önemli ( $P < 0.05$ ) iken; %30 ETOH, 2.5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta, 5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta ve 7.5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta gruplarının mortaliteleri arasındaki farklar önemsizdir ( $P > 0.05$ ). Deney gruplarından; 15 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta verilen grupla 17.5 ve 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta gruplarının mortaliteleri arasındaki farkın önemli olduğu ( $P < 0.05$ ) halde, 17.5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuyla 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta gruplarının mortaliteleri arasındaki farkın önemsiz ( $P > 0.05$ ) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.1). Solvent grubunun mortalitesi %16,86 olup; Çelik ve ark (2000a)'nın bildirdikleri değerden (%11,11) yüksek olmakla birlikte; Prelusky ve ark (1987)'nin bildirdiği %20.8'lik mortalite ile Sur ve Çelik (2003)'in bildirdiği %20.25'lik değerlerin arasındadır. Bu sonuçlar, yumurtaya verilen AFB<sub>1</sub>'in embriyotoksisitesinin doza bağımlı olarak arttığını bildiren araştırmacıların (Dietert ve ark 1985, Prelusky ve ark 1987, Nekdon Ortiz ve Qureshi 1992b, Kärenlampi 1987) sonuçlarıyla uyumludur. Delinip-kapatılan grubun mortalitesi %11,11 iken, kontrol grubunun mortalitesi %2,85 olarak bulunmuş olup, bu iki grubun mortaliteleri arasındaki fark istatistiksel öneme sahip değildir ( $P > 0.05$ , Tablo 4.1). Sur (2001) ise, delinip-



kapatılan grubun mortalitesini %7,89 olarak tespit etmiş ve kontrol grubu ile arasındaki farkın önemli ( $P<0.05$ ) olduğunu bildirmiştir.

Tavuk embriyoları üzerinde yapılan embriyotoksisite çalışmasıyla (CHEST), farklı maddelerin embriyotoksik doz sınırlarıyla oluşturdukları teratojenik etkiler hakkında, hem kalitatif ve hem de kantitatif veriler elde edilmektedir (Jelinek ve ark 1985, Kemper ve Luepke 1986). Eğer toksikolojik doz sınırlarının belirlenmesi amaçlanıyorsa, çok erken embriyonik dönemdeki enjeksiyonlar tercih edilmekte; eğer teratolojik etki tipleri belirlenecekse, karaciğer ve böbreklerin gelişmelerini tamamladıkları daha geç dönemler tercih edilmektedir (Kemper ve Luepke 1986). Bu nedenle, Jelinek ve ark (1985) iki aşamalı tavuk embriyotoksisite testi (CHEST I, ve II) geliştirmişlerdir. Bu testin ilk bölümünde (CHEST-I), söz konusu maddenin metabolize olmamış haldeki embriyotoksik doz sınırları, o maddenin geometrik dizi halinde hazırlanan konsantrasyonları, erken dönemde dömlü yumurtalara verilmek suretiyle belirlenmektedir. CHEST-II'de ise, CHEST-I ile embriyotoksik doz sınırları saptanan bir maddenin teratojenik etkileri belirlenmektedir ve bu ikinci test CHEST-I'i tamamlamaktadır. Bu çalışmada, AFB<sub>1</sub>'in metabolize olmamış, yani doğal (intact, native) formunun embriyotoksisitesi ve tibiaanın gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlandığından, inkübasyon öncesi dönemde yapılan enjeksiyon tercih edildi. Bu enjeksiyon döneminde belirlenen mortalite ve embriyonik ölümlerin, Hamburger-Hamilton (1951) skalasına göre dağılımları, önceki araştırmacıların (Verret ve ark 1964, Çelik ve ark 2000a, Sur ve Çelik 2003) sonuçlarıyla uyumludur. Verret ve ark (1964), inkübasyon öncesi yapılan AFB<sub>1</sub> enjeksiyonunun maximum mortaliteye neden olduğunu ve ölümlerin ilk 8 günde yoğunlaştığını ileri sürmekle birlikte; Çelik ve ark (2000a) ile Sur ve Çelik (2003) ölümlerin inkübasyonun ilk 7 günü içerisinde yoğunlaştığına dikkati çekmişlerdir. Bu çalışmada da, embriyonik ölümlerin ilk 7 gündeki embriyonik gelişme evrelerinde yoğunlaştığı ve dozdaki artışa bağlı olarak erken embriyonik ölümlerin de arttığı tespit edilmiştir (Grafik 4.2). Bu durum, mitoz bölünme ve hücre farklılaşmasının son derece hızlı olduğu, erken embriyonik gelişme evrelerinde, embriyonun fiziksel ve kimyasal uyarılara karşı son derece duyarlı olmasıyla açıklanabilir (Kucera ve Burnand 1987).

Bu çalışmada, uygulama kolaylığı, yumurtaların enfekte olma riskinin en düşük düzeyde olması, verilen solüsyonun homojen ve hızlı bir şekilde diffüze olmasının yanı sıra, diğer yöntemlerde söz konusu olan yumurta içi basıncın artışına neden olmadığından (Stoloff

ve ark 1972, Kemper ve Luepke 1986, Çelik ve ark. 2000a, Sur ve Çelik 2003), ideal hacim olan 20 µl'lik test solüsyonunun, hava kamarasına enjeksiyonu tercih edilmiştir.

*In ovo* embriyotoksisite testlerinde; kullanılan solventin türü ve konsantrasyonu, test solüsyonunun hacmi ile uygulanacak olan dozlar ve her doz için kullanılacak yumurta sayısı da önemlidir. Etil alkol AF için en uygun solventlerden biridir. Etil alkolün (ETOH) AF için iyi bir solvent olması yanında embriyotoksisitesi de düşüktür (Prelusky ve ark 1987, Çelik ve ark 2000a). Söz konusu çözücü için ideal konsantrasyon ise steril bidistile suyla hazırlanan %30'luk konsantrasyonudur. Prelusky ve ark'nın (1987) bir çalışmasında 20 µl hacmindeki %30'luk ETOH'un mortalitesinin %20.8 iken, aynı hacimdeki %95'lik ETOH'un mortalitesinin %43.1 olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise %30'luk ETOH grubunun mortalitesi %16.86 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.1). Bu değer, Prelusky ve ark'nın (1987) sonuçlarından daha düşüktür.

CHEST'te elde edilen sonuçların güvenilir olması için, her doz grubunda kullanılan yumurta sayısı oldukça önemlidir. Bazı araştırmacılar (Verret ve ark 1964, Kemper ve Luepke 1986, Prelusky ve ark 1987) her doz grubu için 20 yumurtanın yeterli olduğunu bildirirken; Çelik ve ark (2000a) 56'şar, Jelinek ve ark (1985) 120'şer, Kucera ve Burnand (1987) 150'şer, Sur ve Çelik (2003) ise 80-120 arasında yumurta kullanmışlardır. Bu çalışmada, yüksek AFB<sub>1</sub> doz gruplarında fazla sayıda olmak üzere kullanılan yumurta sayıları 74 ile 150 arasındadır.

Aflatoksinlerin etki mekanizması üzerinde yapılan çalışmalarda, doğada en yaygın olarak bulunan ve en tehlikeli olan aflatoksin türünün AFB<sub>1</sub> olduğu belirlendiğinden, etki mekanizması en detaylı biçimde aydınlatılmış olan aflatoksin de AFB<sub>1</sub>'dir (Busbee ve ark 1990, Leeson ve ark 1995). Genel olarak DNA, RNA ve protein sentezini inhibe ederek etkiyen bir toksin olup, metabolize edilmesi sonucu oluşan metabolitleri daha toksiktir (Jeffery ve ark 1984, Leeson ve ark 1995, Kaya 1998). AFB<sub>1</sub>, karaciğerde sitokrom p-450'ye bağlı karma işlevli oksidaz (cyto chrome p-450 dependent mixed function oxydases, MFO) enzim sistemiyle metabolize edilerek epoksit türevlerine (AFB<sub>1</sub>-8,9 epoksit) dönüştürüldükten sonra sitotoksik, karsinogenik, mutajenik ve teratojenik aktiviteleri güçlenir (Leeson ve ark 1995, Mayura ve ark 1998). Bununla birlikte, kanatlı embriyosunda metabolik reaksiyonun

gerçekleşmesi, karaciğer ve böbreklerin aktive oldukları, embriyonik dönemin 5-6. günlerinden sonra mümkündür (Hamilton 1982). Daha önce yapılan çalışmalarla (Çelik ve ark 2000a, Sur ve Çelik 2003) bu çalışmada, kuluçkanın başlangıcında verilen AFB<sub>1</sub>'in metabolize olmadan da şiddetli embriyotoksik etkisi gözlenmiş ve ölümlerin erken embriyonik dönemlerde yoğunlaştığı dikkati çekmiştir (Grafik 4.2). Bu sonuçlar, AFB<sub>1</sub>'in doğal halinde de şiddetli derecede embriyotoksik bir madde olduğunu göstermektedir.

AFB<sub>1</sub>'in embriyonik hücreler üzerindeki etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte, Çelik ve ark (2000a) ile Sur ve Çelik (2003), nispeten orta dozda AFB<sub>1</sub> verilen yumurtalarda gelişen embriyolarda, diskus embriyonalisin area pellucidasının dışı doğru fitiklaşmasıyla karakterize olan bir anomali tespit etmişlerdir. Bu bulgulara dayanarak araştırmacılar (Çelik ve ark 2000a, Sur ve Çelik 2003), AFB<sub>1</sub> molekülünün, embriyonik hücrelerin diferansiyasyonu bozmak suretiyle söz konusu anomaliye neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada da benzer erken embriyonik gelişim anomalileri yanında, değişen oranlarda embriyonik gelişme geriliği de tespit edilmiştir. Eğer Çelik ve ark (2000a) ile Sur ve Çelik'in (2003) ileri sürdükleri gibi, embriyonik hücrelerin ölümüne neden olan dozun altındaki dozlarda verilen AFB<sub>1</sub> hücre diferansiyasyonunu bozuyorsa, bu etki; hücre çoğalması ve farklılaşması ile apoptozis olaylarının yoğun biçimde gerçekleştiği büyüme plakalarında da gözlenecektir. Bu konuda yeterli bilgi bulunmamakla birlikte, yem ile alınan AF'lerin, erişkin kanatlılarda kemik gelişimi üzerinde önemli zararlı etkilerinin olduğu bildirilmektedir (Farquharson 1999). Nitekim, AFB<sub>1</sub>'in düşük dozlarının dahi broiler civcivlerde kemiklerin dayanıklılığını azalttığı ve kırılabilirliğini arttırdığı gösterilmiştir (Maurice ve ark 1983, Wyatt ve Jensen 1990, Farquharson 1999).

Bu çalışmada özellikle embriyonik dönemin 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19. günlerinde, kontrol ve deney gruplarının rölatif embriyo ağırlıkları ve kuluçkadan çıkış günü ile kuluçka sonrası 1. haftada rölatif civciv ağırlıkları arasında önemli (  $P < 0.05$  ) farklar tespit edilmiştir (Tablo 4.2, 4.6). Bu durum, genel vücut gelişiminde oluşan gerilemenin bir sonucu olarak, hayvanların iskelet sisteminin gelişiminin de yavaşlamasından kaynaklanmaktadır. Nitekim, etkilenen embriyoların tibia uzunlukları ve tibia ağırlıkları deney gruplarında kontrol gruplarınınkinden önemli derecede (  $P < 0.05$  ) daha düşük bulunmuştur (Tablo 4.3, 4.4, 4.7, 4.8).

Bu çalışmada tibia kesitleri üzerinde yapılan ışık mikroskopik incelemelerde; kuluçkanın beşinci gününde, hem kontrol ve hem de deney grubu hayvanlarda ossifikasyon alanlarına rastlanmamıştır. Bu bulgu, Syftestad ve ark (1985) ile Pourus ve ark'nın (1998) bulgularıyla uyumludur. Bununla birlikte, Hall (1987), kanatlı tibia'sında ilk ossifikasyon odaklarının biraz daha geç dönemde, kuluçkanın 5.5-6. gününde şekillendiğini ileri sürmektedir. Courtin ve ark (1997) göre ise, kanatlı tibia'sındaki ossifikasyon biraz daha geç dönemde, inkübasyonun yedinci gününde ve subperiostal alanda başlamaktadır. Yine aynı araştırmacılara (Courtin ve ark 1997) göre diyafizin orta bölümünü saran kalsifiye kemik manşon, kuluçkanın onuncu gününde ortaya çıkmakta ve hızla dışa doğru genişlemektedir. Kuluçkanın on birinci gününde, periostal kemik trabekülleri uzayıp genişlemekte ve diafizal bölge yeni eklenen trabeküllerle gittikçe kalınlaşmaktadır. On birinci günde, subperiostal kıkırdağa vasküler invazyonun başlamasıyla birlikte, diyafizin ortasındaki kıkırdak dokusunun erozyonu başlamakta ve yerini tedricen genişleyen kemik iliği almaktadır. Bu çalışmada da kuluçkanın dokuzuncu gününde, diyafizin ortasında mineralize kemik manşon şekillenmiş durumdaydı. On birinci günde ise mineralize kemik manşon, yeni periostal kemik trabeküllerinin eklenmesiyle daha da gelişmiş ve kalınlaşmış durumdaydı. Orta bölgedeki kıkırdak dokusuna kan damarlarının invazyonu da bu bölgede başlamış durumdaydı. Bu bulgular Pechak ve ark'nın (1986a) bulgularıyla da uyumludur.

Pechak ve ark (1986b), subperiostal kemik gelişiminin embriyonik dönem boyunca devam ettiğini, ilk kemik şekillenmesinin diyafizin orta bölgesinde ve kıkırdak dokusu ile periosteum arasında başladığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar (Pechak ve ark 1986b), kan damarlarının periosteumdan girerek merkezi bölgedeki kıkırdak dokusunu erozyona uğrattığını ve bu dokunun tedricen kemik iliği ile yer değiştirdiğini de tesbit etmişlerdir. Ayrıca, şişe mantarı gibi tibianın iki ucunu tıkayan koni şeklindeki kıkırdak kütesinin kuluçka dönemi boyunca varlığını sürdürdüğü ve kuluçka sonrasında ortadan kalktığı bildirilmiştir (Pechak ve ark 1986b). Bu çalışmada yapılan histolojik gözlem sonuçları, broilerlerde ilk kemik gelişiminin subperiostal sahada başladığını ve koni şeklindeki kıkırdak kütesinin embriyonik dönem boyunca varlığını sürdürdüğünü göstermektedir. Syftestad ve ark da (1985), tavuk embriyolarındaki kemik gelişiminin subperiostal sahada başladığını bildirmekle birlikte; Pechak ve ark'nın (1986b) görüşleriyle, bu çalışmada elde edilen bulguların aksine kıkırdağın, tedricen ilerleyen endokondral kemikleşmeyle kemik dokusuyla yer değiştirdiğini ileri sürmüşlerdir. Riddell'e (2003) göre, uzun kemiklerin uç kısımlarında

bulunan koni biçimindeki kırıldak kütlesi, kuluçka dönemi boyunca ve kuluçka sonrası 5 ve 7. güne kadar varlığını sürdürmektedir. Bu çalışmada yapılan histolojik incelemelerde de, tibia'nın her iki ucunda, kuluçka dönemi boyunca varlığını sürdüren kırıldak konisinin kuluçka sonrası 1. haftada ortadan kalktığı tespit edildi.

Germiller ve Goldstein (1997), büyüme plakasının, benzer kondrosit tiplerinin oluşturduğu farklı zonları içerdiğini ve her zondaki kondrositlerin diferensiyasyon sürecinin belirli bir evresinde olduğunu bildirmişlerdir. Her ne kadar Orth (1999), kanatlıların büyüme plakasında rezerv zon, proliferasyon zonu ve hipertrofik zon olmak üzere 3 farklı zon tanımlamış ise de, çoğu araştırmacı broilerlerin büyüme plakalarında; epifizden metafize doğru, rezerv zon, proliferasyon zonu, tranzisyonel zon ve hipertrofik zon olmak üzere 4 farklı zon tanımlamaktadır (Haynes ve ark 1985, Leach ve Gay 1987, Germiller ve Goldstein 1997, Farquharson ve Jefferies 2000). Bununla birlikte, embriyonik dönemde rezerv zon ayırđ edilememektedir (Germiller ve Goldstein 1997). Bu çalışmada da, büyüme plakasının, embriyonik dönem boyunca proliferatif zon, tranzisyonel zon ve hipertrofik zon olmak üzere 3 zondan oluştuğu ve rezerv zon bulunmadığı tespit edildi. Bu zonları oluşturan hücre sütunları oldukça uzun olup, hücreler rast gele dizilmiş durumdaydı. Bu bulgu, Kember ve ark'nın (1990) bulgularıyla uyumludur. Bu çalışmada incelenen kuluçka sonrası dönemlerin tamamında, büyüme plakasında rezerv zon açıkça belirlenmiştir.

Kuluçkanın 13. gününde büyüme plakasında yapılan ölçüm sonuçları, deney gruplarının proliferatif zonlarının, kontrol ve solvent gruplarındakilerden önemli derecede ( $P<0.05$ ) daha dar olduğu halde, tranzisyonel zonları yüksek AFB<sub>1</sub> dozlarında (17,5 ng ve 20 ng AFB<sub>1</sub> /yumurta) önemli derecede ( $P<0.05$ ) genişlemiştir (Tablo 4.10). Bu dönemde hipertrofik zon genişlikleri birbirine oldukça yakın ( $P>0.05$ ) bulunmuştur. 15. günde ise AFB<sub>1</sub> verilen grupların proliferatif ve hipertrofik zonlarının kontrol ve delinip-kapatılan gruba göre önemli derecede ( $P<0.05$ ) daraldığı gözlenirken, tranzisyonel zon sadece 20 ng AFB<sub>1</sub> /yumurta dozunda diğer gruplardan istatistiksel olarak önemli derecede ( $P<0.05$ ) daha geniş bulunmuştur (Tablo 4.10). Kuluçkanın 17. gününde de 15 ng AFB<sub>1</sub> /yumurta ve üzerindeki dozlarda AFB<sub>1</sub> verilen grupların proliferatif zonlarının önemli derecede ( $P<0.05$ ) daralmış olduğu, tranzisyonel zonda ise 17,5 ng ve 20 ng AFB<sub>1</sub> /yumurta gruplarında diğer gruplara göre belirgin ( $P<0.05$ ) bir genişlemenin olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.10). Bu dönemde

hipertrofik zon ise 7.5 ng AFB<sub>1</sub> /yumurta grubundan itibaren diğer gruplardan daha dar (P<0.05) olarak bulunmuştur (Tablo 4.10).

Kuluçkadan çıkışın ilk günü ile kuluçka sonrası dönemin 1 ve 2. haftalarında, büyüme plakasından elde edilen ölçüm sonuçları, embriyonik dönemde elde edilen sonuçlarla büyük benzerlik göstermektedir. Kuluçka sonrası dönemlerde deney gruplarının, rezerv zon, proliferatif zon ve hipertrofik zonlarının önemli (P<0.05) derecede inceldikleri ve AFB<sub>1</sub>'in dozundaki artışa bağlı olarak incelmenin daha da arttığı dikkati çekti (Tablo 4.10, 4.11). Halbuki, deney gruplarında tranzisyonel zon, verilen AFB<sub>1</sub>'in artan dozlarına bağlı olarak daha da kalınlaşmaktaydı. Yapılan çalışma sonuçlarına (Kember ve ark 1990, Germiller ve Goldstein 1997, Farquharson ve Jefferies 2000) göre, memelilerde kemiğin longitudinal büyüme hızını belirleyen faktör, büyüme plakasındaki hipertrofik zonun genişliği iken; kanatlılarda bu faktör proliferatif hücre zonunun genişliğidir. Kanatlılarda, büyüme plakasının proliferatif zonundaki hücrelerin bölünme ve büyüme hızları, kemiğin uzama hızını belirlemektedir.

Bu çalışmada, AFB<sub>1</sub> verilen gruplarda rölatif civciv ağırlıklarında oluşan düşüşlerin de gösterdiği gibi, ortaya çıkan genel gelişme geriliğinin bir sonucu olarak, iskeletin gelişimi de aksamış ve tibianın ağırlık ve uzunluğunda da önemli düşüşler meydana gelmiştir. Tibianın proksimal büyüme plakası üzerinde yapılan histolojik ölçüm sonuçları da, AFB<sub>1</sub> verilen deney gruplarında, hem kemiğin boyuna uzamasının sağlayan proliferatif zonun ve hem de hipertrofik zonun daraldığını; aksine, tranzisyonel zonun genişlediğini göstermektedir. Bu histolojik bulgular, özellikle broilerlerde oldukça sık görülen ve önemli ekonomik kayıplara neden olan tibial kondrodizplazide (TD) büyüme plakasında oluşan lezyonların histolojik görünümüne oldukça benzemektedir. Nitekim, Hargest ve ark (1985), Rennie (1993), Farquharson (1999) ile Farquharson ve Jefferies (2000), büyüme plakasında şekillenen TD lezyonunun, tranzisyonel zonu oluşturan prehipertrofik kondrositlerin artışı ile karakterize olduğunu bildirmektedirler. Araştırmacılar (Hargest ve ark 1985, Rennie 1993, Farquharson 1999, Farquharson ve Jefferies 2000), büyüme plakasında ortaya çıkan bu olgunlaşmamış kondrosit birikiminin, normal kondrositlerin farklılaşma sürecinde meydana gelen bir aksamadan kaynaklandığını ileri sürmektedirler. Bu sonuçlar, embriyonik dönemde maruz kalınan hücre ölümüne neden olan dozların altındaki AFB<sub>1</sub>'in, diğer etkileri yanında kondrositlerin farklılaşma sürecinde de aksaklıklara yol açabileceği ve bu aksaklıkların da

gerek embriyonik ve gerekse de kuluçkadan çıkıştan sonraki dönemlerde iskelet sisteminin gelişimini doğrudan etkileyebileceğini akla getirmektedir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, AFB<sub>1</sub>'in, kondrositlerin transformasyonlarıyla diferansiyasyonları üzerindeki etki mekanizmasının belirlenmesi ve bu etki mekanizmasının açıklanabilmesi bakımından yetersizdir. AFB<sub>1</sub>'in özellikle, embriyonik hücrelerin hücre siklusları üzerindeki ve programlı hücre ölümü üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, konunun aydınlatılmasında önemli ipuçları verebilir. AFB<sub>1</sub>'in DNA'ya bağlanarak onun davranışını değiştirdiği bilindiğinden, genetik çalışmaların yapılması da konu hakkında oldukça önemli bilgiler sağlayabilir. Bu nedenle, konu üzerinde daha detaylı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak; bu çalışmada; kontrol, delinip-kapatılan ve sovent gruplarıyla değişik dozlarda AFB<sub>1</sub> verilen deney gruplarının mortaliteleri arasında önemli (P<0.05) farklar tespit edilmiştir. Verilen AFB<sub>1</sub>'in dozundaki artışlara bağlı olarak mortalite de artmıştır. Düşük dozlarda AFB<sub>1</sub> verilen gruplardaki embriyoların tamamının ölmemesi ise, AFB<sub>1</sub>'e karşı bireysel direncin bulunabileceğini akla getirmektedir. Bu konuda yapılacak olan seleksiyon çalışmalarıyla, AFB<sub>1</sub>'e nispeten daha dirençli ırkların geliştirilmesi de mümkün olabilir.

Embriyonik dönemin farklı evreleri ile kuluçka sonrası dönemlerdeki rölatif embriyo ağırlıkları ve civciv ağırlıkları, AFB<sub>1</sub> verilen gruplarda kontrol ve solvent gruplarınınkinden önemli derecede (P<0.05) düşük bulunmuştur (Tablo 4.2, 4.6). Aynı dönemlerde; AFB<sub>1</sub> verilen grupların tibia ağırlıkları ve tibia uzunlukları da kontrol, delinip-kapatılan ve solvent gruplarından önemli derecede (P<0.05) daha düşüktür (Tablo 4.3, 4.4, 4.7, 4.8). Tibia'nın proksimal bölgesi, orta hattı ve distal bölgelerinin genişlikleri de AFB<sub>1</sub> verilen gruplarda kontrol, delinip-kapatılan ve solvent gruplarınınkinden önemli derecede (P<0.05) daha düşük bulunmuştur (Tablo 4.5, 4.9). AFB<sub>1</sub> verilen grupların büyüme plakaları üzerinde yapılan ölçüm sonuçları, doz artışına paralel olarak plakadaki proliferatif ve hipertrofik zonların önemli derecede (P<0.05) incelendiğini, aksine tranzisyonel zonun kalınlaştığını ortaya koymuştur (Tablo 4.10, 4.11). Bu bulgular; AFB<sub>1</sub>'in embriyonik dönemde iskelet gelişimini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir.

## 6. ÖZET

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji (VET) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/ KONYA-2003

Yasemin Öznurlu

Danışman

Prof. Dr. İlhami ÇELİK

**Yumurtaya verilen aflatoksin B<sub>1</sub>'in, etçi piliçlerin kemik dokularının embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi**

Bu çalışmada, yumurtaya verilen aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)'in broilerlerde, tibia'nın ve bunun büyüme plakasının embriyonik gelişimi üzerindeki etkileri histolojik ve histometrik yöntemlerle belirlenmiştir. Çalışmada, AFB<sub>1</sub>'in embriyotoksik etkileri de incelenmiştir.

Materyal olarak, ticari bir işletmeden temin edilen *Hubbard* ırkı broiler damızlıklara ait olan toplam 1024 adet kuluçkalık yumurta kullanıldı. Yumurtalar aşağıdaki gruplara ayrıldı; 1-kontrol grubu, 2-delinip-kapatılan grubu, 3-solvent grubu, 4-2.5ng AFB<sub>1</sub>/yumurta , 5-5ng AFB<sub>1</sub>/yumurta, 6-7.5ng AFB<sub>1</sub>/yumurta, 7-10ng AFB<sub>1</sub>/yumurta, 8-15ng AFB<sub>1</sub>/yumurta, 9-17.5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta, 10-20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubu. İnkübasyonun hemen öncesinde, her yumurtaya 20 µl test solüsyonu, hava kamarası yoluyla enjekte edildi. Embriyonik dönemin farklı günlerinde açılan yumurtalardan elde edilen embriyoların gelişme evreleri Hamburger-Hamilton skalasına göre tespit edilerek, embriyonik ölümlerin bu skalaya göre dağılımları belirlendi. Elde edilen sayısal veriler istatistiksel yöntemlerle analiz edildi.



Kuluçka dönemi boyunca açılan yumurtalardan elde edilen embriyoların rölâtif embriyo ağırlıkları hesaplanarak, gruplar arasındaki farkların önem dereceleri belirlendi. Sonuçlar; AFB<sub>1</sub> verilen grupların rölâtif embriyo ağırlıklarının kontrol, delinip-kapatılan ve solvent gruplarınıninkilerden önemli derecede ( $P<0.05$ ) düşük olduğunu ortaya koymaktadır. Kuluçkadan çıkışın ilk günü ile kuluçkadan çıkışı takip eden 1. haftada, ortalama civciv canlı ağırlıklarında da söz konusu gruplar arasında önemli ( $P<0.05$ ) farklar bulunmakla birlikte, 2. haftada ortalama civciv canlı ağırlıkları birbirine oldukça yakındır ( $P>0.05$ ).

Verilen AFB<sub>1</sub>'in dozundaki artışlara paralel olarak, grupların embriyonik mortalitelerinin de arttığı tespit edildi. Kontrol grubu ve delinip-kapatılan grupla deney gruplarının mortaliteleri arasındaki farklar önemli ( $P<0.05$ ) iken; solvent, 2.5 ng, 5 ng ve 7.5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta gruplarının mortaliteleri arasındaki farklar önemsizdi ( $P>0.05$ ). Deney gruplarından; 15 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuyla 17.5 ve 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta gruplarının mortaliteleri arasındaki fark ise önemliydi ( $P<0.05$ ). Bununla birlikte, 17.5ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuyla 20ng AFB<sub>1</sub>/yumurta gruplarının mortaliteleri arasındaki fark önemsiz bulundu ( $P>0.05$ ).

Çalışmada, kuluçkanın değişik dönemleri ile kuluçka sonrası dönemlerde tibia örnekleri alındı. Alınan tibia örneklerinin ağırlıkları ve uzunluklarının tespit edilmesi yanında, tibianın proksimal bölgesi, orta hattı ve distal bölgelerinin kalınlıkları ölçüldü. Tibianın histolojik yapısının belirlenmesi amacıyla, alınan doku örnekleri uygun histolojik yöntemlerle işlenerek preparatlar hazırlandı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopuyla incelenerek, proksimal büyüme plakasındaki zonların genişlikleri çizgi oküler mikrometre yardımıyla belirlendi. Her gruptan belirli sayıdaki embriyo bütün olarak (*in toto*) tespit edilerek Alizarin Red-S ile boyandı. Elde edilen veriler istatistiksel yöntemlerle analiz edilerek, gruplar arası farkların önem dereceleri belirlendi. Sonuçlar, AFB<sub>1</sub> verilen grupların ortalama tibia uzunlukları ve ağırlıklarının, kontrol ve delinip-kapatılan ve solvent gruplarınıninkilerden önemli ( $p<0.05$ ) derecede düşük olduğunu ortaya koymaktadır.

Histolojik kesitler üzerinde yapılan incelemelerde, embriyonik dönemde manşon şeklindeki ossifikasyon merkezinin grupların tamamında kuluçkanın 7. gününde şekillenmiş olduğu dikkati çekti. Hem embriyonik ve hem de kuluçka sonrası dönemlerde meydana gelen

kemikleşme olaylarının, grupların tamamında benzer seyir izlediği tespit edildi. Büyüme plakasında yapılan ölçüm sonuçlarına göre proliferatif ve hipertrofik zonlar, AFB<sub>1</sub> verilen gruplarda önemli derecede ( $P<0.05$ ) incelmış oldukları halde; tranzisyonel zon, özellikle yüksek doz gruplarında (17.5 ng ve 20 ng/AFB<sub>1</sub>/yumurta) gruplarında önemli derecede ( $P<0.05$ ) genişlemiş durumdaydı.

Sonuçlar, yumurtada 15 ng/yumurta dozundan yüksek dozda bulunan AFB<sub>1</sub>' in embriyonun iskelet sisteminde gelişme geriliğine neden olduğu ve etkilerinin özellikle tibia ile bunun büyüme plakasında daha belirgin biçimde ortaya çıktığını göstermektedir. Benzer bulgular kuluçka sonrası ilk iki haftalık dönemlerde de gözlenmektedir. Etkilenen hayvanlarda büyüme plakasındaki proliferatif ve hipertrofik zonlar daralırken, tranzisyonel zonun kalınlaşması, bu hayvanların iskelet sisteminde kuluçka sonrası dönemde bazı bozuklukların ortaya çıkabileceğini göstermektedir.

## 7. SUMMARY

### **Determination of toxic effects of aflatoxin B<sub>1</sub> given in ovo on the embryonic bone development in broiler chicken.**

In this study, detrimental effects of aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) on the embryonic development of tibia and its proximal growth plate were determined by means of histological and histometric methods. In the study, embryotoxic effects of AFB<sub>1</sub> were also investigated.

For this purpose, 1024 eggs of Hubbard parent stocks were used. The eggs were divided into the groups as follows: 1. controls, 2. Drilled-sealed group, 3. solvent group, 4. 2.5 ng AFB<sub>1</sub>/egg group, 5. 5 ng AFB<sub>1</sub>/egg group, 6. 7.5 ng AFB<sub>1</sub>/egg group, 7. 10 ng AFB<sub>1</sub>/egg group, 8. 15 ng AFB<sub>1</sub>/egg group, 9. 17.5 ng AFB<sub>1</sub>/egg group and 10. 20 ng AFB<sub>1</sub>/egg group. Test solutions were injected via air-sac just prior to the settlement of the eggs into the incubator. Eggs from each group were opened on various days of the incubation and developmental stages of embryos were determined according to the Hamburger-Hamilton scale. Number of dead embryos from each group were determined and mean embryonic mortalities of the groups were calculated. Data was analysed by using statistical methods.

Relative embryo weights were calculated and displayed as percentages, through the incubation period. Significance of the differences between mean values of the groups were determined statistically. Also mean live chick weights of the groups were determined at 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> weeks of post hatch. The results have revealed that mean relative embryo weights of controls, drilled-sealed and solvent groups were significantly ( $P < 0.05$ ) higher than those of the AFB<sub>1</sub> treated groups. Moreover, mean chick live weights were also lower in the treatment groups at 1<sup>st</sup> week of posthatch. However mean chick weights of both nontreated and AFB<sub>1</sub> treated groups were quite similar ( $P > 0.05$ ), at 2<sup>nd</sup> week of post hatch period.

The higher doses of AFB<sub>1</sub> caused higher mortality values. The differences between controls, drilled-sealed group and AFB<sub>1</sub> treated groups were significant ( $P < 0.05$ ) whereas, the mortality values of the groups solvent and 2.5 ng, 5 ng, 7.5 ng AFB<sub>1</sub>/egg groups were quite

similar ( $P>0.05$ ). From experimental groups, 15 ng AFB<sub>1</sub>/egg group had significantly lower mortality ( $P<0.05$ ) than 17.5 ng and 20 ng AFB<sub>1</sub>/egg groups. Nevertheless, there was no significant difference ( $P>0.05$ ) between 17.5 ng and 20 ng AFB<sub>1</sub>/egg groups.

In the study, tibial tissue samples and tibial measures were also taken at different periods of the incubation and at 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> weeks of posthatch. Tibial weights, tibia lengths and also widths of proximal, middle portion and distal regions of the tibia were determined. In order to observe histology of tibia, the tissue samples were decalcified when it is necessary, dehydrated, cleaned and immersed in paraffin blocks by means of routine histological techniques. The blocks were cut into 5  $\mu$ m thick sections and stained with suitable staining methods and observed with light microscope. Histometric measurements on the tibial growth plate were done using a linear ocular micrometer. From each group, some of the embryos were fixed as a whole (in toto) and stained with Alizarin Red-S. The data were also analysed with statistical methods and the significance of the differences between the groups were evaluated. The results of tibial measurements have revealed that AFB<sub>1</sub> treated groups displayed lower mean tibial lengths and weights when compared to the drilled-sealed and solvent groups ( $P<0.05$ ).

In microscopic observations of the tibial sections, the diaphyseal osseous collar was observed in all groups at 7<sup>th</sup> day of the incubation. Osseous tissue development displayed similar course in all groups. The results of the measurements of the growth plate have showed that both proliferative and hypertrophic zones get significantly ( $P<0.05$ ) narrowed in all AFB<sub>1</sub> treated groups whereas, the transitional zone thickened, specifically in 17.5 ng AFB<sub>1</sub>/egg and 20 ng AFB<sub>1</sub>/egg groups when compared to the controls, drilled-sealed and solvent groups.

The results have revealed that the AFB<sub>1</sub> when found in the fertilized egg higher than 15 ng might interfere skeletal development and cause retardation in the development of the embryonic skeletal system and the effects are more pronounced in tibia and its proximal growth plate. Similar results were also found through the first two weeks of post hatch period. Since both the proliferative and hypertrophic zones of the affected animals narrowed whereas, the transitional zone thickened, the results have showed that some skeletal deformities might be expected at further stages of the posthatch period in the affected animals.

## 8. KAYNAKLAR

- Adams CA (1983) *Moulds Mycotoxins*, The Feed Compounder, 5,3,24-27
- Ağaçdelen HH ve Acet HA (1993) *Aflatoxin B<sub>1</sub> ve aflatoxin M<sub>1</sub>'in yumurtaya geçiş düzeyleri ve atılım sürelerinin tespiti üzerine deneysel araştırmalar*, Veterinarium, 4(2), 36-43.
- Aksoy M (1984) *Beslenme ve Kanser*, Yeni Çağ Matbaası, Ankara.
- Albertini S, Friedrich U, Holderegger C and Würgler FE (1988) *The in vitro porcine brain tubulin assembly assay: effects of a genotoxic carcinogen (aflatoxin B<sub>1</sub>), eight tumor promoters and nine miscellaneous substances*, Mutation Res., 201, 283-292.
- Aldemir C (1992) *Aflatoxinlerin yumurta tavuklarının dokularına dağılım düzeyleri ve atılım sürelerinin tespiti üzerine araştırma*, Doktora Tezi, S.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Archer DF, Dorin M, Lewis V, Schneider DL ve Pickar JH (2001) *Effects of lower doses of conjugated equine estrogens and medroxyprogesterone acetate on endometrial bleeding*, Fertility and Sterility, 75, 6, 1080-1087.
- Batra P, Pruthi AK and Sadana JR (1991) *Effect of aflatoxin B<sub>1</sub> on the efficiency of turkey herpesvirus vaccine against Marek's disease*, Res. Vet. Sci., 51, 115-119.
- Bilgiç N (1991) *Civcivlerde deneysel oluşturulan Aflatoksikosis olaylarında histopatolojik bulgular*. Doktora Tezi, Danışman Doç.Dr. Tahsin Yeşildere, İstanbul.
- Bilgiç HN and Yeşildere T (1992) *Civcivlerde deneysel Aflatoksikosisde böbrek lezyonları*. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg., 18, 2, 102-108.
- Bilgiç HN ve Türkmen H (1993) *Gökkuşuğu alabalıklarında (Salmogairdneri) aflatoksikozis olaylarında karaciğerde patolojik bulgular*, Türk Vet. Hekim. Derg., 5(5), 30-33.
- Birbir M, Ilgaz A, Yurdun T ve Çiloğlu F (1995) *Piyasada satılmakta Olan Hazır Çorbalardan Küflerin Ayrımı ve Tanımlanması*, Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg., 26,2,163-174.
- Brighton CT (1985) "Normal Bone Formation" In: Textbook of Small Animal Orthopedics, Ed: Charles Newton, David M. Nunamaker, J.B. Lippincott Company, Philadelphia.
- Busbee DL, Norman JO and Ziprin RL (1990) *Comparative uptake, vascular transport and cellular internalization of aflatoxin B<sub>1</sub> and benzo(a)pyrene*, Arch. Toxicol., 64, 285-290.
- Campbell ML, May JD, Huff WE and Doerr A (1983) *Evaluation of immunity of young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis*, Poult. Sci., 62,2138-2144.

- Cancedda R, Descalzi Cancedda F and Castagnola P (1995)** *Chondrocyte differentiation*. Int. Rev. Cytol. , 159, 265-358.
- Capen CC and Weisbrode SE (1982)** *Hormonal Control of Mineral Metabolism and Bone Cell Activity*, Bone in Clinical Orthopaedics a Study in Comparative Osteology, 197-251.
- Caplan AI and Pechak DG (1987)** *The cellular and molecular embryology of bone formation*, In: Peck WA, Bone and Min. Res., 5, 117-184.
- Castagnola P, Moro G, Descalzi-Cancedda F and Cancedda R (1986)** *Type X Collagen Synthesis during in vitro development of chick embryo tibial chondrocytes*. J. Cell Biol. 102, 2310-2317.
- Chattopadhyay SK, Taskar PK, Schwabe O, Das YT and Brown HD (1985)** *Clinical and biochemical effects of aflatoxin in feed ration of chicks*, Cancer Biochem. Biophys., 8, 67-75.
- Cilievici O, Ghidus ICE, Moldovan A (1980)** *The Toxic and Teratogenic effect of aflatoxin B1 on the chick Embryo Development*. Morphol Embryol , 4, 309-314.
- Cireli E (1997)**, *Kemik Dokusu*, Genel Histoloji, 229-250, 5.baskı, İzmir.
- Corrier DA (1991)** *Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression*, Vet. Immunol. Immunopathol., 30, 73-87.
- Courtin B, Perault-Staub AM and Staub JF (1997)** *Introduction and model background: A reaction- Diffusion Model for trabecular architecture of embryonic periosteal long bone*, Complexity International, Volume 4.Erişim:<http://journal-ci.csse.monash.edu.au/ci/vol04/STAUB-paper1/part1.html>
- Cukrova V, Langrova E and Akao M (1991)** *Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> on myelopoiesis in vitro*, Toxicol, 70, 203-211.
- Culling CFA, Allison RT and Barr WT (1985)** *Cellular Pathology Technique*, Butterworths and Co Ltd, London.
- Çelik İ, Demet Ö, Dönmez HH, Oğuz H ve Boydak M (1996)** *Aflatoksin ve aflatoksin bağlayıcısı olan polivinilpolipirrolidon (PVPP) verilen broylerlerde peritoneal makrofajların fagositik ve mikrobisidal aktivitelerinin belirlenmesi*, Vet Bil Derg, 12(1), 145-151.
- Çelik I, Oğuz H, Demet Ö, Boydak M, Dönmez HH, Sur E And Nizamhoğlu F (2000a)** *Embryotoxicity assay of aflatoxin produced by Aspergillus parasiticus NRRL 2999*, Br. Poult. Sci., 41, 401-409.

- Çelik I, Oğuz H, Demet Ö, Boydak M, Dönmez HH, and Sur E (2000b)** *Efficiency of polyvinylpyrrolidone in reducing the immunotoxicity of aflatoxin in growing broilers.* Br. Poult. Sci., 41, 430-439.
- Çetin İ. (1990).** *Avian Aflatoksikosis.* Etlik Vet. Mikrobiyol. Derg., 7, 1, 161-181.
- Dafalla R, Yagi AI and Adam SEI (1987)** *Experimental aflatoxicosis in Hybro-Type chicks: Sequential changes in growth and serum constituents and histopathological changes,* Vet. Hum. Toxicol., 29(3), 222-226.
- Dashek WV, Barker SM, Statkiewicz WR, Shanks ET and Lewellyn GC (1983)** *Histochemical analysis of liver cells from short term aflatoxin-dosed and non-dosed Coturnix coturnix japonica. 1. Aflatoxin-sensitive quail,* Poult. Sci., 62, 2347-2359.
- Dekleer VS (1982)** *Development of Bone,* Bone in Clinical Orthopaedics: A study in Comparative Osteology, Chapter 1,1-35.
- Demet Ö ve Oğuz H (1995)** *Aflatoksinlerin inaktivasyonunda adsorbanların kullanımı,* Türk Vet. Hek. Derg., 7, 1, 26-29.
- Demet Ö, Oğuz H, Çelik İ ve Adıgüzel H (1995)** *Buğday, mısır, pirinç ve yer fıstığında aflatoksin üretilmesi,* Vet Bil Derg, 11,2,135-140.
- Diener UL and Davis ND (1985)** *Effects of aflatoxin on young turkeys and broiler chickens.* Poult. Sci., 64, 1678-1684.
- Dietert RR, Qureshi MA, Nanna UC and Bloom SE (1985)** *Embryonic exposure to aflatoxin B<sub>1</sub> : Mutagenicity and influence on development and immunity,* Environ. Mutagenesis, 7, 715-725.
- Doğan K ve Yetişir R (1983)** *Değişik Kalsiyum Kaynaklarının Tavuk Rasyonlarında Değerlendirilmesi Üzerinde Araştırmalar,* Doğa Bil. Derg., 7, 119-131.
- Dugyala RR, Kim YW and Sharma RP (1994)** *Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> and T-2 toxin on the granulocyte-macrophage progenitor cells in mouse bone marrow cultures,* Immunopharmacology, 27, 57-65.
- Dugyala RR and Sharma RP (1996)** *The effect of aflatoxin B<sub>1</sub> on cytokine mRNA and corresponding protein levels in peritoneal macrophages and splenic lymphocytes,* Int. J. Immunopharmacol., 18(10), 599-608.
- Edwards HM and Veltmann JR (1983)** *The role of calcium and phosphorus in the etiology of tibial dyschondroplasia in young chicks.* J. Nutr. ,113, 1568-1575.

- Edwards HM (1988)** *Effect of dietary calcium, phosphorus, chloride and zeolite on the development of tibial dyschondroplasia.* Poult. Sci., 67, 1436-1446.
- Ellis J and Dipaolo JA (1967)** *Aflatoxin B<sub>1</sub> and malformations,* Arch Pathol, 83, 53-57.
- Ellis WO, Smith JP and Simpson BK (1991)** *Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control.* Critical. Rev. Food Sci. and Nutr., 30, 3, 403-439.
- Erbengi T, Aytekin Y, Canberk Y, Erdinç F (1987)** *Kemik Dokusu,* Histoloji, 89-113, 2. Baskı, İstanbul Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş.
- Erenpreisa J, Roach HI (1999)** *Aberration of cell cycle and cell death in normal development of the chick embryo growth plate.* Mechanisms of Ageing and Development., 108, 227-238.
- Farnum CE and Wilsman NJ (1987)** *Morphologic stages of the terminal hypertrophic chondrocyte of growth plate cartilage.* Anat. Rec., 219, 221-232.
- Farquharson C, Whitehead CC, Rennie JS, Thorp B and Lovaridge N (1992)** *Cell proliferation and enzyme activities associated with the development of avian tibial dyschondroplasia: An in situ biochemical study.* Bone, 13-67.
- Farquharson C, Whitehead CC, Rennie JS and Lovaridge N (1993)** *In vivo effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol on the proliferation and differentiation of avian chondrocytes.* J. Bone and Min. Res., 8, 9, 1081-1087.
- Farquharson C, Berry L, Mawer EB, Seawright E and Whitehead CC (1995)** *Regulators of chondrocyte differentiation in tibial dyschondroplasia: An in vivo and in vitro study.* Bone. 17, 3, 279-286.
- Farquharson C (1999)** *Tibial Dyschondroplasia in Poultry: A Review,* The Workshop On Metabolic Disorders In Poultry, 60-65, October 17-21 1999, İzmir.
- Farquharson C and Jefferies D (2000)** *Chondrocytes and longitudinal bone growth: The development of tibial dyschondroplasia.* Poult. Sci., 79, 994-1004.
- Fernandez A, Verde MT, Gascon M, Ramos J, Gomez J, Luco DF and Chavez G (1994)** *Variations of clinical biochemical parameters of laying hens and broiler chickens fed aflatoxin-containing feed,* Avian Pathol., 23, 37-47.
- Geissler F And Faustman EM (1988)** *Developmental toxicity of aflatoxin b<sub>1</sub> in the rodent embryo in vitro: contribution of exogenous biotransformation systems to toxicity.* Teratology, 37, 101-111.
- Germiller JA and Goldstein SA (1997)** *Structure and function of embryonic growth plate in the absence of functioning skeletal muscle.* J. Orth. Res., 15, 362-370.



- Gerstenfeld LC, Zurakowski D, Schaffer JL, Nichols DP, Toma CD, Broess M, Bruder SP and Caplan AI (1996)** *Variable hormone responsiveness of osteoblast populations isolated at different stages of embryogenesis and its relationship to the osteogenic lineage*, *Endocrinology*, Vol 137, 3957-3968.
- Ghosh RC, Chauhan HVS and Roy S (1990)** *Immunosuppression in broilers under experimental aflatoxicosis*, *Br. Vet. J.*, 146, 457-462.
- Giambrone JJ, Ewert DL, Wyatt RD and Eidson CS (1978)** *Effect of aflatoxin on the humoral and cell-mediated immune systems of the chicken*, *Am. J. Vet. Res.*, 39(2), 305-308.
- Giambrone JJ, Diener UL, Davi ND, Panangala VS and Hoerr FJ (1985a)** *Effects of purified aflatoxin on broiler chickens*, *Poult. Sci.*, 64, 852-858.
- Giambrone JJ, Diener UL, Davi ND, Panangala VS and Hoerr FJ (1985b)** *Effects of aflatoxin on young turkeys and broiler chickens*, *Poult. Sci.*, 64, 1678-1684.
- Giambrone JJ, Diener UL, Davi ND, Panangala VS and Hoerr FJ (1985c)** *Effect of purified aflatoxin on turkeys*, *Poult. Sci.*, 64, 859-865.
- Glahn RP, Beers KW and Bottje WG (1990)** *Altered renal function in broilers during aflatoxicosis*. *Poult. Sci.*, 69, 1796-1799.
- Glahn RP, Beers KW, Bottje WG, Wideman RF, Huff WE and Thomas W (1991)** *Aflatoxicosis alters avian renal function, calcium and vitamin D metabolism*, *J. Toxicol. Environ. Health*, 34, 309-321.
- Gradelet S, LeBon AM, Bergès R, Suschetet M and Astorg P (1998)** *Dietary carotenoids inhibit B<sub>1</sub>-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: Role of the modulation of aflatoxin B<sub>1</sub> metabolism*, *Carcinogenesis*, 19(3), 403-411.
- Hall BK (1987)** *Earliest evidence of cartilage and bone development in embryonic life*, *Clin. Orth. and Rel. Res.*, 225, 255-271.
- Hamburger V and Hamilton HL (1951)** *A series of normal stages in the development of the chick embryo*, *J. Morphol.*, 88,49-92.
- Hamilton PB (1982)** *Mycotoxins and farm animals*, *Refush Vet*, 39(1-2), 17-45.
- Hargest TE, Leach RM and Gay V (1985)** *Avian tibial dyschondroplasia: Ultrastructure*. *AJP.*, 119, 2, 175-190.

- Harvey RB, Phillips TD, Ellis JA, Kubena LF Huff WE and Peterson HD (1991)** *Effects on aflatoxin M<sub>1</sub> residues in milk by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to aflatoxin-contaminated diets of dairy cows*, Am. J. Vet. Res., 52(9), 1556-1559.
- Hatch RC (1988)** *Poison causing abdominal distress of liver or kidney damage*, In "Veterinary Pharmacology and Therapeutics" Eds. by NH Both and Le McDonald, Sixth edition, The Iowa State University Press, 1102-1125.
- Haworth SR, Lawlor TE, Zeiger E, Lee LS and Park DL (1989)** *Mutagenic potential of ammonia-related aflatoxin reaction products in a model system*, JAOCS, 66, 1, 102-104.
- Haynes JS (1990)** *Immunohistochemical localization of type X collagen in the proximal tibiotarsi of broiler chickens and turkeys*. Anat. Rec., 227, 307-313.
- Haynes JS, Walser M M and Lawler EM (1985)** *Morfogenesis of fusarium sp-induced tibial dyschondroplasia in chickens*. Vet. Pathol., 22:629-636.
- Howlett CR, Dickson M and Sheridan AK (1984)** *The fine structure of the proximal growth plate of the avian tibia: vasculer supply*. J. Anat., 139, 1, 115-132.
- IARC (1993)** *Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxin*, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp 245-395.
- Hsieh DPH, Wong ZA, Wong JJ, Michas C and Rueber BH (1977)** *Comparative Metabolism of Aflatoxin in: Mycotoxin in Human and Animal Health*, Pathotox Publ, Inc, Pork Forest South, Illinois, pp: 37-50.
- Huff WE, Doerr JA, Hamilton PB, Hamann DD, Peterson RE and Ciegler A (1980).** *Evaluation of bone strength during aflatoxicosis and ochratoxicosis*. Appl. and Environ. Microbiol., 40, 1, 102-107.
- Huff WE, Kubena LF, Harvey RB, Corrier DE and Mollenhauer HH (1986)** *Progression of aflatoxicosis in broiler chickens*. Poult. Sci., 65, 1891-1899.
- Huff WE, Harvey RB , Kubena LF and Rottinghaus GE (1988)** *Toxic synergism between aflatoxin and T-2 toxin in broiler chicken*, Poult. Sci., 67, 1418-1420.
- Hurwitz S (1989)** *Calcium homeostasis in birds*. Vitam. Horm., 45,173-221.
- Iwaki M, Kitagawa T, Akamatsu Y and Aibara K (1990)** *Cytotoxic effects of aflatoxin B<sub>1</sub> and its association with cellular components in chicken embryo primary cultured cells*, Biochem. Biophysic. Acta., 1035, 146-153.

- İstanbulluoğlu E ve Arda M (1979)** *Kanatlılarda mikotoksikozis, Üçüncü Ulusal Tavukçuluk Kongresi*, 3-7.
- Jacobson WC and Wiseman HG (1974)** *The transmission of aflatoxin B<sub>1</sub> into eggs*, *Poult. Sci.*, 53, 1743-1745.
- Jeffery FH, Morton JG and Miller JK (1984)** *Effects of some clinically significant mycotoxins on the incorporation of DNA, RNA and protein precursors in cultured mammalian cells*, *Res. Vet. Sci.*, 37, 30-38.
- Jelinek R, Peterka M and Rychter Z (1985)** *Chick embryotoxicity screening test-130 substances tested*, *Indian J. Exp. Biol.*, 23, 588-595.
- Julian RJ (1998)** *Rapid growth problems: ascites and skeletal deformities in broilers*, *Poult. Sci.*, 77,1773-1780.
- Kärenlampi SO (1987)** *Mechanism of cytotoxicity of aflatoxin B<sub>1</sub>*, *Biochem. Biophysic. Res. Commun.*, 145 (2), 15, 854-860.
- Kaya S (1982)** *Süt yemi ve çiğ sütte aflatoksin kalıntılarının kromatografik yöntem ile araştırılması*, *AÜ Vet Fak Derg*, 29(3-4), 443-457.
- Kaya S, Yavuz H ve Akar F (1990)** *Bazı yağlı tohum küspelerinde mikotoksin kalıntıları*, *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 37, 173-180.
- Kaya S (1998)** *Mikotoksinler ve mikotoksin zehirlenmeleri*, *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji*, Eds. S.Kaya, İ.Pirinçci ve A.Bilgili, *Medisan Yayınevi*, 35, 348-354, Ankara.
- Keçeci T, Demet Ö ve Oğuz H (1995)** *Broyler civcivlerde yeme yalnız ve kombine katılan aflatoksin ve adsorban (Mycofix Plus) 'ın bazı hematolojik ve serum biyokimyasal parametreler üzerindeki etkisi*, *Vet. Bil. Derg.*, 11(2), 59-64.
- Keçeci T, Oğuz H, Kurtoğlu V and Demet Ö (1998)** *Effects of polyvinylpolypyrrolidone, synthetic zeolite and bentonite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis*, *Br. Poult. Sci.*, 39, 452-458.
- Kember NF, Kirkwood JK, Duignan PJ, Godfrey D and Spratt DJ (1990)** *Comparative cell kinetics of avian growth plates*, *Res. Vet. Sci.*, 49, 283-288.
- Kemper FH and Luepke NP (1986)** *Toxicity testing by the hen's egg test (HET)*, *Fd. Chem. Toxic.*, 24(6-7), 647-648.

- Krishna L, Dawra RK, Vaid J and Gupta VK (1991)** *An outbreak of aflatoxicosis in Angora rabbits*, Vet. Hum. Toxicol., 33(2), 159-161.
- Kubena LF, Harvey RB, Phillips TD, Corrier DE and Huff WE (1990)** *Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate*, Poul. Sci., 69, 727-735.
- Kubena LF, Harvey RB, Phillips TD and Clement BA (1993)** *Effects of hydrated sodium calcium aluminosilicate on aflatoxicosis in broiler chicks*, Poul. Sci., 72, 651-657.
- Kubena LF, Harvey RB, Bailey RH, Buckley SA and Rottinghaus GE (1998)** *Effects of hydrated sodium calcium aluminosilicate (T-bind™) on mycotoxicosis in young broiler chickens*, Poul. Sci., 77, 1502-1509.
- Kucera P and Burnand MB (1987)** *Routine teratogenicity test that uses chick embryos in vitro*, Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis, 7, 427-447.
- Kul M (1996)** *Konya Yöresindeki Buzağlarda Şekillenen Metabolik Kemik Hastalıklarının Teşhisinde Biyokimyasal ve Radyolojik Kriterlerin Önemi*, Doktora Tezi, S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Lawler EM, Schivers JL and Walser MM (1988)** *Acid Phosphatase activity of chondroclast from Fusarium-induced tibial dyschondroplastic cartilage*. Avian Dis, 32,240-245.
- Leach RM and Nesheim MC (1965)**. *Nutritional, Genetic and Morphological studies of an abnormal cartilage formation in young chicks*. J. Nutrition., 86, 236-244.
- Leach RM and Nesheim MC (1972)** *Further studies on tibial dyschondroplasia (cartilage abnormality)in young chicks*. J. Nutr., 102,1673-1680.
- Leach RM and Gay CV (1987)** *Role of epiphyseal cartilage in endochondral bone formation*. J. Nutr., 117,784-790.
- Leeson S, Diaz G and Summers JD (1995)** *Aflatoxins*, In "Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins", Eds. by S Leeson, JDG Gonzala and JD Summers, Published by: University Books, 249-298, PO Box 1326, Guelph, Ontario, Canada.
- Leterrier C and Nys Y (1992)** *Composition, cortical structure and mechanical properties of chicken tibiotarsi : effect of growth rate*, Br. Poul. Sci., 33,925-936.
- Loveridge N, Farquharson C, Hesketh JE, Jakowlew SB, Whitehead CC and Thorp BH (1993)** *The control of chondrocyte differentiation during endochondral bone growth in vivo: changes in TGF- $\beta$  and the proto-oncogene c-myc*. J. Cell Sci., 105 949-956.

- Lynch M, Thorp BH and Whitehead CC.**(1992) *Avian tibial dyschondroplasia as a cause of bone deformity*. Avian Pathol., 21, 275-285.
- Maurice DV, Bodine AB and Rehner NJ** (1983) *Metabolic effects of low aflatoxin B<sub>1</sub> levels on broiler chicks*, Appl. Env. Microbiol., 45, 3, 980-984.
- Mayura K, Abdel-Wahhab MA, McKenzie KS, Sarr AB, Edwards JF, Naguib K and Phillips TD** (1998) *Prevention of maternal and developmental toxicity in rats via dietary inclusion of common aflatoxin sorbents: Potential for hidden risks*, Toxicol. Sci., 175-182.
- Mc Loughin ME, Pier AC and Thurston JR** (1984) *Use of bacteria and yeast to identify T lymphocytes in peripheral blood and lymphoid tissues of healthy guinea pigs and guinea pigs fed aflatoxin*, Am. J. Vet. Res., 45(9), 1795-1799.
- Mercer KL** (1993) *Connective Tissue In" Cell and Tissue Ultrastructure: A Functional Perspective"* W.H. Freeman and Company USA, 1993.
- Miller DM, Clark JD, Hatch RC and Jain AV** (1984) *Caprine aflatoxicosis: Serum electrophoresis and pathologic change*, Am. J. Vet. Res., 45(6), 1136-1141.
- Mohiuddin SM, Reddy MV, Reddy MM and Ramakrishna K** (1986) *Studies on phagocytic activity and haematological changes in aflatoxicosis in poultry*, Indian Vet. J., 63, 442-445.
- Monsonogo E, Halevy O, Gertler A, Volokita M, Schickler M, Hurwitz S and Pines M** (1993) *Growth Hormone Receptors in Avian Epiphyseal Growth-Plate Chondrocytes*, Gen and Comp. Endocrinol., 92, 179-188.
- Moore KL** (1983) *The Articular and skeletal systems*, In "The Developing human Clinically Oriented Embryology", Third edition, W.B.Saunders Company, 344-360.
- Neldon-Ortiz DL and Qureshi MA** (1992a) *The effect of direct and microsomal activated aflatoxin B<sub>1</sub> on chicken peritoneal macrophages in vitro*, Vet. Immunol. Immunopathol., 31, 61-76.
- Neldon-Ortiz DL and Qureshi MA** (1992b) *Effects of AFB<sub>1</sub> embryonic exposure on chicken mononuclear phagocytic cell functions*, Dev. Comp. Immunol., 16(2-3), 187-196.
- Newbrey JW, Baksi SN, Dhillon AS, Zimmerman NG, Truitt SG and Riedinger R** (1988) *Histomorphometry and Vit.D Metabolism of Valgus-Varus Deformity in Broiler Chickens*, Avian Dis., 32:704-712.
- Nizamhoğlu F** (1996) *Mikotoksin şüphesiyle laboratuvara getirilen yem ve yem hammaddelerinde aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> araştırılması*, Veterinarium, 7, 42-45.

- Norman AW and Hurwitz S (1993)** *The Role of Vit D Endocrine System in Avian Bone Biology*, American Institute of Nutrition, 310-316.
- Noyan A (1993)** *Hormonlar*, Fizyoloji, 977-1151, 8.Baskı, Ankara.
- Oğuz H (1997)** *Broyler yemlerine katılan polivinilpolipirolidon (PVPP)'un ve diğer bazı adsorbanlarla karışımlarının aflatoksikozise karşı koruyucu etkinliklerinin belirlenmesi*, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Oğuz H ve Kurtoğlu V (2000)** *Effect of clinoptilolite on performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis*, Br. Poult. Sci., 41, 512-517.
- Oğuz H, Keçeci T, Birdane YO, Önder F and Kurtoğlu V (2000a)** *Effect of clinoptilolite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis*. Res. Vet. Sci., 69, 89-93.
- Oğuz H, Kurtoğlu V ve Coşkun B (2000b)** *Preventive efficacy of clinoptilolite in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) exposure*. Res. Vet. Sci., 69, 197-201.
- Oğuz H, Hadimli HH, Kurtoğlu V ve Erganiş O (2003)** *Evaluation of humoral immunity of broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure*, Rev. Med. Vet., 154, 7, 483-486.
- Ohyama K, Farquharson C, Whitehead CC and Shapiro IM (1997)** *Further observations on programmed cell death in the epiphyseal growth plate : comparison of normal and dyschondroplastic epiphyses*. J. Bone and Min. Res. ,12,1647-1656.
- Okoye JOA, Asuzu and Gugnani HC (1988)** *Paralysis and lameness associated with aflatoxicosis in broilers*, Avian Pathol., 17, 731-734.
- Oliveira CAF, Kobashigawa E, Reis TA, Mestieri L, Albuquerque R and Corrêa B (2000)** *Aflatoxin B<sub>1</sub> residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin*, Food Ad. Cont., 17(6), 459-462.
- Olsson SE (1982)**. Morphology and physiology of the Growth Cartilage under Normal and Pathologic Conditions, Bone in Clinical Orthopedics A study In Comparative Osteology, Chapter 3, 159-195.
- Ortatatlı M ve Oğuz H (2001)** *Ameliorative effects of dietary clinoptilolite on pathological changes in broiler chickens during aflatoxicosis*, Res. Vet. Sci., 71,1,59-66.
- Ortatatlı M, Çiftçi MK, Tuzcu M and Kaya A (2002)** *The effects of aflatoxin on the reproductive system of roosters*, Res. Vet. Sci., 72, 1, 29 – 36.
- Orth MW (1999)** *The regulation of growth plate cartilage turnover*, J. Anim. Sci. ,77,183-189.

- Paker Ş (1990)** *Kemik Dokusu*, Genel Histoloji, 144-167, Uludağ Üniversitesi Basımevi.
- Pechak DG, Kujawa MJ and Caplan AI (1986a)** *Morphological and histochemical events during first bone formation in embryonic chick limbs.*, Bone, 441-458.
- Pechak DG, Kujawa MJ and Caplan AI (1986b)** *Morphology of bone development and bone remodeling in embryonic chick limbs*, Bone, 7, 459-472.
- Pellegrino ED and Biltz RM (1983)** *A chick bone model for evaluating radial bone growth I. effects of vitamin D3 deficiency.* Poult. Sci., 62, 2083-2087.
- Peterlik M and Wasserman RH (1978)** *Effect of vitamin D on transepithelial phosphate transport in chick intestine*, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 234: 379-388.
- Pines M (1999)** *Parathyroid Hormone Receptor Gene Expression in the Growth Plates of Tibial Dyschondroplasia and Rickets Afflicted Chick*, The Workshop On Metabolic Disorders In Poultry, 85, October 17-21 1999, İzmir.
- Plavnik I (1999)** *Early Age Growth Restriction and Leg Weaknesses in Broilers and Meat Turkeys*, The Workshop On Metabolic Disorders in Poultry, 66, October 17-21 1999, İzmir.
- Poole AR, Pidoux I, Reiner A, Choi H and Rosenberg LC (1984)** *Association of an Extracellular Protein (Chondrocalcin) with the Calcification of Cartilage in Endochondral Bone Formation.* J. Cell Biol., 54-65.
- Pouris AF, Magras IN and Petridis D (1998)** *Ossification and growth rates of the limb long bones during the prehatching period in the quail (Coturnix Coturnix japonica).* Anat. Histol. Embryol., 27, 61-63.
- Prelusky DB, Hamilton RMG, Foster BC, Trenholm HL and Thompson BK (1987)** *Optimization of chick embryotoxicity bioassay for testing toxicity potential of fungal metabolites*, J. Assoc. off Chem., 70(6), 1049-1055.
- Qureshi MA, Brake J, Hamilton PB, Hagler WM and Nesheim S (1998)** *Dietary exposure of breeders to aflatoxin results results in immune dysfunction in progeny chicks*, Poult. Sci., 77, 812-819.
- Ram KV, Rao DG and Rao PR (1988)** *Sequential gross and histological changes of bursa and thymus in acute and chronic experimental aflatoxicosis of broiler birds*, Indian J. Anim. Sci., 58(9), 1011-1018.
- Rao KS and Gehring PJ (1971)** *Acute toxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> in monkeys*, Toxicol. Appl. Pharmacol., 19, 169-175.

- Reddy RV, Taylor MJ and Sharma RP (1987)** *Studies of immune function of CD-1 mice exposed to aflatoxin B<sub>1</sub>*, *Toxicol.*, 43, 123-132.
- Reddy RV and Sharma RP (1989)** *Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> on murine lymphocytic functions*, *Toxicol.*, 54, 31-44.
- Reddy CV (1992)**. *Aflatoxins in feed: an enemy to poultry producers in the tropics*. *Misset World Poultry*, 8, 18-19.
- Rennie BYJS, Whitehead CC and Thorp BH (1993)** *The effect of dietary 1,25-dihydroxycholecalciferol in preventing tibial dyschondroplasia in broiler fed on diets imbalanced in calcium and phosphorus*. *Br. J. Nutrition.*, 69,809-816.
- Riddell C (2003)** Erişim Tarihi: 5.10. 2003, [http://caltest.nbc.upenn.edu/poultry/Syllabus/page37\\_44.htm](http://caltest.nbc.upenn.edu/poultry/Syllabus/page37_44.htm) 31k
- Roach HI, Erenpreisa J, Aigner T (1995)** *Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis*. *J. Cell Biol.*, 131, 483-494.
- Robb J (1993)** *Mycotoxins*, In Practice, November, 278-279.
- Sahoo PK, Chattopadhyay SK, Johrp TS, Charan K and Sikdar A (1993)** *Pathology of experimental aflatoxicosis in rabbits*, *Indian J. Anim. Sci.*, 63(3), 268-273.
- Sağlam M, Aştı RN, Özer A (1997)** *Kemik Dokusu*, Genel Histoloji, 181-204, 5.Baskı, Yorum Matbaacılık Sanayi, Ankara.
- Samarajeewa U, Sen AC, Cohen MD and Wei CI (1990)** *Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods*, *J. of Food Prot.*, 53,6,489-501.
- Schell TC, Lindeman MD, Kornegay ET, Blodgett DJ (1993)** *Effects of feeding aflatoxin-contaminated diets with and without clay to weanling and growing pigs on performance , liver function and mineral metabolism*, *J. Anim. Sci.*, 71, 1209-1218.
- Seahorn TL (1997)** *How to Manage Nutritional Secondary Hyperparathyroidism in Horses*, *Vet. Med.*, November, 978-985.
- Shank RC, Johnson DO, Tanticheroenyos P, Wooding WL and Bourgeois CH (1971)** *Acute toxicity of aflatoxin B<sub>1</sub> in the Macaque monkey*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 20, 227-231.
- Slatter D (1985)** *Bone and Bone Formation*, Textbook of Small Animal Surgery, Second Edition, Volume II.
- Slowik J, Graczyk S and Madej JA (1985)** *The effect of a single dose of aflatoxin B<sub>1</sub> on the value of nucleolar index of blood lymphocytes and on histological changes in the liver, bursa Fabricii, suprarenal glands and spleen in ducklings*, *Folia Histochem. Cytobiol.*, 23(1-2), 71-80.



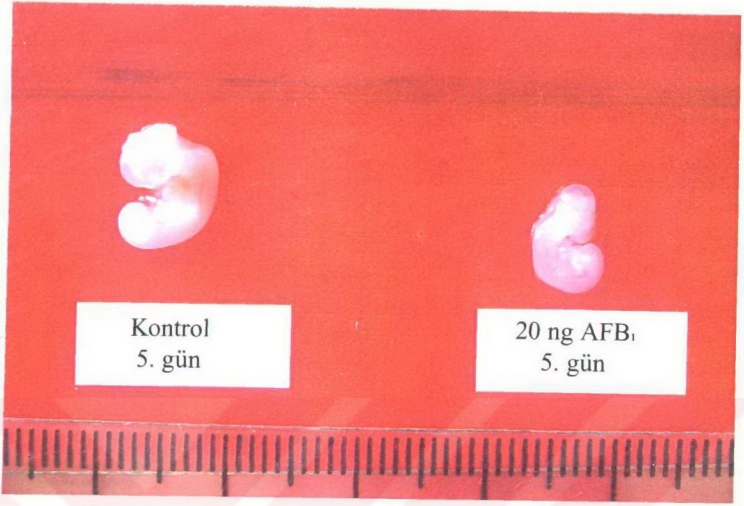
- SPSS Base System (1997)** *Syntax Reference Guide*, Release 8.0. Copyright by Spss Inc.
- Stevens A (1990)** *Pigments and minerals*, In "The Theory and Practice of Histological Techniques", Eds. By JD Bancroft and A Stevens, 245-267.
- Stevens A, Lowe J and Bancroft JD (1990)** Bone, In "The Theory and Practice of Histological Techniques", Eds. By JD Bancroft and A Stevens, 309-341.
- Steward RG, Skeeles JK, Wyatt RD, Brown J, Page RK, Russel ID and Lukert PD (1985)** *The effect on aflatoxin on complement activity in broiler chickens*, *Poult. Sci.*, 64, 616-619.
- Stoloff L, Verret MJ, Dantzman J and Reynaldo EF (1972)** *Toxicological study of aflatoxin P<sub>1</sub> using the fertile chicken egg*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 23, 528-531.
- Stubblefield RD, Pier AC, Richard JL and Shotwell OL (1983)** *Fate of aflatoxins in tissues, fluids and excrements from cows dosed orally with aflatoxin B<sub>1</sub>*, *Am. J. Vet. Res.*, 44(9), 1750-1752.
- Sudhakar BV (1992)** *The carry-over effect of aflatoxin B<sub>1</sub> into eggs and liver of chicken*, *Indian Vet. J.*, 69, 1061-1062.
- Suliman HB, Mohammed AF, Awadelsied NA and Shommein AM (1987)** *Acute mycotoxicosis in sheep: Field cases*, *Vet. Hum. Toxicol.*, 29(3), 241-243.
- Summerlee AJS (2001)** *Bone formation and development*, In "Bone in Clinical Orthopedics", Summer Smith G (Ed), 2<sup>nd</sup>, Ed AO Publish, USA, Newyork.
- Sur E (2001)** *Yumurtaya verilen Aflatoksin B<sub>1</sub> ' in tavukların lenfoid organlarının embriyonal gelişimi üzerindeki etkilerinin enzim histokimyasal yöntemlerle araştırılması*, Doktora Tezi, S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Sur E ve Çelik İ (2003)** *Effects of aflatoksin B<sub>1</sub> on the development of bursa of Fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken*, *Br. Poult. Sci.*, 44, 4, 558-566.
- Syftestad GT, Weitzhandler M and Caplan AI (1985)** *Isolation and characterization of osteogenic cells derived from first bone of the embryonic tibia*. *Developmental Biology*, 110, 275-283.
- Şanlı Y (1995)** *Mikotoksinler*, Özel Toksikoloji Kitabı, Ed. Sezai Kaya, 283-328.
- Thaxton JP, Tung HT and Hamilton PB (1974)** *Immunosuppression in chickens by aflatoxin*, *Poult. Sci.*, 53, 721-725.
- Tachetti C, Quarto R, Nitsch L, Hartmann DJ and Cancedda R (1987)** *In vitro morphogenesis of chick embryo hypertrophic cartilage*. *J. Cell Biol.*, 105, 999-1006.

- Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı (1997)** *Aflatoksin kontrolüne dair tebliğ*, Resmi Gazete, 16 Kasım 1997 tarihli mükerrer yazı.
- Tekelioğlu M (1993)** *Kemik Dokusu*, Genel Tıp Histolojisi, 138-146, 2. Baskı, Ankara.
- Trucksess MW, Stoloff L, Young K , Wyatt RD and Miller BL (1983)** *Aflatoxicol and aflatoxins B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub> in eggs and tissues of laying hens consuming Aflatoxin- contaminated feed*. Poul. Sci., 62, 2176-2182.
- Tuncer N (1987)** *Ankara çevresinde üretilen yumurta örneklerinde aflatoksin rezidülerinin araştırılması*, Etlik Vet. Mik. Derg., 6(1), 101-116.
- Tuzcu M (1999)** *Aspergillus parasiticus NRLL 2999 suşu ile küflendirilmiş bulgurlarla beslenen beyaz farelerdeki patolojik bulgular*, Doktora Tezi, SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Van Halderen A, Green JR, Marasas WFO, G'thiel PG and Stockenstrom S (1989)** *A field outbreak of chronic aflatoxicosis in dairy calves in the Western Cape Province*, Tydski S. Afr. Vet. Ver., 60(4), 210-211.
- Verret MJ, Marliac JP and McLoughlin J (1964)** *Use of the chicken embryo in the assay of aflatoxin toxicity*, J AOAC, 47(6), 1003-1006.
- Walser MM, Allen NK, Mirocha CJ, Hanlon GF and Newman JA (1982)** *Fusarium-induced osteochondrosis (tibial dyschondroplasia) in chickens*. Vet. Pathol., 19,544-550.
- Wardale RJ and Duance VC (1996)** *Collagen expression in chicken tibial dyschondroplasia*. J. Cell Sci., 109, 1119-1131.
- Williams B, Waddington D, Solomon S, Thorp B, Farquharson C (1999)** *Bone Development and Mineral Nutrition in Broilers*, The Workshop On Metabolic Disorders In Poultry, 67-72, October 17-21 1999, İzmir.
- Wilson S and Duff SRI (1991)** *Effect of Vitamin or Mineral deficiency on the morphology of medullary bone in laying hens*, Res. Vet. Sci., 50, 216-221.
- Wogan GN (1977)** *Mode of action of aflatoxin*, In "Mycotoxin in human and animal health", Pathotox Publ., Inc., Pork forest South, Illinois, pp: 29-36.
- Wyatt CL and Jensen LS (1990)** *Effect of Feeding Isoniazid and Cimetidine on Growth and Bone Development in Male Broiler Chicks*, Poul. Sci., 69: 1271-1280.
- Yakışık M. (1992).** *Aflatoksin B<sub>1</sub> verilmiş Newcastle'a aşılı civcivlerde karaciğer paranzimi üzerinde ışık mikroskopik incelemeler*. U.Ü. Vet. Fak. Derg., 11, 2, 43-51.
- Yılmaz B (1999)** *Hipofiz, Hormonlar ve Üreme Fiziyojisi*, 36-79, Tuğra Ajans, Feryal Matbaacılık, Ankara.

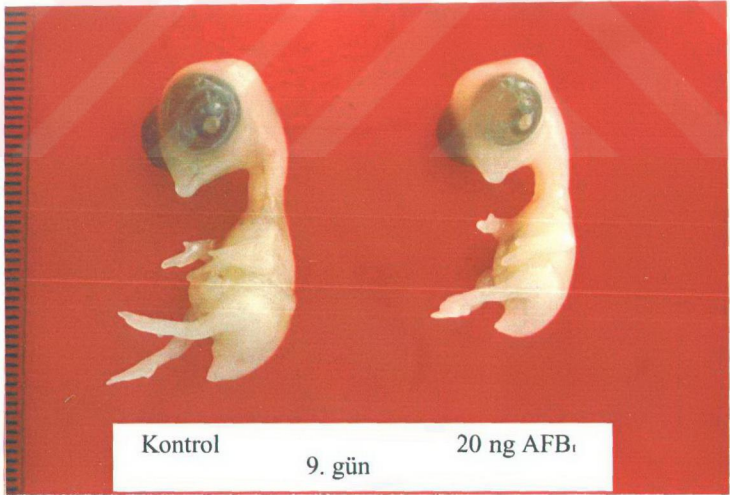
**Yiğit MF (1998)** *Van kedilerinde epifizeal plakların kapanma sürelerinin radyolojik olarak belirlenmesi üzerine çalışmalar.* Doktora Tezi, Y.Y.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van.



## 9.ŞEKİLLER



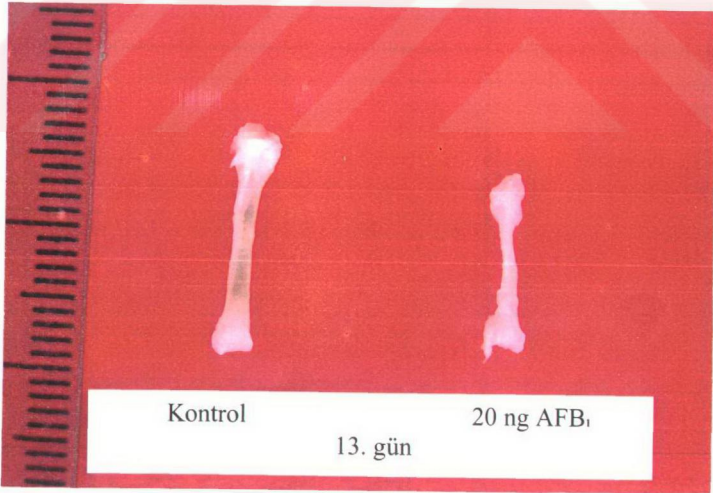
Şekil 1: Kuluçkanın beşinci gününde kontrol ve 20 ng AFB<sub>1</sub> grubuna ait embriyolar görülmektedir. AFB<sub>1</sub> verilen embriyodaki gelişme geriliği oldukça belirgindir.



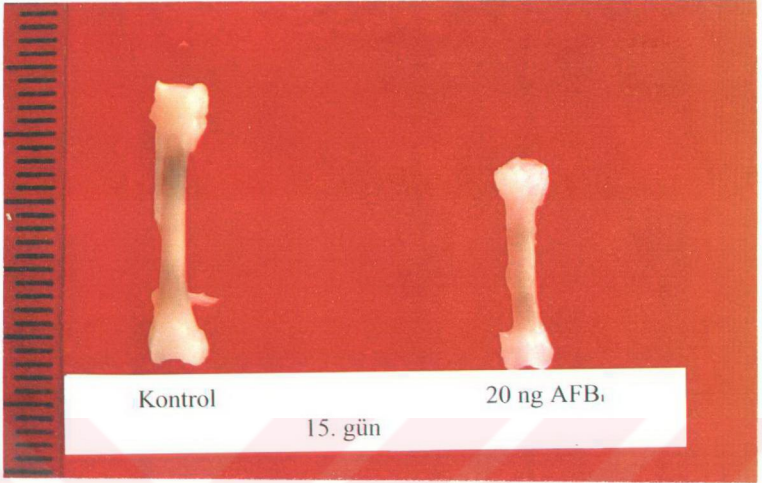
Şekil 2: Kuluçkanın dokuzuncu gününde kontrol ve 20 ng AFB<sub>1</sub> grubuna ait embriyolar görülmektedir. 20 ng AFB<sub>1</sub> verilen embriyodaki gelişme geriliği oldukça belirgindir.



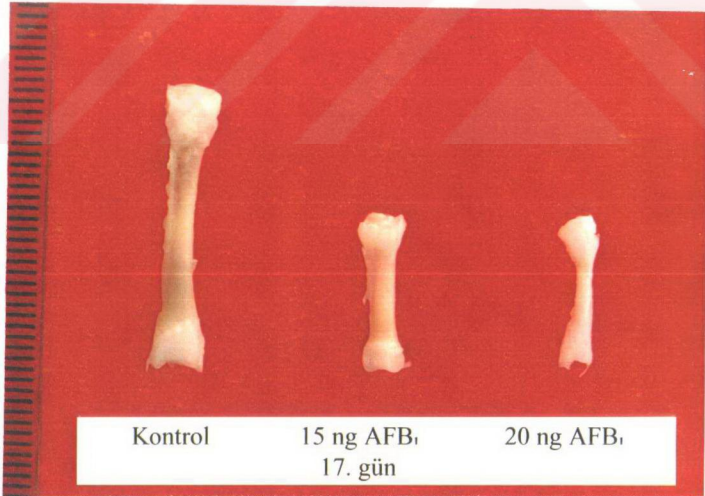
Şekil 3: 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubunda kuluçkanın on dokuzuncu günündeki bir embriyo görülmektedir. Makas gaga ve unilateral anofalmi görülmektedir.



Şekil 4: Kuluçkanın on üçüncü gününde kontrol ve 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuna ait embriyoların tibiaları görülmektedir. AFB<sub>1</sub> grubuna ait tibia'nın daha küçük olduğu dikkati çekmektedir.



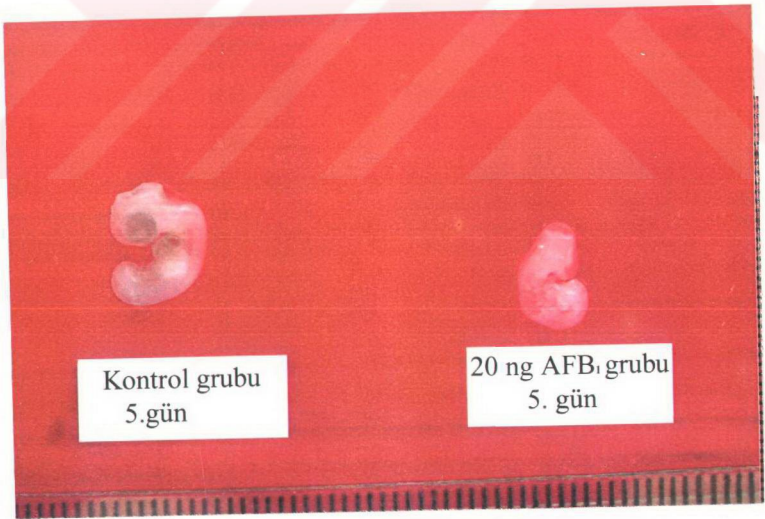
Şekil 5: Kuluçkanın on beşinci gününde kontrol ve 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuna ait embriyoların tibiaları görülmektedir. AFB<sub>1</sub> verilen gruba ait tibia'nın daha küçük olduğu dikkati çekmektedir.



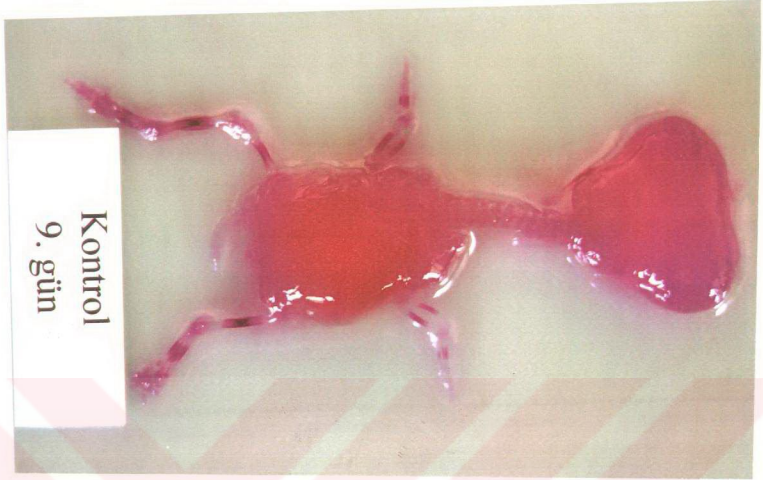
Şekil 6: Kuluçkanın on yedinci gününde kontrol, 15 ng ve 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta gruplarına ait embriyoların tibiaları görülmektedir. AFB<sub>1</sub> verilen gruplara ait tibiaların daha küçük oldukları dikkati çekmektedir.



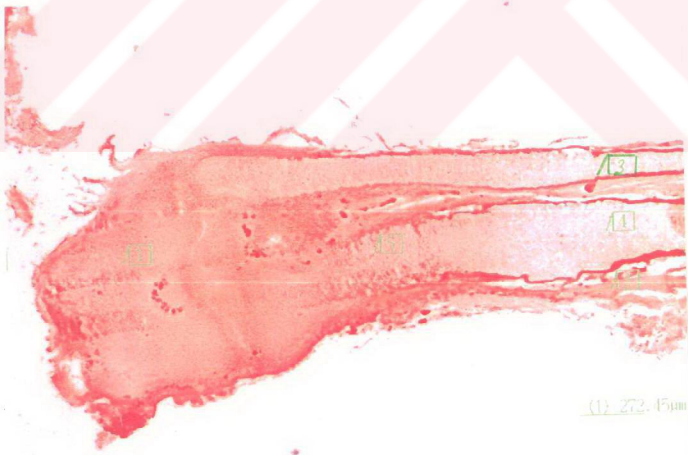
Şekil 7: Kuluçkanın on dokuzuncu gününde kontrol ve 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta gruplarına ait embriyoların tibiaları görülmektedir. AFB<sub>1</sub> verilen gruba ait tibia'nın daha küçük olduğu dikkati çekmektedir.



Şekil 8: Kuluçkanın beşinci gününde kontrol ve 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta gruplarına ait embriyolar görülmektedir. Bu dönemde her iki gruptan alınan embriyolarda da ossifikasyon odaklarının henüz şekillenmediği dikkati çekmektedir. Alizarin Red- S boyaması

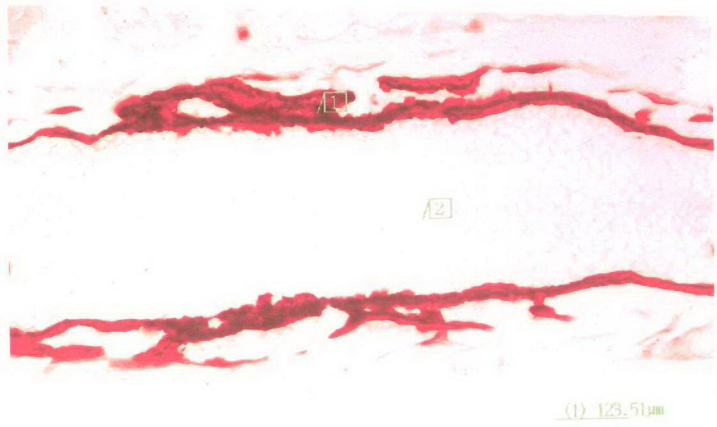


Şekil 9: Kuluçkanın dokuzuncu gününde kontrol grubuna ait bir embriyo görülmektedir. Tibia'nın diafizinde yedinci günde şekillenen ossifikasyon sahasının genişlemiş olduğu görülmektedir. Alizarin Red- S boyaması.

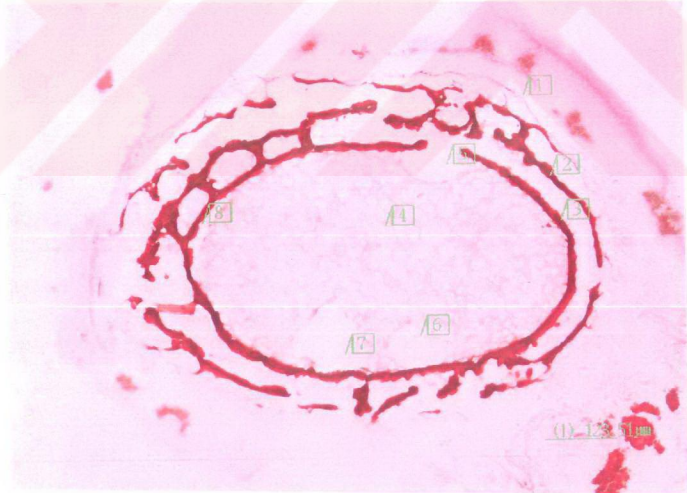


Şekil 10: 15 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuna ait 9 günlük bir embriyonun tibiasından alınan kesit görülmektedir. Periosteumdan (2) köken alan subperiostal kemik trabekülleri (3) görülmektedir. 1. Epifiz, 4-5. Hipertrofik kondrositler. Alizarin Red- S boyaması, Bar: 272.45µm.

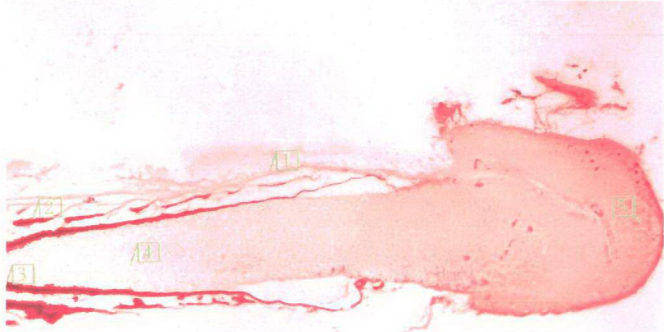




Şekil 11: Kontrol grubuna ait 9 günlük bir embriyonun tibiasından alınan kesit görülmektedir. Subperiostal kemik trabekülleri (1) ve kıkırdak modelin merkezi bölümünü dolduran hipertrofik kondrositler (2) görülmektedir. Alizarin Red- S boyaması, Bar: 123.51 µm.



Şekil 12: Kuluçkanın on birinci gününde solvent grubuna ait bir embriyonun tibiasından alınan transversal kesit görülmektedir. Periosteum'un (1) altında, kıkırdakçı manşon biçiminde saran mineralize sahadan ( 2,3) hipertrofik kondrositlerden oluşan merkezi kıkırdak (4) içine vasküler invazyon (5,6,7,8) başlamış durumdadır. Alizarin Red- S boyaması, Bar: 123.51 µm.



Şekil 13: Kuluçkanın on birinci gününde kontrol grubuna ait bir embriyonun tibiasının longitudinal kesiti görülmektedir. Tibiada hipertrofik kondrositlerden oluşan (4) kırkırdak konisi görülmektedir. 1.Periosteum, 2. Subperiostal kemik trabekülü, 3. Koninin uç kısımlarındaki mineralizasyon sahası. Alizarin Red- S boyaması, Bar: 332,33 µm.

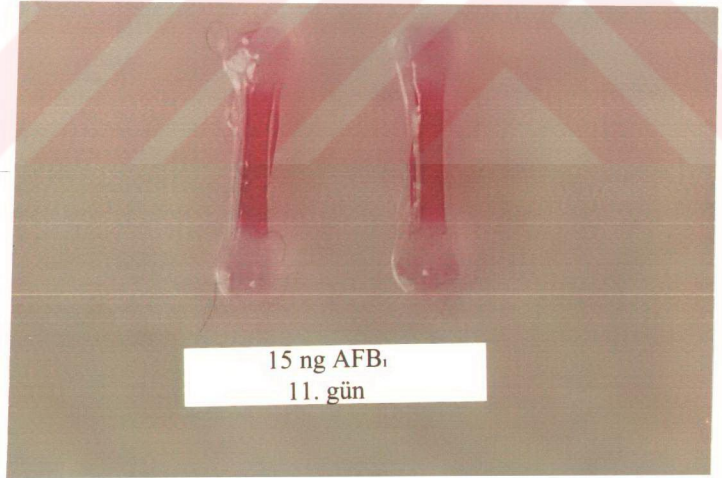


(1) 332,33µm

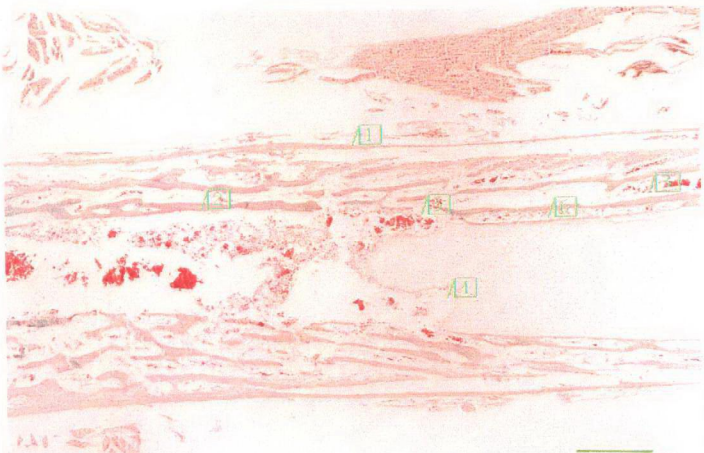
Şekil 14: Kuluçkanın on birinci gününde kontrol grubundan bir embriyonun tibia kesiti görülmektedir. Periosteum'un (1) hemen altından itibaren kemik trabekülleri (2) ile bunların arasında şekillenen ve kemik iliğinin dolduracağı alanlar (3,4) ve kırkırdak konilerinin tepe bölgelerindeki güçlü ossifikasyon sahaları (5,6) görülmektedir. Alizarin Red- S boyaması, Bar: 332,33 µm.



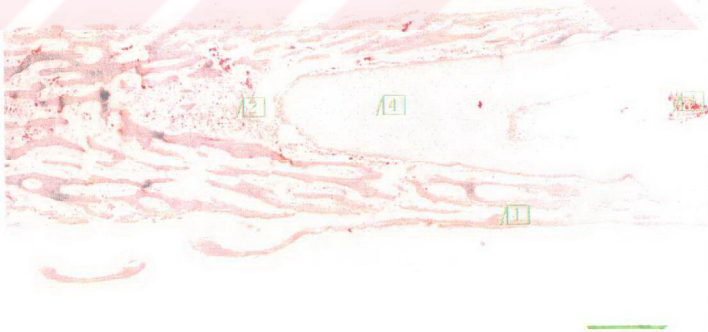
Şekil 15: Kuluçkanın on birinci gününde kontrol grubuna ait bir embriyonun tibiaları görülmektedir. Diyafizdeki geniş ossifikasyon sahası görülmektedir. Alizarin Red- S boyaması.



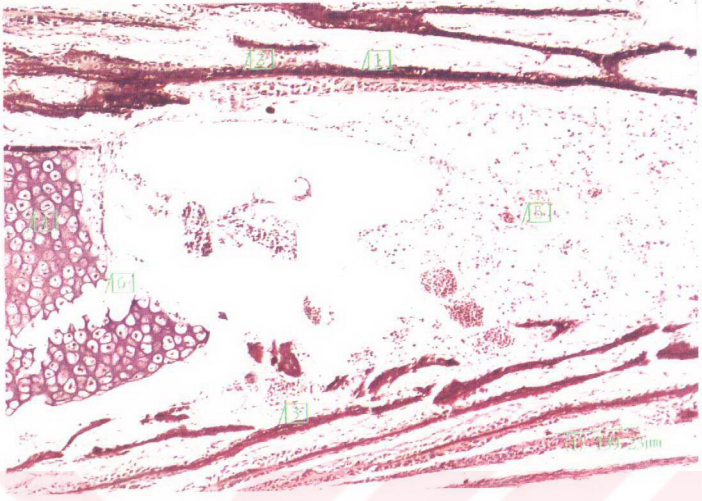
Şekil 16: Kuluçkanın on birinci gününde 15 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuna ait bir embriyonun tibiaları görülmektedir. Tibia'nın nispeten küçük olduğu ancak ossifikasyonda aksama olmadığı dikkati çekmektedir. Alizarin Red- S boyaması.



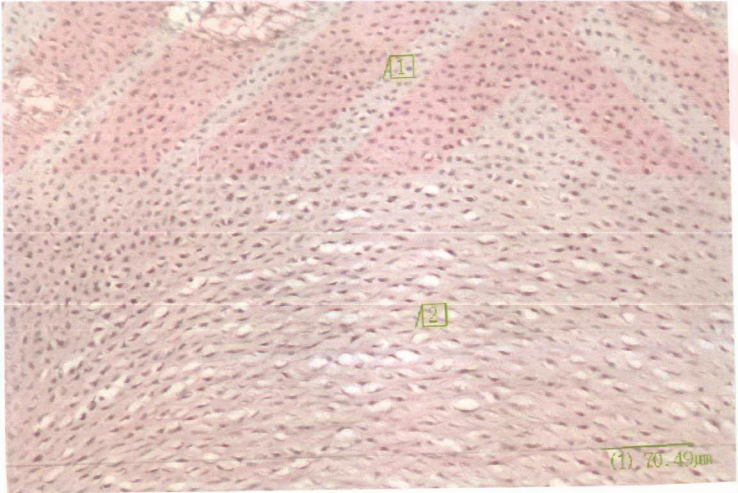
**Şekil 17:** Kuluçkanın on üçüncü gününde 2.5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuna ait bir embriyonun tibia kesiti görülmektedir. Periosteumdan (1) köken alan primer kemik dokusu yapısındaki geniş trabeküller (2) ile bunların aralarındaki kan damarları ağı (3,6) ve kemik iliği boşluğunun (4,5) diyafiz boyunca şekillenmiş olduğu görülmektedir. Üçlü boyama, Bar: 332,33 µm.



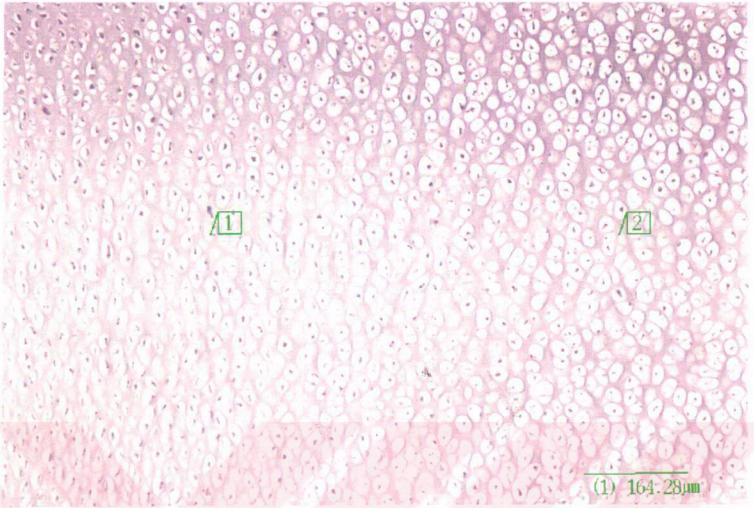
**Şekil 18:** Kontrol grubuna ait 13 günlük embriyonun tibiasından alınan kesit görülmektedir. Koni biçimindeki kırırdağa az sayıda kan damarının (3) invaze olduğu dikkati çekmektedir. 1. Periosteum, 2. Kemik iliği, 4. Hipertrofik kondrositler. Üçlü boyama, Bar: 332,33 µm.



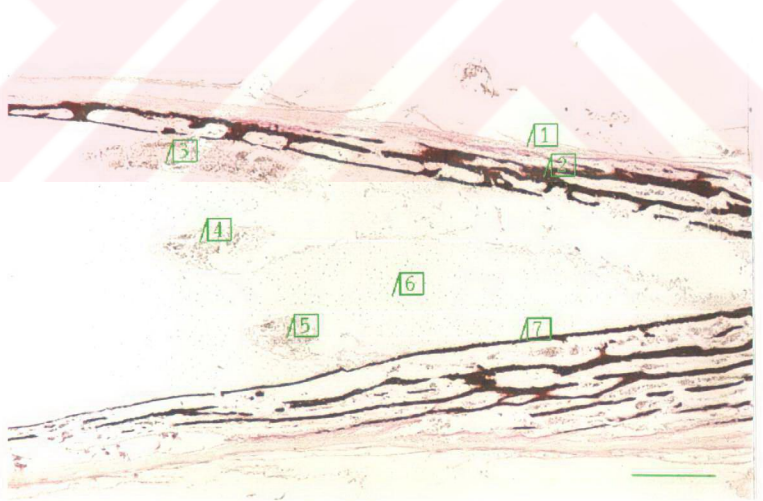
Şekil 19: Solvent grubuna ait 13 günlük embriyonun tibiasından alınan kesit görülmektedir. Primer kemik trabekülleri (1,2,3) ile kırıkdağ kütlesinin (4) yüzeyinde yoğun bir osteoblastik aktivite görülmektedir. Ayrıca kemikliliği (5) ve kırıkdağa invaze olan kan damarı da (6) görülmektedir. Hematoksilen-Eozin, Bar: 139,23 µm.



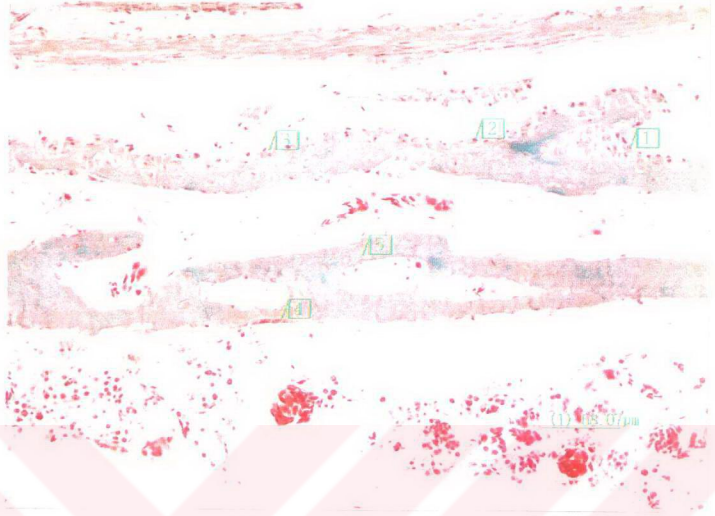
Şekil 20: 5 ng AFB<sub>1</sub> grubuna ait 13 günlük embriyonun tibiasından alınan kesit görülmektedir. Epifiz kırıkdağı (1) ve proliferatif zon (2) görülmektedir. Hematoksilen-Eozin, Bar:70.49 µm.



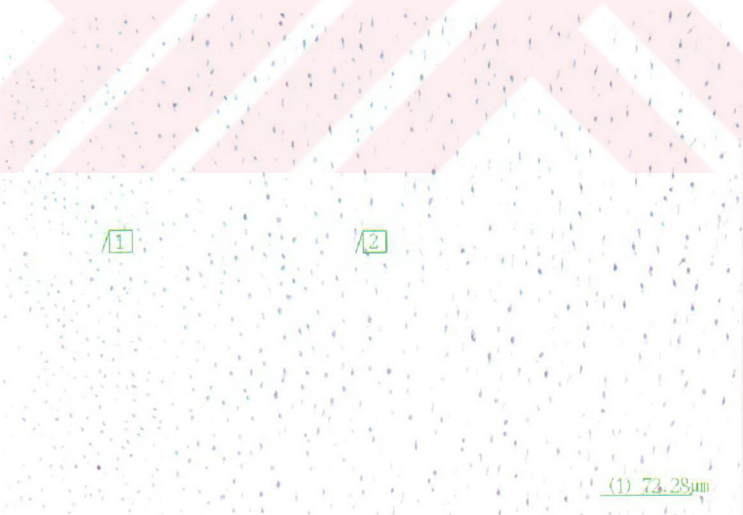
Şekil 21: 5 ng AFB<sub>1</sub> grubuna ait 13 günlük embriyonun tibiasından alınan kesit görülmektedir. Transizyonel zon (1) ve hipertrofik zon (2) görülmektedir. Hematoksilen-Eozin, Bar:164.28 μm.



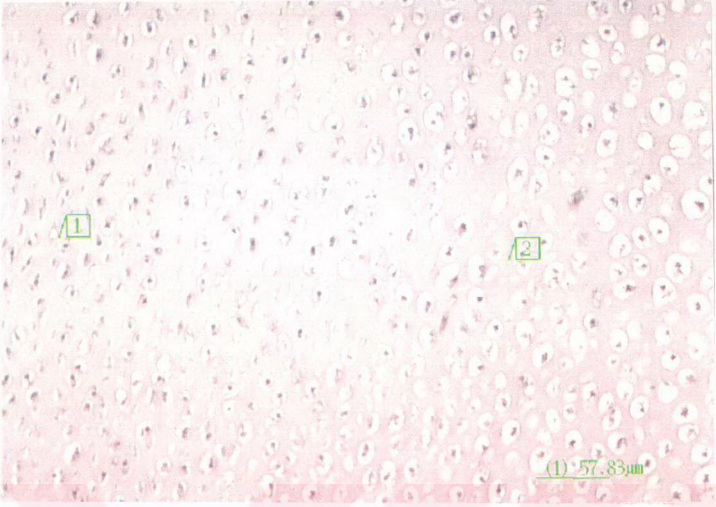
Şekil 22: İnkübasyonun on beşinci gününde kontrol grubuna ait bir embriyonun tibia kesiti görülmektedir. Primer kemik doku trabeküllerinin (2) periost (1) ile kıkırdak kitlesi (6) arasında yayıldığı, kıkırdak kitlesinin bütünlüğünün bozulmamış olduğu ancak çok sayıda kan damarının (3,4,5) invaze olduğu görülmekte ve kıkırdak koni yüzeyinde güçlü bir ossifikasyon (7) dikkati çekmektedir. Von Cossa boyaması, Bar: 314,37 μm.



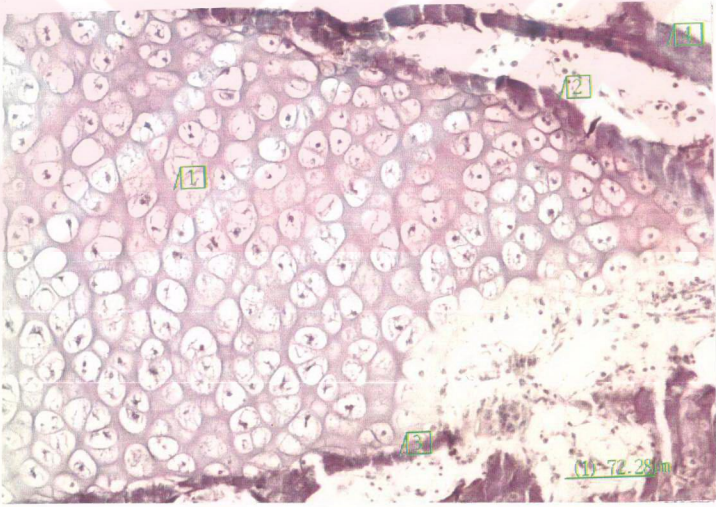
Şekil 23: 2.5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuna ait 15 günlük embriyonun tibiasından alınan kesit görülmektedir. Primer kemik dokusundan oluşan trabeküllerin (5) yüzeylerinde yoğun osteoblastik aktivite (1, 2, 3, 4) dikkati çekmektedir. Üçlü boyama, Bar: 68,07μm.



Şekil 24: : Kuluçkanın on beşinci gününde 17.5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuna ait bir embriyonun tibia kesiti görülmektedir. Epifiz kırırdağı (1) ve proliferatif zon (2) görülmektedir. Hematoksilen-Eozin, Bar: 72,28 μm.

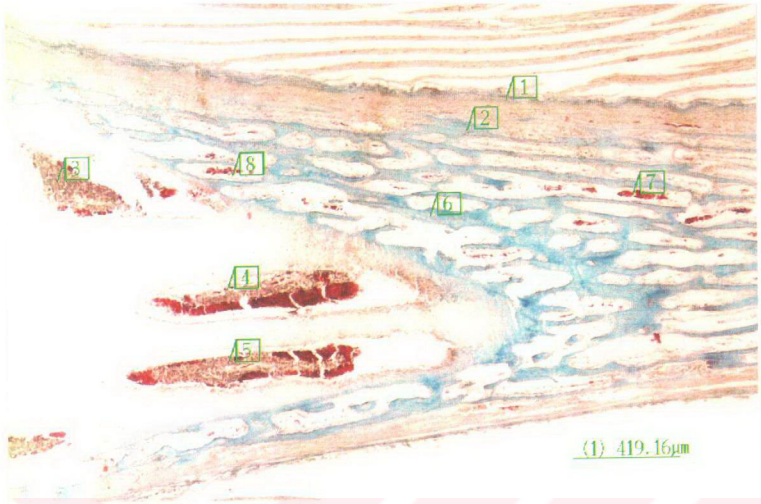


Şekil 25: İnkübasyonun on beşinci gününde 17.5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuna ait bir embriyonun tibia kesiti görülmektedir. Proliferatif zon (1) ve tranzisyonel zon görülmektedir. Hematoksilen-Eozin, Bar: 57,83 μm.



Şekil 26: Kuluçkanın on beşinci gününde 17.5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuna ait bir embriyonun tibia kesiti görülmektedir. Büyüme plakasındaki hipertrofik kondrositler (1) ve kıkırdak yüzeyindeki kemikleşme sahaları (2, 3) ile primer bir kemik trabekülü (4) belirgindir. Hematoksilen-Eozin , Bar: 72,28 μm.

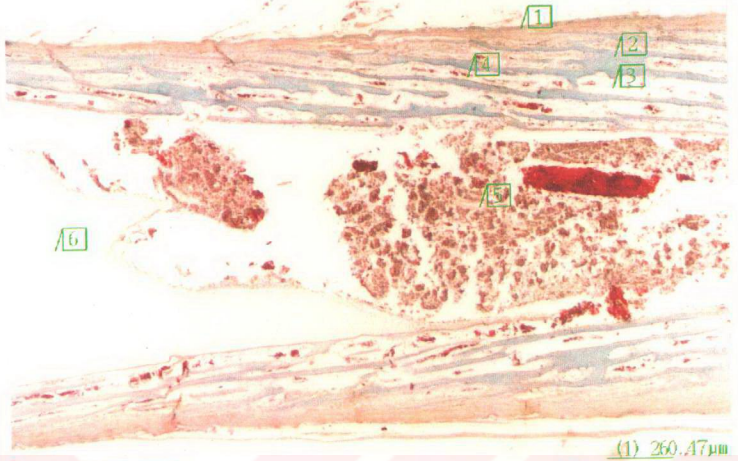




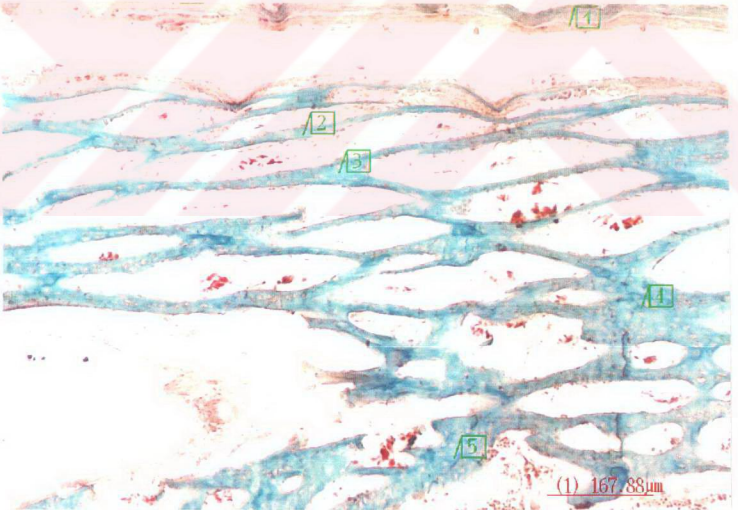
Şekil 27: Kontrol grubuna ait 17 günlük embriyonun tibiasından alınan kesit görülmektedir. Periosteum (1) ile kırıkdağ kitlesi arasında gelişen primer kemik dokusu özelliğindeki trabeküller genişlemiş durumda (2, 6), kırıkdağa daha fazla sayıda kan damarının (3, 4, 5) penetre olduğu, trabeküller arasında da yaygın bir vaskülarizasyon (7, 8) dikkati çekmektedir. Üçlü boyama, Bar: 419,16 μm.



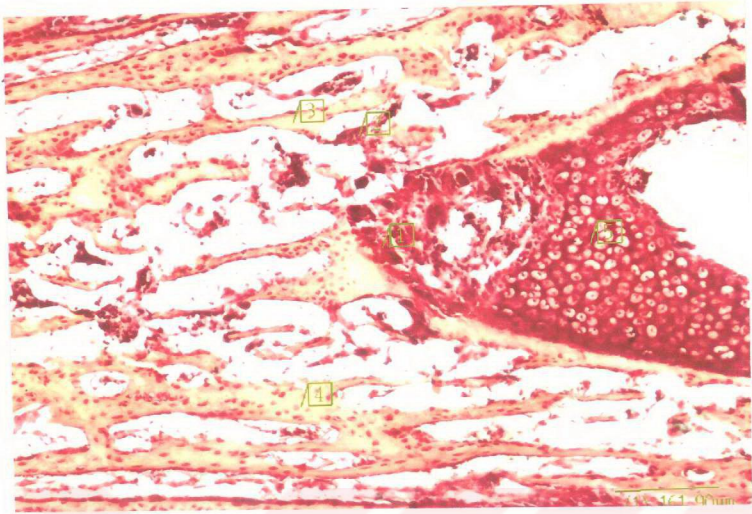
Şekil 28: Kontrol grubuna ait 17 günlük embriyonun tibiasından alınan kesit görülmektedir. Koni biçimindeki kırıkdağ kütesinin bu dönemde de bütünlüğünün bozulmadığı dikkati çekmektedir. 1. Periosteum, 2. Subperiostal kemik trabekülü, 3. Hipertrofik kondrosit sahası, 4-5. Kırıkdağa invaze olan kan damarları dikkati çekmektedir. Hematoksilen- Eozin, Bar: 314,37 μm.



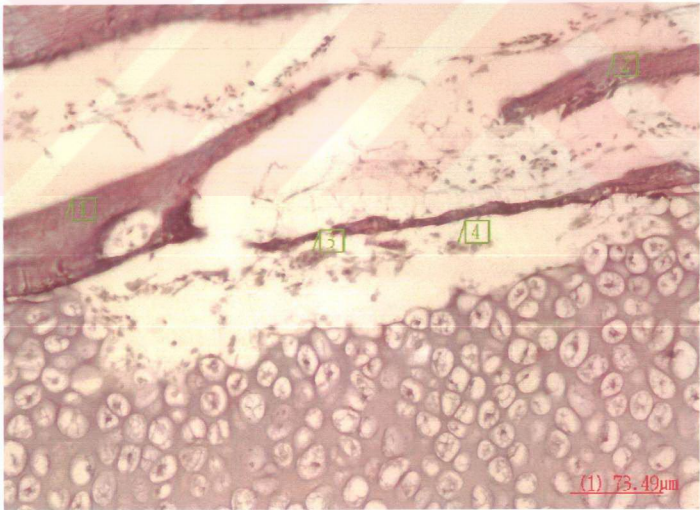
Şekil 29: Kontrol grubuna ait 17 günlük embriyonun tibiasından alınan kesit görülmektedir. Miyeloid dokunun (5) metafize doğru yayılmış olduğu dikkati çekmektedir. 1. Periosteum, 2. Kemik Trabekülü, 3-4. Trabeküller arasındaki kan damarları, 6. Hipertrofik kondrosit zonu. Üçlü Boyama, Bar: 260,47 µm.



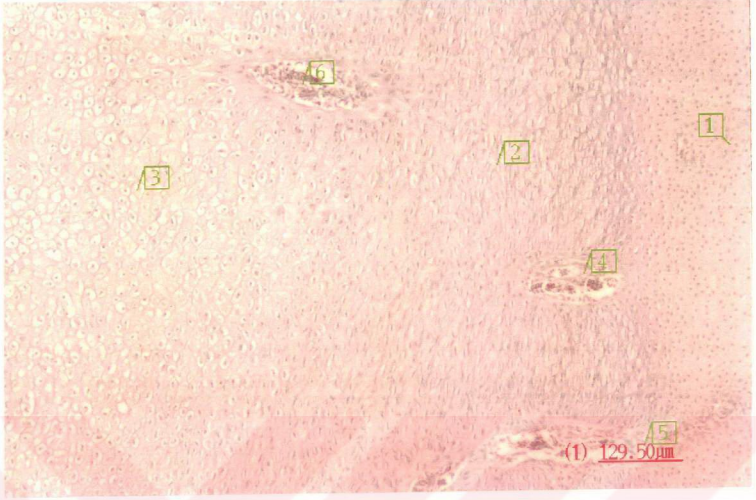
Şekil 30: Kuluçkanın on dokuzuncu gününde 5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuna ait bir embriyonun tibia kesiti görülmektedir. Primer kemik dokusu (4, 5) ile birlikte sekonder kemik dokusunun da (2,3) şekillenmiş olduğu dikkati çekmektedir. 1.Periosteum. Üçlü Boyama, Bar: 167,88 µm.



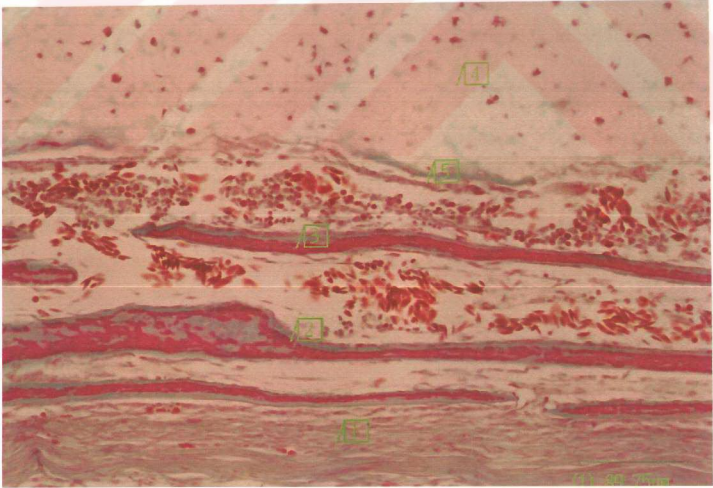
Şekil 31: İnkübasyonun on dokuzuncu gününde 5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuna ait bir embriyonun tibia kesiti görülmektedir. Primer kemik dokusu (2) yanında sekonder kemik dokusu (3, 4) özelliğindeki trabeküller de görülmektedir. 1.Yıkılanmakta olan kıkırdak dokusu, 5. Hipertrofik kondrosit zonu, Nicoll'ün kemik boyaması, Bar: 161,90 µm.



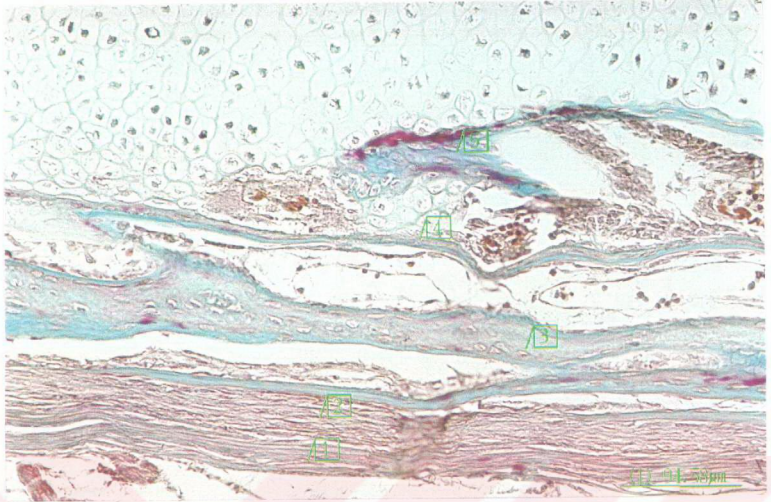
Şekil 32: Kuluçkanın on dokuzuncu gününde 2.5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuna ait bir embriyonun tibia kesiti görülmektedir. Kondroklastlar (3,4) tarafından kıkırdak dokusunun yıkılanması ve kemik dokusunun (1, 2) yapımı görülmektedir. Hematoksilen-Eosin, Bar: 73,49 µm.



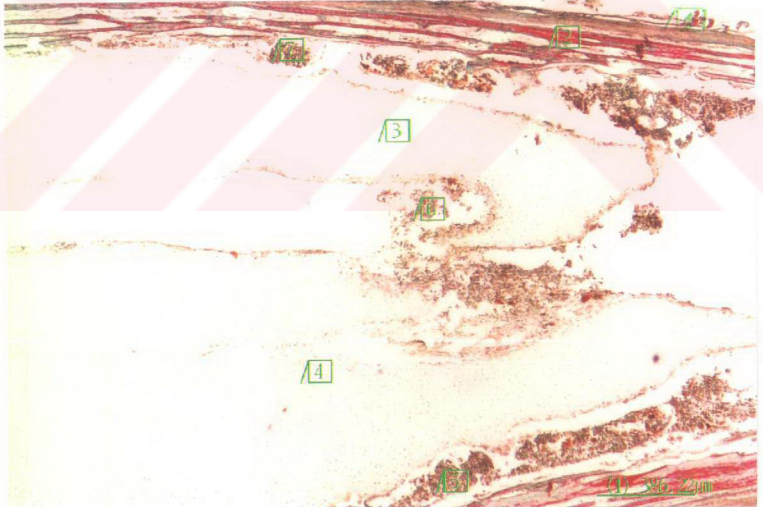
Şekil 33: Kuluçkanın on dokuzuncu gününde 5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuna ait bir embriyonun tibia kesiti görülmektedir. Büyüme plakasındaki epifizyal (4, 5) ve tranzisyonel zona invaze olmuş kan damarları kesitleri (6) görülmektedir. 1. Epifiz, 2. Büyüme plakasının proliferatif zonu, 3. Tranzisyonel zon. Hematoksilen-Eosin, Bar: 129,50 µm.



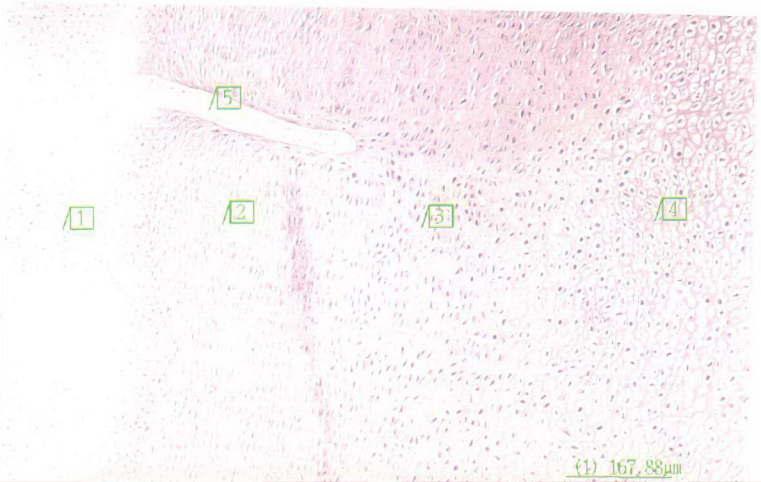
Şekil 34: Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubuna ait bir civcivin tibia kesiti görülmektedir. Kemik dokusunun sekonder kemik yapısında olduğu (2, 3) dikkati çekmektedir. 1. Periosteum, 4. Hipertrofik zon, 5. Kan damarı. Üçlü boyama, Bar: 89,75 µm.



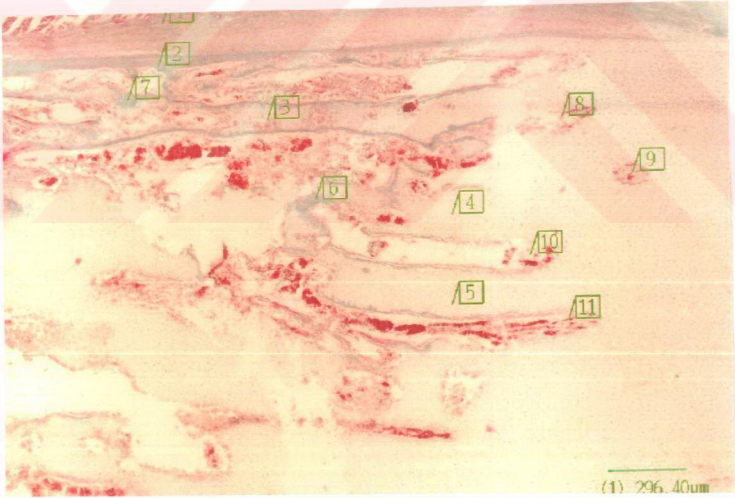
**Şekil 35:** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubuna ait bir civcivin tibia kesiti görülmektedir. Kıkırdak dokusunun yıkılanmasıyla oluşan primer kemik dokusu trabekülleri (4, 5) görülmektedir. 1. Periosteum'un ipliksel katmanı, 2. Periosteum'un hücresel katmanı, 3. Sekonder kemik trabekülü. Üçlü boyama, Bar: 94,58 µm.



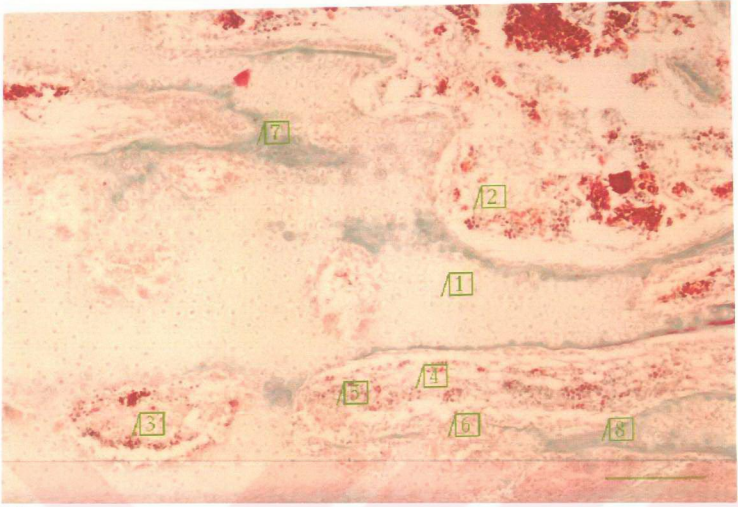
**Şekil 36:** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubuna ait bir civcivin tibia kesiti görülmektedir. Embriyonik dönem boyunca varlığını sürdüren koni şeklindeki kıkırdak kütesinin (3, 4) kan damarlarının invazyonu ile (5, 6, 7) bütünlüğünün bozulmaya başladığı dikkati çekmektedir. 1. Periosteum, 2. Sekonder kemik trabekülü. Üçlü boyama, Bar: 386,22 µm.



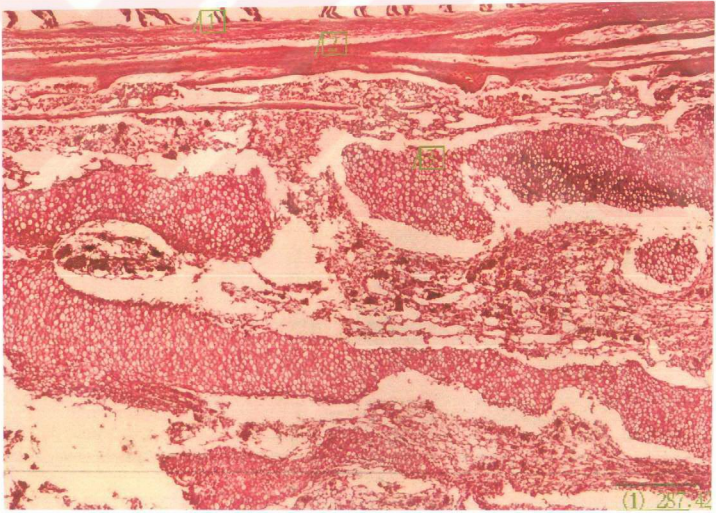
**Şekil 37:** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde solvent grubuna ait bir civcivin tibia kesiti görülmektedir. Büyüme plakasında embriyonik dönem boyunca gözlenmemiş olan rezerv zon (2) ile proliferatif zon (3), tranzisyonel zon (4), epifiz kırıkdağı (1) ve büyüme plakasına invaze olan epifizyal bir damar kesiti (5) izlenmektedir. Hematoksilen-Eozin , Bar: 167,88 µm.



**Şekil 38:** Kuluçkadan çıkışı takip eden birinci haftada kontrol grubuna ait bir civcivin tibia kesiti görülmektedir. Metafizyal vaskülarizasyonun oldukça ilerlemiş olduğu ve bu damarların tranzisyonel zon ile hipertrofik zonun birleşme hattına kadar penetre oldukları (8, 9, 10, 11) dikkati çekmektedir. 1. Periosteum, 2. Sekonder kemik trabekülü, 3. Yıkılanmakta olan kırıkdağı, 4-5 Hipertrofik Kondrosit zonu, 6-7. Primer kemik dokusu. Üçlü boyama, Bar: 296,40 µm.



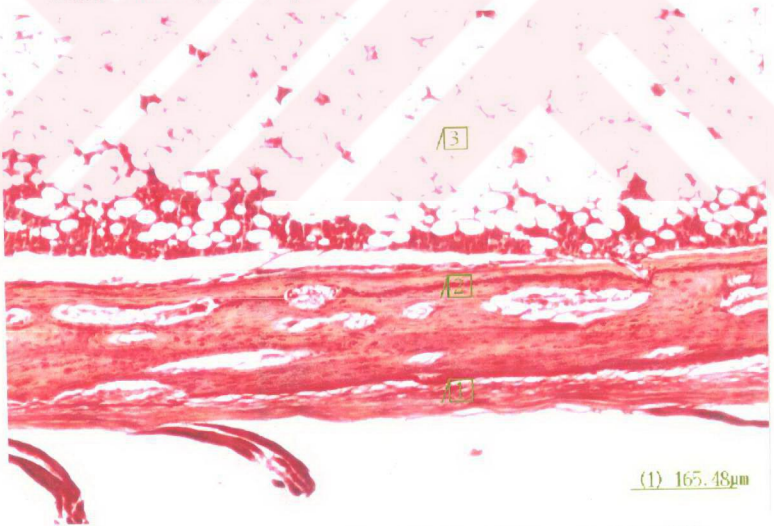
Şekil 39: Kuluçkadan çıkışı takip eden birinci haftada 2.5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuna ait bir civcivin tibia kesiti görülmektedir. Kan damarlarının invazyonu (2, 3, 4, 5, 6) ile kırıkdağ dokunun rezorpsiyonu sonucunda yeni şekillenen primer kemik dokusu (7, 8) sahaları dikkati çekmektedir. Üçlü boyama, Bar: 149,89µm.



Şekil 40: Kuluçkadan çıkışı takip eden birinci haftada delinip-kapatılan gruba ait bir civcivin tibia kesiti görülmektedir. Periosteum'un (1) altında sekonder kemik trabekülü (2) izlenmektedir. 3. Hipertrofik kondrosit toplulukları. Nicoll'ün kemik boyaması, Bar: 287,42 µm.



**Şekil 41:** Kuluçkadan çıkışı takip eden ikinci haftada kontrol grubuna ait bir civcivin tibia kesiti görülmektedir. Kuluçkadan çıkıştan sonra yıkımlanmaya başlayan kırıkta ortadan kalkmış durumdadır. 1. Rezerv zon, 2. Proliferatif zon, 3. Tranzisyonel zon, 4-5. Primer kemik dokusu, 6-7. Kan damarları, 8. Hipertrofik kondrositler. Hematoksilen-Eozin, Bar: 305,44 µm.



**Şekil 42:** Kuluçkadan çıkışı takip eden ikinci haftada 5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuna ait bir civcivin tibia kesiti görülmektedir. Periosteum (1) ve oldukça genişlemiş sekonder kemik trabekülleri (2) izlenmektedir. 3. Hipertrofik kondrositler. Nicoll'un kemik boyaması, Bar: 165,48 µm.



## 10. TABLOLAR

**Tablo 4.1.** Grupların yumurta sayıları, ölü embriyo sayıları, infertil yumurta sayıları ve infertilite hariç mortaliteleri (%).

Gruplar	Kullanılan Yumurta sayısı	Ölü embriyo Sayısı	Infertil yumurta sayısı	Mortalite
Kontrol	74	2	4	2.85 <sup>h</sup>
Delimip-kapatılan	75	8	3	11.11 <sup>gh</sup>
Solventi-kontrol	85	14	2	16.86 <sup>fe</sup>
2.5 ng AFB <sub>1</sub>	90	18	7	21.68 <sup>mg</sup>
5 ng AFB <sub>1</sub>	95	22	2	23.65 <sup>du</sup>
7.5 ng AFB <sub>1</sub>	95	25	6	28.08 <sup>ct</sup>
10 ng AFB <sub>1</sub>	100	29	8	31.52 <sup>cd</sup>
15 ng AFB <sub>1</sub>	110	47	6	45.19 <sup>b</sup>
17.5 ng AFB <sub>1</sub>	150	85	9	60.28 <sup>a</sup>
20 ng AFB <sub>1</sub>	150	90	12	65.21 <sup>a</sup>
Toplam	1024	340	59	

<sup>a-h</sup> Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen mortaliteler arasındaki farklar önemlidir (P<0,05).

**Tablo 4.2.** Kuluçkının farklı dönemlerinde tespit edilen ortalama rölatif embriyo ağırlıkları (g).

Gruplar	KULUÇKA DÖNEMLERİ									
	5. gün (x±Ss)	7. gün (x±Ss)	9. gün (x±Ss)	11. gün (x±Ss)	13. gün (x±Ss)	15. gün (x±Ss)	17. gün (x±Ss)	19. gün (x±Ss)	21. gün (x±Ss)	
n=5										
Kontrol	0,31±0,033 <sup>a</sup>	1,21±0,085 <sup>a</sup>	2,91 ± 0,038 <sup>a</sup>	6,24 ± 0,352 <sup>a</sup>	15,14±1,417 <sup>a</sup>	27,13 ± 0,912 <sup>a</sup>	38,23 ± 0,833 <sup>a</sup>	49,38±1,280 <sup>a</sup>	50,70±1,107 <sup>a</sup>	
Delimip-kapatılan	0,28±0,043 <sup>ab</sup>	1,20±0,132 <sup>ab</sup>	2,79 ± 0,085 <sup>ab</sup>	6,50 ± 0,277 <sup>a</sup>	13,91±0,910 <sup>b</sup>	25,24 ± 0,174 <sup>a</sup>	34,54 ± 0,582 <sup>b</sup>	48,27±1,410 <sup>a</sup>	50,18±1,511 <sup>ab</sup>	
Solvent-kontrol	0,29±0,023 <sup>ab</sup>	1,14±0,052 <sup>ab</sup>	2,58 ± 0,180 <sup>bc</sup>	5,82 ± 0,320 <sup>ab</sup>	12,75±0,293 <sup>c</sup>	25,47 ± 0,213 <sup>b</sup>	35,15 ± 0,139 <sup>b</sup>	43,44±2,082 <sup>bc</sup>	49,79±0,734 <sup>abc</sup>	
2.5 ng AFB <sub>1</sub>	0,29±0,027 <sup>ab</sup>	1,17±0,123 <sup>ab</sup>	2,36 ± 0,097 <sup>d</sup>	5,82 ± 0,455 <sup>ab</sup>	12,26±0,107 <sup>cd</sup>	22,76 ± 0,832 <sup>c</sup>	30,24 ± 0,984 <sup>c</sup>	45,45±0,825 <sup>b</sup>	49,68±0,320 <sup>abc</sup>	
5 ng AFB <sub>1</sub>	0,26±0,015 <sup>b</sup>	1,03±0,056 <sup>bc</sup>	2,68 ± 0,157 <sup>bc</sup>	5,77 ± 0,090 <sup>ab</sup>	11,46 ± 0,194 <sup>d</sup>	21,64 ± 0,885 <sup>cd</sup>	27,57 ± 0,890 <sup>de</sup>	41,54 ± 2,163 <sup>c</sup>	49,72±1,822 <sup>abc</sup>	
7.5 ng AFB <sub>1</sub>	0,29±0,027 <sup>ab</sup>	1,14±0,120 <sup>ab</sup>	2,55 ± 0,167 <sup>cd</sup>	5,83 ± 0,020 <sup>ab</sup>	11,79 ± 0,502 <sup>b</sup>	21,63 ± 0,981 <sup>cd</sup>	26,76 ± 1,506 <sup>de</sup>	41,28±2,578 <sup>cd</sup>	48,14±0,441 <sup>bcd</sup>	
10 ng AFB <sub>1</sub>	0,22±0,043 <sup>c</sup>	1,15±0,093 <sup>ab</sup>	2,74 ± 0,049 <sup>abc</sup>	5,14 ± 0,471 <sup>bc</sup>	11,42 ± 0,217 <sup>d</sup>	20,61 ± 1,213 <sup>d</sup>	29,19 ± 1,037 <sup>cd</sup>	44,06 ± 0,650 <sup>b</sup>	48,06±0,323 <sup>bcd</sup>	
15 ng AFB <sub>1</sub>	0,20±0,023 <sup>c</sup>	1,18±0,184 <sup>ab</sup>	2,63 ± 0,159 <sup>bc</sup>	4,65 ± 1,276 <sup>cd</sup>	7,89 ± 0,252 <sup>e</sup>	16,11 ± 2,602 <sup>e</sup>	26,25 ± 0,161 <sup>e</sup>	39,09±0,078 <sup>e</sup>	48,05±0,366 <sup>bcd</sup>	
17.5 ng AFB <sub>1</sub>	0,19±0,029 <sup>c</sup>	1,04±0,101 <sup>bc</sup>	2,01 ± 0,345 <sup>e</sup>	4,29 ± 0,484 <sup>d</sup>	8,58 ± 0,276 <sup>e</sup>	18,24 ± 0,464 <sup>e</sup>	24,00 ± 0,777 <sup>e</sup>	37,24 ± 0,211 <sup>e</sup>	47,65±0,539 <sup>cd</sup>	
20 ng AFB <sub>1</sub>	0,12±0,035 <sup>d</sup>	0,95±0,105 <sup>c</sup>	1,93 ± 0,087 <sup>e</sup>	4,52 ± 0,092 <sup>cd</sup>	6,93 ± 0,791 <sup>f</sup>	16,41 ± 1,263 <sup>f</sup>	17,26 ± 5,768 <sup>f</sup>	32,77 ± 3,095 <sup>f</sup>	46,71±0,557 <sup>d</sup>	

<sup>a-f</sup> Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemli iken (P<0,05); aynı harflerle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemsizdir (P>0,05).

**Tablo 4.3.** Kuluçkannın farklı dönemlerinde tespit edilen ortalama tibia uzunlukları (mm).

Gruplar n=5	KULUÇKA DÖNEMLERİ							
	9. gün (x±Ss)	11. gün (x±Ss)	13. gün (x±Ss)	15. gün (x±Ss)	17. gün (x±Ss)	19. gün (x±Ss)	21. gün (x±Ss)	
Kontrol	5,63 ± 0,270 <sup>a</sup>	9,82 ± 0,236 <sup>a</sup>	14,35 ± 0,256 <sup>a</sup>	19,86 ± 0,550 <sup>a</sup>	23,56 ± 0,792 <sup>a</sup>	27,82 ± 1,339 <sup>a</sup>	31,09 ± 1,381 <sup>a</sup>	
Delinip-kapatılan	5,36 ± 0,004 <sup>b</sup>	9,47 ± 0,416 <sup>ab</sup>	14,18 ± 0,568 <sup>ab</sup>	19,58 ± 0,395 <sup>ab</sup>	23,85 ± 0,362 <sup>a</sup>	27,61 ± 0,987 <sup>a</sup>	29,45 ± 0,651 <sup>b</sup>	
Solvent-kontrol	5,37 ± 0,000 <sup>b</sup>	8,89 ± 0,292 <sup>c</sup>	13,39 ± 0,330 <sup>abc</sup>	18,23 ± 0,393 <sup>bc</sup>	22,41 ± 0,815 <sup>ab</sup>	27,22 ± 1,567 <sup>a</sup>	28,35 ± 0,786 <sup>cd</sup>	
2,5 ng AFB <sub>1</sub>	4,82 ± 0,004 <sup>c</sup>	9,18 ± 0,282 <sup>b</sup>	13,34 ± 0,376 <sup>abc</sup>	17,91 ± 0,555 <sup>cd</sup>	22,07 ± 0,947 <sup>abc</sup>	26,35 ± 0,157 <sup>a</sup>	29,10 ± 0,534 <sup>bc</sup>	
5 ng AFB <sub>1</sub>	4,58 ± 0,000 <sup>cd</sup>	9,00 ± 0,443 <sup>c</sup>	12,40 ± 1,324 <sup>cd</sup>	17,65 ± 0,332 <sup>cd</sup>	22,26 ± 0,382 <sup>abc</sup>	26,78 ± 0,645 <sup>a</sup>	29,19 ± 0,467 <sup>bc</sup>	
7,5 ng AFB <sub>1</sub>	4,82 ± 0,013 <sup>c</sup>	9,12 ± 0,008 <sup>cd</sup>	12,50 ± 1,908 <sup>cd</sup>	17,09 ± 2,281 <sup>def</sup>	20,84 ± 0,165 <sup>bc</sup>	26,84 ± 0,695 <sup>a</sup>	28,13 ± 0,573 <sup>cd</sup>	
10 ng AFB <sub>1</sub>	4,64 ± 0,263 <sup>cd</sup>	8,60 ± 0,013 <sup>d</sup>	12,89 ± 0,833 <sup>bc</sup>	17,39 ± 0,430 <sup>de</sup>	22,92 ± 2,167 <sup>ab</sup>	26,69 ± 0,361 <sup>a</sup>	27,73 ± 1,534 <sup>cd</sup>	
15 ng AFB <sub>1</sub>	4,72 ± 0,228 <sup>cd</sup>	8,89 ± 0,245 <sup>cd</sup>	11,98 ± 1,161 <sup>cd</sup>	15,52 ± 1,873 <sup>f</sup>	17,53 ± 3,179 <sup>d</sup>	25,44 ± 0,393 <sup>a</sup>	26,98 ± 1,827 <sup>d</sup>	
17,5 ng AFB <sub>1</sub>	4,50 ± 0,300 <sup>d</sup>	7,83 ± 0,285 <sup>e</sup>	11,43 ± 1,355 <sup>de</sup>	16,51 ± 0,877 <sup>def</sup>	19,98 ± 0,989 <sup>e</sup>	25,42 ± 0,321 <sup>a</sup>	27,01 ± 0,376 <sup>a</sup>	
20 ng AFB <sub>1</sub>	4,23 ± 0,065 <sup>e</sup>	7,56 ± 0,052 <sup>e</sup>	11,01 ± 0,444 <sup>e</sup>	15,82 ± 1,645 <sup>ef</sup>	14,73 ± 3,022 <sup>e</sup>	21,08 ± 4,424 <sup>b</sup>	27,85 ± 0,839 <sup>cd</sup>	

<sup>ab</sup> Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemli iken (P<0,05); aynı harflerle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemsizdir (P>0,05).

**Tablo 4.4.** Kuluçkannın farklı dönemlerinde tespit edilen ortalama tibia ağırlıkları (g).

Gruplar n=5	KULUÇKA DÖNEMLERİ							
	11. gün (x±Ss)	13. gün (x±Ss)	15. gün (x±Ss)	17. gün (x±Ss)	19. gün (x±Ss)	21. gün (x±Ss)		
Kontrol	0,01 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,048 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,013 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,018 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,044 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,069 <sup>a</sup>		
Delinip-kapatılan	0,01 ± 0,001 <sup>ab</sup>	0,048 ± 0,008 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,010 <sup>ab</sup>	0,35 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,035 <sup>b</sup>		
Solvent-kontrol	0,009 ± 0,001 <sup>bc</sup>	0,046 ± 0,008 <sup>ab</sup>	0,10 ± 0,02 <sup>bc</sup>	0,20 ± 0,028 <sup>bc</sup>	0,30 ± 0,055 <sup>b</sup>	0,33 ± 0,084 <sup>bc</sup>		
2,5 ng AFB <sub>1</sub>	0,008 ± 0,000 <sup>d</sup>	0,046 ± 0,013 <sup>ab</sup>	0,12 ± 0,004 <sup>ab</sup>	0,18 ± 0,015 <sup>cd</sup>	0,29 ± 0,033 <sup>b</sup>	0,32 ± 0,010 <sup>cd</sup>		
5 ng AFB <sub>1</sub>	0,008 ± 0,001 <sup>e</sup>	0,040 ± 0,001 <sup>abc</sup>	0,09 ± 0,007 <sup>cd</sup>	0,21 ± 0,007 <sup>abc</sup>	0,28 ± 0,025 <sup>b</sup>	0,32 ± 0,015 <sup>cd</sup>		
7,5 ng AFB <sub>1</sub>	0,009 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,046 ± 0,005 <sup>ab</sup>	0,09 ± 0,02 <sup>cd</sup>	0,18 ± 0,016 <sup>cd</sup>	0,30 ± 0,021 <sup>b</sup>	0,31 ± 0,037 <sup>cd</sup>		
10 ng AFB <sub>1</sub>	0,008 ± 0,001 <sup>c</sup>	0,036 ± 0,111 <sup>abc</sup>	0,07 ± 0,004 <sup>def</sup>	0,18 ± 0,019 <sup>cd</sup>	0,30 ± 0,021 <sup>b</sup>	0,32 ± 0,010 <sup>cd</sup>		
15 ng AFB <sub>1</sub>	0,008 ± 0,001 <sup>c</sup>	0,040 ± 0,007 <sup>abc</sup>	0,07 ± 0,02 <sup>ef</sup>	0,13 ± 0,025 <sup>c</sup>	0,26 ± 0,038 <sup>b</sup>	0,29 ± 0,039 <sup>cd</sup>		
17,5 ng AFB <sub>1</sub>	0,006 ± 0,007 <sup>d</sup>	0,034 ± 0,011 <sup>bc</sup>	0,08 ± 0,008 <sup>def</sup>	0,16 ± 0,007 <sup>de</sup>	0,28 ± 0,031 <sup>b</sup>	0,28 ± 0,020 <sup>cd</sup>		
20 ng AFB <sub>1</sub>	0,006 ± 0,004 <sup>d</sup>	0,032 ± 0,004 <sup>c</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>f</sup>	0,09 ± 0,035 <sup>f</sup>	0,21 ± 0,034 <sup>c</sup>	0,25 ± 0,011 <sup>d</sup>		

<sup>ab</sup> Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemli iken (P<0,05); aynı harflerle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemsizdir (P>0,05).

**Tablo 4.5.** Kuluçkann farklı dönemlerinde tibiann proksimali, orta bölgesi ve distal bölgelerinin ortalama genişlikleri (mm).

Gruplar n=5	KULUÇKA DÖNEMLERİ														
	13. gün (x±Ss)			15. gün (x±Ss)			17. gün (x±Ss)			19. gün (x±Ss)			21. gün (x±Ss)		
	Proks. bölge	Orta bölge	Distal bölge	Proks. bölge	Orta bölge	Distal bölge	Proks. bölge	Orta bölge	Distal bölge	Proks. bölge	Orta bölge	Distal bölge	Proks. bölge	Orta bölge	Distal bölge
Kontrol	2,09± 0,486 <sup>a</sup>	1,07± 0,040 <sup>a</sup>	1,97± 0,343 <sup>a</sup>	3,23± 0,293 <sup>a</sup>	1,38± 0,081 <sup>a</sup>	2,68± 0,184 <sup>a</sup>	3,53± 0,502 <sup>a</sup>	1,68± 0,081 <sup>a</sup>	3,66± 0,164 <sup>a</sup>	4,49± 0,328 <sup>b</sup>	1,85± 0,041 <sup>b</sup>	4,68± 0,286 <sup>c</sup>	5,69± 0,88 <sup>a</sup>	1,91± 0,084 <sup>a</sup>	5,12± 0,044 <sup>a</sup>
Delinip- kapatılan	2,06± 0,357 <sup>b</sup>	1,05± 0,102 <sup>a</sup>	1,90± 0,034 <sup>ab</sup>	2,73± 0,245 <sup>b</sup>	1,33± 0,077 <sup>ab</sup>	2,67± 0,236 <sup>ab</sup>	3,58± 0,253 <sup>a</sup>	1,6± 0,056 <sup>a</sup>	3,46± 0,358 <sup>ab</sup>	4,53± 0,125 <sup>ab</sup>	1,92± 0,170 <sup>ab</sup>	3,96± 0,231 <sup>bc</sup>	4,84± 0,376 <sup>b</sup>	1,78± 0,233 <sup>ab</sup>	4,95± 0,115 <sup>a</sup>
Solvent- kontrol	1,75± 0,151 <sup>abc</sup>	1,01± 0,055 <sup>ab</sup>	1,75± 0,165 <sup>abc</sup>	2,68± 0,108 <sup>b</sup>	1,20± 0,151 <sup>bc</sup>	2,63± 0,105 <sup>abc</sup>	3,28± 0,634 <sup>a</sup>	1,54± 0,072 <sup>abc</sup>	3,26± 0,220 <sup>abc</sup>	4,08± 0,557 <sup>b</sup>	1,83± 0,108 <sup>b</sup>	4,01± 0,724 <sup>bc</sup>	4,18± 0,352 <sup>b</sup>	1,81± 0,126 <sup>ab</sup>	4,62± 0,207 <sup>b</sup>
2.5 ng AFB <sub>1</sub>	1,69± 0,102 <sup>bc</sup>	0,94± 0,073 <sup>b</sup>	1,74± 0,234 <sup>abc</sup>	2,57± 0,331 <sup>bcd</sup>	1,28± 0,101 <sup>ab</sup>	2,56± 0,422 <sup>abcd</sup>	3,32± 0,206 <sup>b</sup>	1,53± 0,220 <sup>abc</sup>	2,98± 0,446 <sup>cd</sup>	3,94± 0,359 <sup>b</sup>	1,86± 0,110 <sup>b</sup>	4,09± 0,430 <sup>bc</sup>	4,18± 0,350 <sup>b</sup>	1,81± 0,120 <sup>ab</sup>	4,61± 0,209 <sup>b</sup>
5 ng AFB <sub>1</sub>	1,53± 0,101 <sup>bcd</sup>	0,78± 0,075 <sup>c</sup>	1,560± 0,142 <sup>bcd</sup>	2,62± 0,166 <sup>b</sup>	1,26± 0,099 <sup>ab</sup>	2,52± 0,137 <sup>abcd</sup>	3,34± 0,202 <sup>a</sup>	1,62± 0,116 <sup>ab</sup>	3,44± 0,090 <sup>ab</sup>	3,92± 0,108 <sup>a</sup>	2,09± 0,380 <sup>a</sup>	4,03± 0,499 <sup>bc</sup>	4,34± 0,544 <sup>b</sup>	1,80± 0,121 <sup>ab</sup>	4,38± 0,215 <sup>bc</sup>
7.5 ng AFB <sub>1</sub>	1,80± 0,115 <sup>ab</sup>	0,85± 0,068 <sup>c</sup>	1,536± 0,299 <sup>cd</sup>	2,24± 0,275 <sup>de</sup>	1,23± 0,073 <sup>abc</sup>	2,69± 0,243 <sup>a</sup>	3,38± 0,234 <sup>a</sup>	1,56± 0,089 <sup>abc</sup>	3,46± 0,461 <sup>ab</sup>	4,38± 0,784 <sup>bc</sup>	1,74± 0,97 <sup>bc</sup>	3,82± 0,304 <sup>bc</sup>	4,46± 0,626 <sup>b</sup>	1,89± 0,120 <sup>a</sup>	4,44± 0,356 <sup>bc</sup>
10 ng AFB <sub>1</sub>	1,57± 0,179 <sup>bcd</sup>	0,76± 0,049 <sup>c</sup>	1,314± 0,352 <sup>d</sup>	2,33± 0,340 <sup>de</sup>	1,23± 0,154 <sup>abc</sup>	2,29± 0,074 <sup>de</sup>	3,24± 0,453 <sup>a</sup>	1,50± 0,107 <sup>bc</sup>	3,59± 0,239 <sup>a</sup>	4,13± 0,605 <sup>bc</sup>	1,76± 0,014 <sup>bc</sup>	4,00± 0,245 <sup>bc</sup>	4,28± 0,264 <sup>a</sup>	1,72± 0,159 <sup>ab</sup>	4,55± 0,301 <sup>bc</sup>
15 ng AFB <sub>1</sub>	1,22± 0,142 <sup>d</sup>	0,77± 0,053 <sup>c</sup>	1,26± 0,389 <sup>d</sup>	2,16± 0,315 <sup>e</sup>	1,21± 0,121 <sup>bc</sup>	2,37± 0,224 <sup>bode</sup>	3,20± 0,266 <sup>a</sup>	1,42± 0,091 <sup>c</sup>	2,79± 0,212 <sup>d</sup>	3,99± 0,783 <sup>b</sup>	1,85± 0,165 <sup>b</sup>	4,18± 0,379 <sup>bc</sup>	4,27± 0,328 <sup>b</sup>	1,74± 0,154 <sup>ab</sup>	4,31± 0,169 <sup>bc</sup>
17.5 ng AFB <sub>1</sub>	1,44± 0,176 <sup>bcd</sup>	0,61± 0,036 <sup>d</sup>	1,52± 0,134 <sup>cd</sup>	2,58± 0,149 <sup>bcd</sup>	1,17± 0,131 <sup>bc</sup>	2,34± 0,108 <sup>ode</sup>	2,61± 0,222 <sup>b</sup>	1,26± 0,068 <sup>d</sup>	3,12± 0,079 <sup>bcd</sup>	3,98± 0,469 <sup>bc</sup>	1,71± 0,180 <sup>bc</sup>	4,11± 0,233 <sup>bc</sup>	4,27± 0,153 <sup>b</sup>	1,25± 0,339 <sup>c</sup>	4,27± 0,243 <sup>c</sup>
20 ng AFB <sub>1</sub>	1,40± 0,362 <sup>cd</sup>	0,76± 0,054 <sup>c</sup>	1,32± 0,244 <sup>d</sup>	2,19± 0,118 <sup>c</sup>	1,09± 0,028 <sup>e</sup>	2,15± 0,127 <sup>e</sup>	2,35± 0,347 <sup>b</sup>	1,17± 0,139 <sup>d</sup>	2,18± 0,188 <sup>e</sup>	3,97± 0,160 <sup>c</sup>	1,59± 0,083 <sup>c</sup>	3,56± 0,194 <sup>c</sup>	3,48± 0,138 <sup>c</sup>	1,58± 0,028 <sup>b</sup>	4,23± 0,208 <sup>c</sup>

\*= Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemli iken (P<0,05); aynı harflerle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemsizdir (P>0,05).

**Tablo 4.6.** Kuluçka sonrası dönemde tespit edilen ortalama civciv ağırlıkları (g).

Gruplar	KULUÇKA SONRASI DÖNEMLER	
	1. hafta (x±Ss)	2. hafta (x±Ss)
n=3		
Kontrol	62,55±4,395 <sup>a</sup>	81,10±10,226
Delinip-kapatılan	61,00±0,321 <sup>a</sup>	79,63±3,557
Solvent-kontrol	59,79±4,240 <sup>ab</sup>	78,21±6,394
2,5 ng AFB <sub>1</sub>	55,40±0,977 <sup>ab</sup>	74,12±4,419
5 ng AFB <sub>1</sub>	57,09±4,815 <sup>ab</sup>	72,13±6,671
7,5 ng AFB <sub>1</sub>	56,22±6,801 <sup>ab</sup>	71,47±13,812
10 ng AFB <sub>1</sub>	52,51±4,372 <sup>b</sup>	66,82±6,740
15 ng AFB <sub>1</sub>	43,56±2,593 <sup>c</sup>	68,71±0,597
17,5 ng AFB <sub>1</sub>	43,32±0,742 <sup>c</sup>	67,18±2,225

<sup>a-c</sup> Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemli iken (P<0,05); aynı harflerle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemsizdir (P>0,05).

**Tablo 4.7.** Kuluçka sonrası dönemde tespit edilen ortalama tibia uzunlukları (mm).

Gruplar	KULUÇKA SONRASI DÖNEMLER	
	1. hafta (x±Ss)	2. hafta (x±Ss)
n=3		
Kontrol	36,33±1,154 <sup>a</sup>	45,00±0,001 <sup>a</sup>
Delinip-kapatılan	35,66±0,577 <sup>ab</sup>	43,66±3,214 <sup>ab</sup>
Solvent-kontrol	35,00±0,001 <sup>abc</sup>	41,66±2,886 <sup>abc</sup>
2,5 ng AFB <sub>1</sub>	34,00±1,732 <sup>bc</sup>	40,00±2,000 <sup>bc</sup>
5 ng AFB <sub>1</sub>	36,66±1,154 <sup>a</sup>	42,00±0,001 <sup>abc</sup>
7,5 ng AFB <sub>1</sub>	36,00±1,00 <sup>a</sup>	39,66±1,527 <sup>bc</sup>
10 ng AFB <sub>1</sub>	36,33±0,577 <sup>a</sup>	39,00±4,358 <sup>c</sup>
15 ng AFB <sub>1</sub>	33,36±1,154 <sup>c</sup>	34,66±0,577 <sup>a</sup>
17,5 ng AFB <sub>1</sub>	33,00±1,00 <sup>c</sup>	34,66±0,577 <sup>a</sup>

<sup>a-c</sup> Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemli iken (P<0,05); aynı harflerle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemsizdir (P>0,05).

**Tablo 4.8.** Kuluçka sonrası dönemde tespit edilen ortalama tibia ağırlıkları (g).

Gruplar	KULUÇKA SONRASI DÖNEMLER	
	1. hafta (x±Ss)	2. hafta (x±Ss)
n=3		
Kontrol	0,67±0,032 <sup>a</sup>	0,91±0,066 <sup>a</sup>
Delinip-kapatılan	0,63±0,060 <sup>a</sup>	0,90±0,04 <sup>a</sup>
Solvent-kontrol	0,64±0,010 <sup>a</sup>	0,86±0,066 <sup>ab</sup>
2.5 ng AFB <sub>1</sub>	0,64±0,040 <sup>a</sup>	0,82±0,106 <sup>ab</sup>
5 ng AFB <sub>1</sub>	0,62±0,020 <sup>a</sup>	0,79±0,010 <sup>ab</sup>
7.5 ng AFB <sub>1</sub>	0,55±0,005 <sup>b</sup>	0,80±0,083 <sup>ab</sup>
10 ng AFB <sub>1</sub>	0,55±0,065 <sup>b</sup>	0,74±0,143 <sup>b</sup>
15 ng AFB <sub>1</sub>	0,50±0,010 <sup>bc</sup>	0,58±0,005 <sup>c</sup>
17.5 ng AFB <sub>1</sub>	0,48±0,005 <sup>c</sup>	0,58±0,05 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemli iken (P<0,05); aynı harflerle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemsizdir (P>0,05).

**Tablo 4.9.** Kuluçka sonrası dönemde tibianın proksimali, orta bölgesi ve distal bölgelerinin ortalama genişlikleri (mm).

Gruplar	KULUÇKA SONRASI DÖNEMLER			
	1. hafta (x±Ss)		2. hafta (x±Ss)	
n=3				
Kontrol	Proks. bölge 0,70±0,001 <sup>a</sup>	Orta bölge 0,23±0,057	Proks. bölge 0,83±0,115	Orta bölge 0,36±0,057 <sup>a</sup>
Delinip-kapatılan	0,66±0,057 <sup>a</sup>	0,23±0,057	0,83±0,115	0,30±0,001 <sup>ab</sup>
Solvent-kontrol	0,63±0,057 <sup>a</sup>	0,26±0,057	0,80±0,100	0,33±0,057 <sup>ab</sup>
2.5 ng AFB <sub>1</sub>	0,63±0,057 <sup>a</sup>	0,20±0,001	0,80±0,100	0,30±0,001 <sup>ab</sup>
5 ng AFB <sub>1</sub>	0,66±0,057 <sup>a</sup>	0,30±0,001	0,86±0,057	0,30±0,001 <sup>ab</sup>
7.5 ng AFB <sub>1</sub>	0,66±0,057 <sup>a</sup>	0,23±0,057	0,86±0,057	0,33±0,001 <sup>ab</sup>
10 ng AFB <sub>1</sub>	0,63±0,057 <sup>a</sup>	0,23±0,057	0,70±0,200	0,26±0,057 <sup>b</sup>
15 ng AFB <sub>1</sub>	0,53±0,057 <sup>b</sup>	0,20±0,001	0,70±0,001	0,20±0,001 <sup>c</sup>
17.5 ng AFB <sub>1</sub>	0,50±0,001 <sup>b</sup>	0,20±0,001	0,56±0,057	0,30±0,001 <sup>ab</sup>

<sup>a,b,c</sup> Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemli iken (P<0,05); aynı harflerle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemsizdir (P>0,05).

**Tablo 4.10.** Kuluçkanın farklı dönemlerinde tibial büyüme plakasındaki hücre zonlarının gemişlikleri ( $\mu\text{m}$ )  
KULUÇKA DÖNEMLERİ

Gruplar n=5	13. gün (x±SS)				15. gün (x±SS)				17. gün (x±SS)				19. gün (x±SS)				21. gün (x±SS)							
	Profil. zon		Hip. zon		Profil. zon		Hip. zon		Profil. zon		Hip. zon		Profil. zon		Hip. zon		Profil. zon		Hip. zon		Profil. zon		Hip. zon	
	Tran. zon	Hip. zon	Tran. zon	Hip. zon	Tran. zon	Hip. zon	Tran. zon	Hip. zon	Tran. zon	Hip. zon	Tran. zon	Hip. zon	Tran. zon	Hip. zon	Tran. zon	Hip. zon	Tran. zon	Hip. zon	Tran. zon	Hip. zon	Tran. zon	Hip. zon		
Kontrol	720± 45.27 <sup>a</sup>	231± 158.8	718± 56.30 <sup>b</sup>	2740± 433.58 <sup>a</sup>	700± 61.23 <sup>a</sup>	151.65	418.3 <sup>b</sup>	4100± 1326.64	750± 36.74 <sup>a</sup>	506± 8.94 <sup>b</sup>	5118± 214.75	556± 86.19 <sup>a</sup>	49± 5.47	5118± 214.75	556± 86.19 <sup>a</sup>	49± 5.47	898± 116.70 <sup>c</sup>	5680± 460.43 <sup>a</sup>						
Delinip- kapatma n	676± 43.35 <sup>ab</sup>	250± 54.58 <sup>b</sup>	654± 11.40 <sup>b</sup>	2590± 260.76 <sup>abc</sup>	720± 21.21 <sup>a</sup>	158.80	96.17 <sup>b</sup>	3210± 803.43 <sup>ab</sup>	650± 30.82 <sup>b</sup>	454± 38.47 <sup>b</sup>	5366± 393.42	422± 47.11 <sup>b</sup>	49± 5.47	5366± 393.42	49± 5.47	886± 85.02 <sup>c</sup>	4660± 516.47 <sup>ab</sup>							
Solvent- kontrol	610± 14.14 <sup>bc</sup>	490± 26.45 <sup>b</sup>	676± 59.41 <sup>b</sup>	2700± 282.84 <sup>ab</sup>	604± 74.69 <sup>b</sup>	700± 30.82 <sup>a</sup>	894± 193.85	2960± 626.89 <sup>bc</sup>	624± 25.09 <sup>bc</sup>	736± 265.95	4770± 620.08	428± 22.80 <sup>b</sup>	40± 10 <sup>b</sup>	4770± 620.08	40± 10 <sup>b</sup>	876± 96.33 <sup>c</sup>	4980± 1040.19 <sup>ab</sup>							
2.5 ng AFB <sub>1</sub>	594± 81.11 <sup>bc</sup>	432± 112.56 <sup>b</sup>	630± 105.83	2410± 320.93 <sup>abcd</sup>	552± 49.69 <sup>bc</sup>	61.23 <sup>a</sup>	52.15 <sup>b</sup>	3140± 630.87 <sup>ab</sup>	544± 132.02 <sup>c</sup>	934± 540.39	4640± 559.46	385± 35.71 <sup>bc</sup>	39± 8.56	4640± 559.46	39± 8.56	1386± 242.1 <sup>bc</sup>	4850± 528.49 <sup>ab</sup>							
5 ng AFB <sub>1</sub>	588± 22.80 <sup>bc</sup>	516± 23.02 <sup>b</sup>	614± 13.41 <sup>b</sup>	2090± 516.47 <sup>bcde</sup>	636± 21.90 <sup>ab</sup>	69.06 <sup>a</sup>	42.19 <sup>b</sup>	3650± 278.38 <sup>ab</sup>	534± 20.73 <sup>de</sup>	550± 56.56 <sup>b</sup>	4650± 705.33	382± 32.71 <sup>bc</sup>	39± 8.94	4650± 705.33	39± 8.94	1380± 236.11 <sup>b</sup>	5480± 690.65 <sup>a</sup>							
7.5 ng AFB <sub>1</sub>	554± 61.07 <sup>c</sup>	524± 40.37 <sup>b</sup>	548± 126.76	1830± 476.44 <sup>de</sup>	490± 143.17 <sup>c</sup>	154.49	168.07	2660± 582.45 <sup>bc</sup>	572± 19.23 <sup>cd</sup>	578± 90.66 <sup>b</sup>	5640± 260.76	348± 35.63 <sup>cd</sup>	34± 5.47	5640± 260.76	34± 5.47	1380± 57 <sup>bc</sup>	4750± 628.49 <sup>ab</sup>							
10 ng AFB <sub>1</sub>	530± 66.70 <sup>c</sup>	480± 57.00 <sup>b</sup>	562± 51.67 <sup>b</sup>	1970± 514.29 <sup>de</sup>	584± 48.27 <sup>b</sup>	55.49 <sup>a</sup>	36.46 <sup>b</sup>	3000± 122.47 <sup>bc</sup>	474± 18.16 <sup>ef</sup>	990± 82.15 <sup>a</sup>	5200± 234.52	290± 26.45 <sup>ef</sup>	34± 5.47	5200± 234.52	34± 5.47	1530± 170.88 <sup>b</sup>	3730± 1087.19 <sup>b</sup>							
15 ng AFB <sub>1</sub>	504± 78.93 <sup>c</sup>	504± 61.07 <sup>b</sup>	650± 203.10	2150± 380.78 <sup>abcd</sup>	364± 58.13 <sup>c</sup>	115.97	96.54 <sup>b</sup>	1730± 1013.41	420± 21.21 <sup>fg</sup>	702± 48.16	4890± 74.16 <sup>ab</sup>	340± 38.07 <sup>cd</sup>	36± 6.51	4890± 74.16 <sup>ab</sup>	36± 6.51	1510± 574.89	3880± 998.49 <sup>bc</sup>							
17.5 ng AFB <sub>1</sub>	312± 158.17	432± 164.8	638± 190.97	2240± 527.25 <sup>abcd</sup>	412± 44.38 <sup>de</sup>	52.63 <sup>b</sup>	42.19 <sup>ab</sup>	2306± 187.56 <sup>cd</sup>	374± 18.16 <sup>gh</sup>	758± 126.76	3550± 1749.2 <sup>b</sup>	312± 21.67 <sup>def</sup>	32± bc	3550± 1749.2 <sup>b</sup>	32± bc	1756± 908.53	3340± 207.36 <sup>cd</sup>							
20 ng AFB <sub>1</sub>	372± 78.54 <sup>d</sup>	972± 167 <sup>a</sup>	990± 167.33	1632± 576.08 <sup>e</sup>	368± 73.28 <sup>e</sup>	166.04	663.30	1776± 677.18 <sup>f</sup>	322± 102.32 <sup>h</sup>	876± 186.09	2780± 2361.5	25± 20.73 <sup>f</sup>	25± 5 <sup>c</sup>	2780± 2361.5	25± 20.73 <sup>f</sup>	2200± 158.11	2310± 1731.47 <sup>d</sup>							
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*							

<sup>ab-h</sup> Aynı sitede farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemli iken (P<0.05), aynı harflerle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemsizdir (P>0.05).

Rez. Zon: Rezerv Zon, Profil. Zon: Proliferatif Zon, Tran. Zon: Transizyonel Zon, Hip. Zon: Hipertrofik Zon

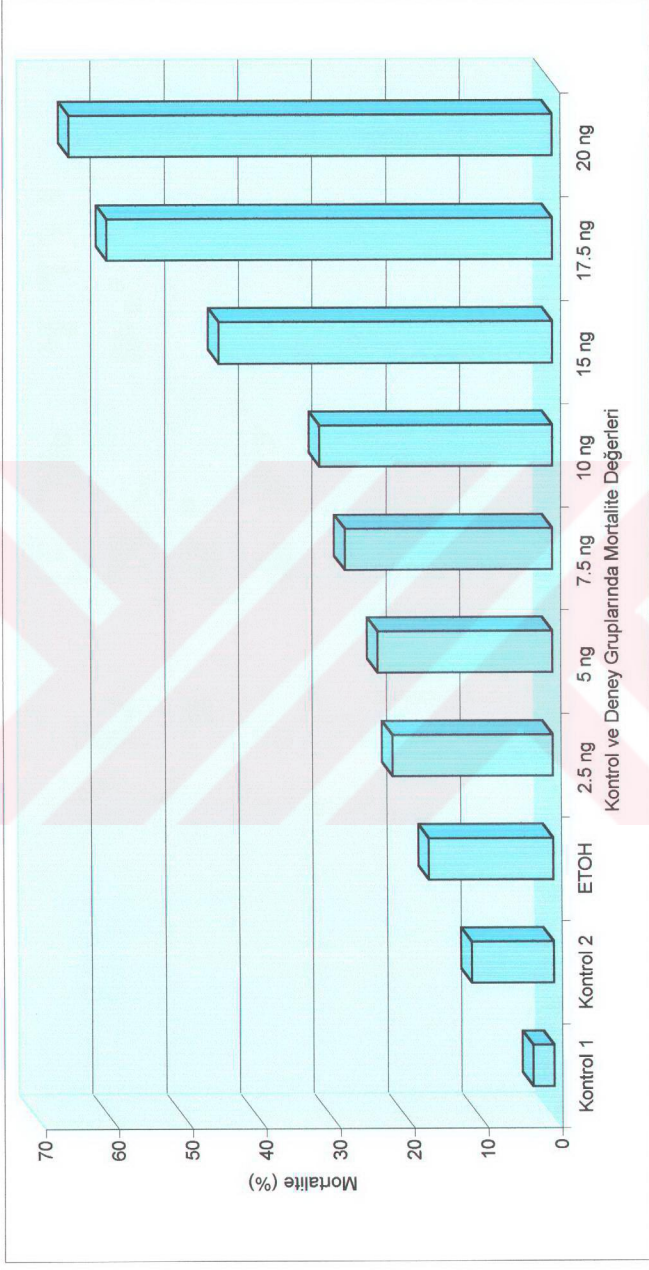
**Tablo 4.11.** Kuluçka sonrası dönemlerde tibial büyüme plakasındaki hücre zonlarının genişlikleri ( $\mu\text{m}$ )  
KULUÇKA SONRASI DÖNEMLER

Gruplar n=3	1. hafta (x±Ss)				2. hafta (x±Ss)			
	Rez. Zon		Tran. zon		Rez. zon		Tran. zon	
	Prol. zon	Tran. zon	Prol. zon	Tran. zon	Prol. zon	Tran. zon	Prol. zon	Tran. zon
Kontrol	64.33±4.04 <sup>a</sup>	543.33±28.72 <sup>g</sup>	762.66±39.50 <sup>a</sup>	543.33±28.72 <sup>g</sup>	91.66±1.52 <sup>a</sup>	771.66±42.54 <sup>a</sup>	581.66±12.58 <sup>f</sup>	581.66±12.58 <sup>f</sup>
Delinip-kapatılan	60±1 <sup>b</sup>	574.66±5.03 <sup>fg</sup>	716.66±15.27 <sup>b</sup>	574.66±5.03 <sup>fg</sup>	86.66±1.52 <sup>b</sup>	711.66±10.40 <sup>b</sup>	593±7 <sup>f</sup>	593±7 <sup>f</sup>
Solvent-kontrol	56±1.52 <sup>c</sup>	603.33±15.27 <sup>f</sup>	711.66±7.63 <sup>b</sup>	603.33±15.27 <sup>f</sup>	82.66±2.51 <sup>c</sup>	695±5 <sup>b</sup>	641.66±33.29 <sup>cd</sup>	641.66±33.29 <sup>cd</sup>
2.5 ng AFB <sub>1</sub>	55±2 <sup>c</sup>	676.66±20.81 <sup>e</sup>	684±5.29 <sup>b</sup>	676.66±20.81 <sup>e</sup>	79±1 <sup>d</sup>	647.33±6.42 <sup>c</sup>	699.33±4.04 <sup>cd</sup>	699.33±4.04 <sup>cd</sup>
5 ng AFB <sub>1</sub>	50±1 <sup>de</sup>	753.33±35.11 <sup>d</sup>	620±20 <sup>c</sup>	753.33±35.11 <sup>d</sup>	75±2 <sup>e</sup>	616.66±16.07 <sup>cd</sup>	751.66±27.53 <sup>de</sup>	751.66±27.53 <sup>de</sup>
7.5 ng AFB <sub>1</sub>	51±1.52 <sup>d</sup>	784±9.64 <sup>cd</sup>	626±3.60 <sup>c</sup>	784±9.64 <sup>cd</sup>	70±1 <sup>e</sup>	586.33±15.17 <sup>d</sup>	826.66±30.13 <sup>cd</sup>	826.66±30.13 <sup>cd</sup>
10 ng AFB <sub>1</sub>	47±2.08 <sup>cd</sup>	809.33±17.92 <sup>c</sup>	581.66±27.53 <sup>d</sup>	809.33±17.92 <sup>c</sup>	63.33±1.52 <sup>g</sup>	535±15 <sup>e</sup>	923.33±30.55 <sup>bc</sup>	923.33±30.55 <sup>bc</sup>
15 ng AFB <sub>1</sub>	44±1.15 <sup>f</sup>	847.66±4.04 <sup>b</sup>	505±5 <sup>e</sup>	847.66±4.04 <sup>b</sup>	61±1 <sup>gh</sup>	523.33±25.16 <sup>e</sup>	970±31.22 <sup>b</sup>	970±31.22 <sup>b</sup>
17.5 ng AFB <sub>1</sub>	40±0.76 <sup>g</sup>	1024.66±25 <sup>a</sup>	450±30 <sup>f</sup>	1024.66±25 <sup>a</sup>	59.83±1.04 <sup>h</sup>	516.66±15.27 <sup>e</sup>	1235.66±180.50 <sup>a</sup>	1235.66±180.50 <sup>a</sup>
20 ng AFB <sub>1</sub>	*	*	*	*	*	*	*	*

<sup>a-h</sup> Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemli iken (P<0,05); aynı harflerle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemsizdir (P>0,05).

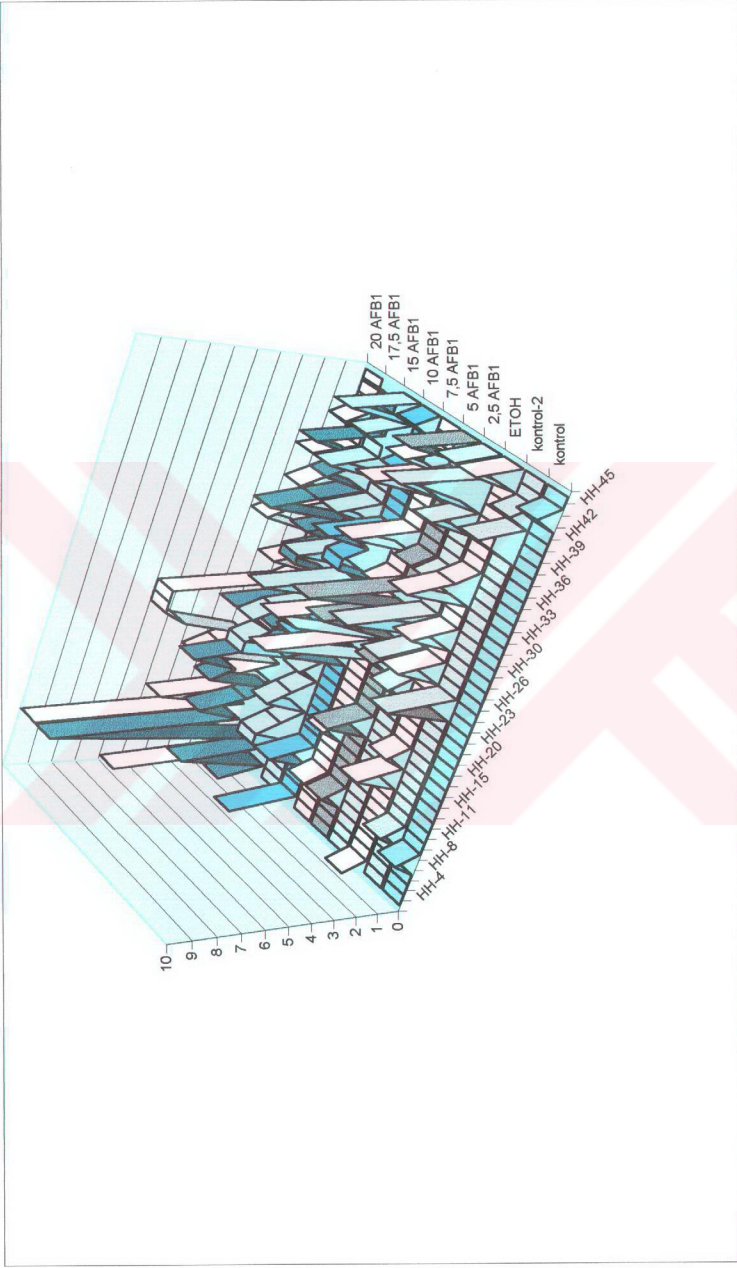
Rez. Zon: Rezerv Zon, ProL. Zon: Proliferatif Zon, Tran. Zon: Transizyonel Zon, Hip. Zon: Hipertrofik Zon

## 11. GRAFİKLER

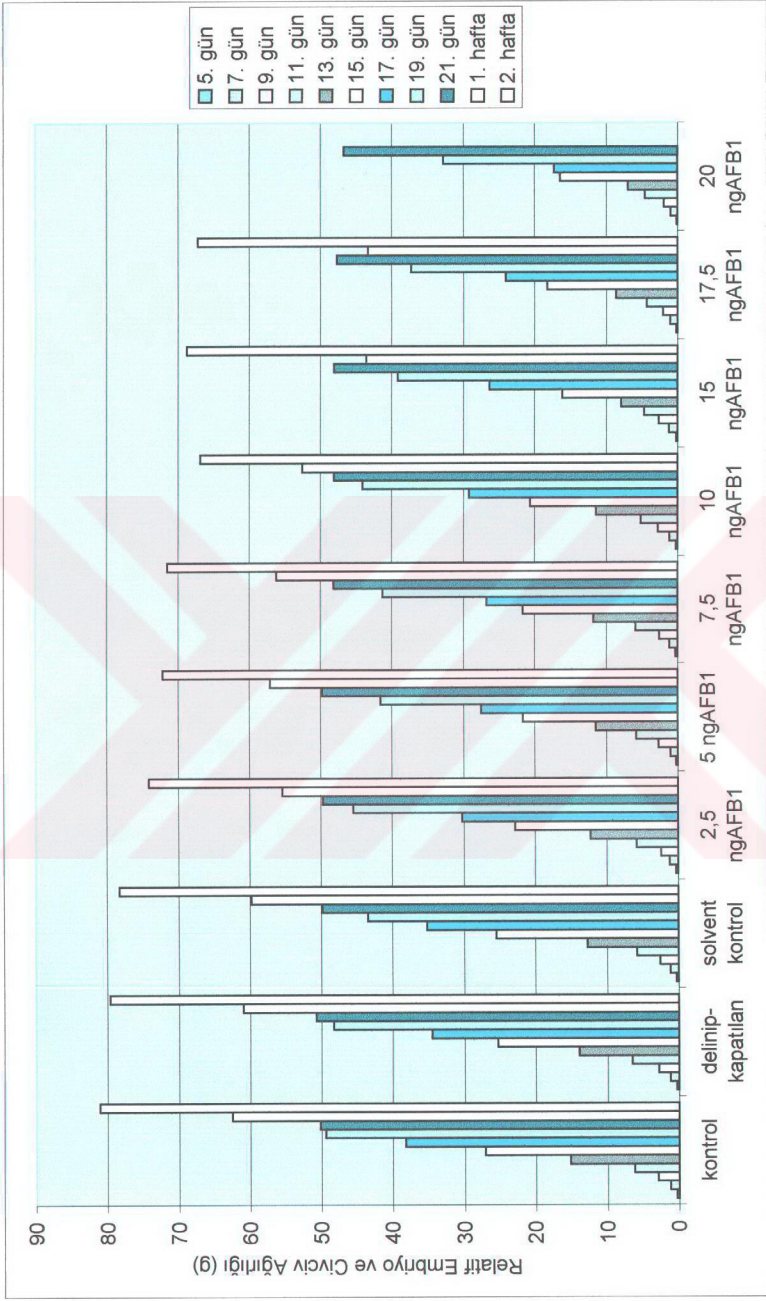


Grafik 4.1: Kontrol ve Deneş Grularında Mortalite Değerleri

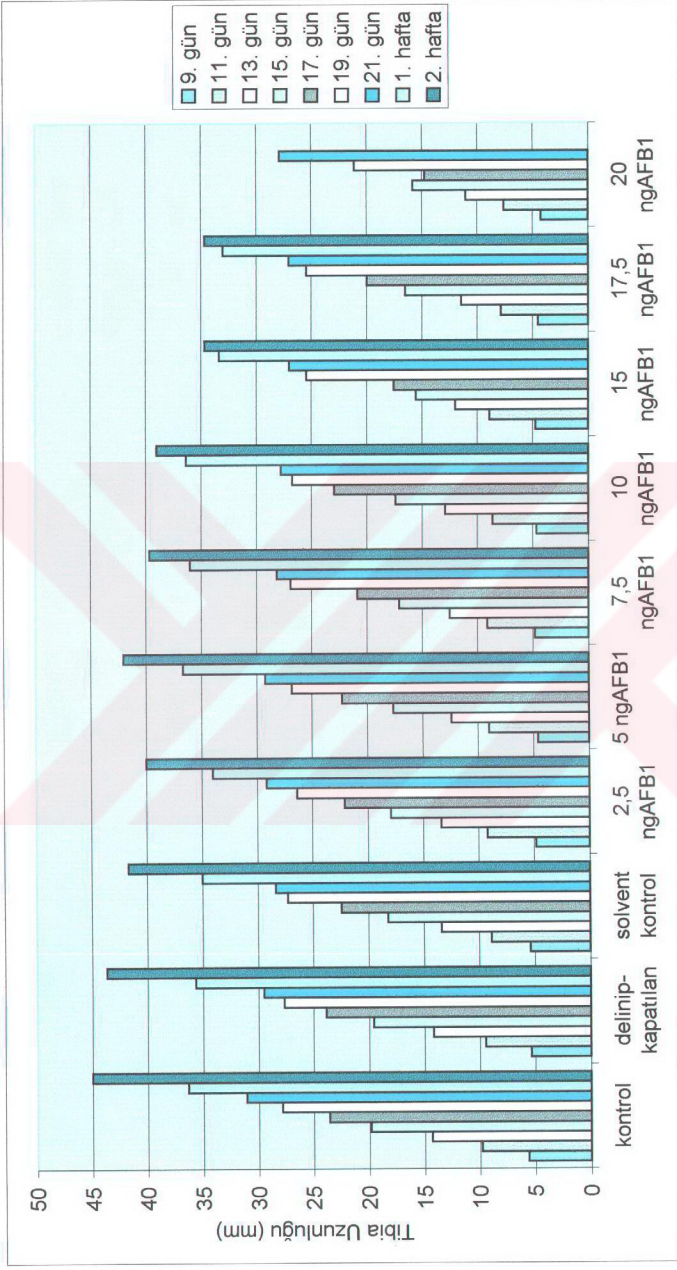




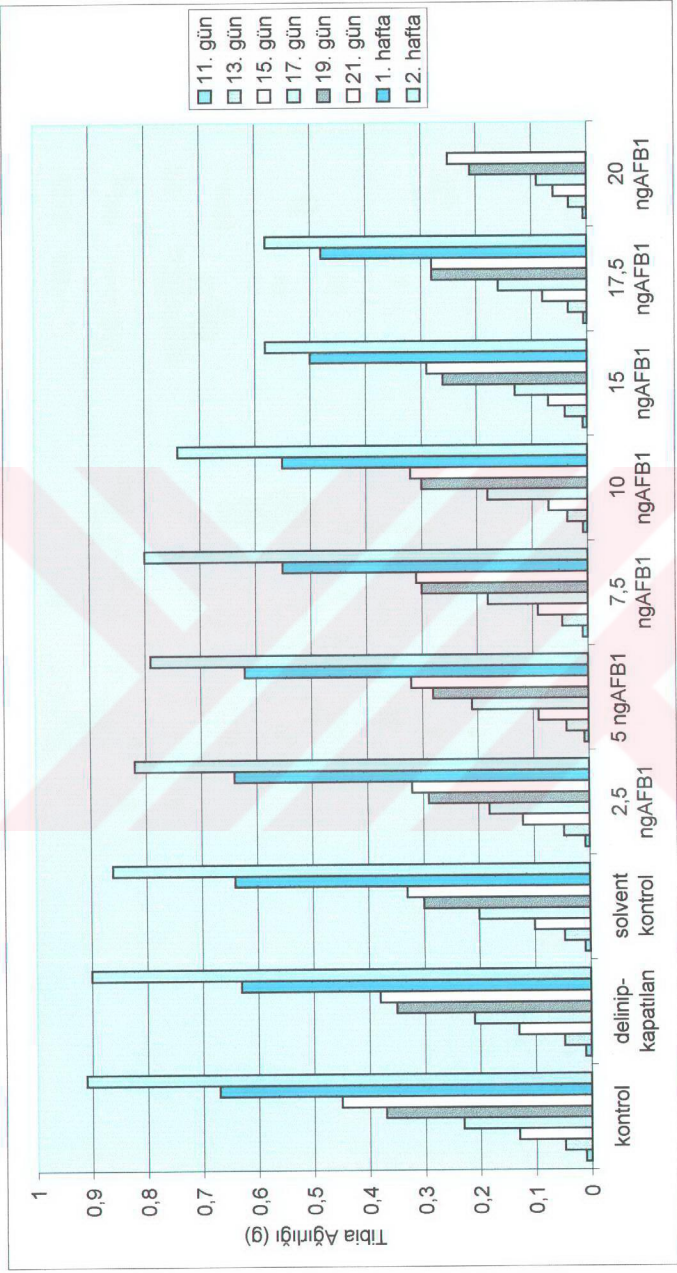
Gratik 4.2: Kontrol ve DeneY Gruplarında Saptanan Embriyonik Ölümlerin Hamburger-Hamilton Skalasına Göre Belirlenen Embriyonik Gelişme Evrelerindeki Dağılımları



Grafik 4.3: Kontrol ve Denev Grublarında Günlere Göre Ortalama Rölatif Embriyo ve Cıvıv Ağırlıkları



Grafik 4.4: Kontrol ve Deneş gruplarında Günlere Göre Ortalama Tibia Uzunlukları



Grafik 4. 5: Kontrol ve Deneş Gruplarında Günlere Göre Ortalama Tibia Ağırılıkları

## 12. ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Erzincan’ da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini tamamladıktan sonra 1992 yılında kazandığı Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden 1997 yılında mezun oldu. 1997 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesinin Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’na Araştırma Görevlisi olarak atandı. Halen bu görevini sürdürmektedir. Evlidir.

### 13. TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde yakın ilgi, destek ve yardımlarını gördüğüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı elemanlarına, bu çalışmada kullanılan aflatoksin B<sub>1</sub>'in temin edilmesinde emeği geçen Doç Dr. Halis OGUZ' a, istatistiksel hesaplamaların yapılmasında değerli bilgilerinden faydalandığım Prof. Dr. Mehmet Emin TEKİN' e teşekkür ederim.