

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

157341

**JAPON BİLDİRCİNLERİNDE ÇİZGİLİ KASLARIN EMBRİYONAL GELİŞİMİ
ÜZERİNDE IGF-I'İN (Insulin-Like Growth Factor-I) ETKİLERİ**

Arş.Gör. Turgay DEPREM
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. NURHAYAT GÜLMEZ

Bu çalışma KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Yönetim Kurulu Başkanlığı
tarafından desteklenmiştir. Proje No: VF-017

2004- KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

JAPON BILDİRCİNLERİNDE ÇİZGİLİ KASLARIN EMBRİYONAL GELİŞİMİ
ÜZERİNDE IGF-I'İN (Insulin-Like Growth Factor-I) ETKİLERİ

Arş.Gör. Turgay DEPREM
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. NURHAYAT GÜLMEZ

2004- KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Arş. Gör. Turgay DEPREM tarafından hazırlanmış olan “ Japon Bildiricilerinde Çizgili Kasların Embriyonal Gelişimi Üzerinde IGF-I’in (Insulin-Like Growth Factor-I) Etkileri ” adlı bu çalışma, yapılan tez savunma sınavı sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy.....birliği..... ile kabul edilmiştir.

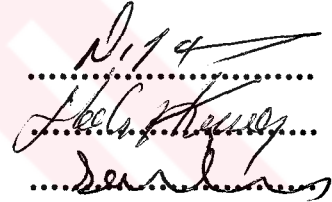
Tez Savunma Tarihi

09.07.2004

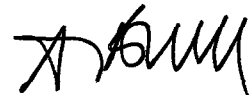
imza

Adı Soyadı :

Başkan : Doç. Dr. Nurhayat GÜLMEZ
Üye : Yrd. Doç.Dr. Hakan KOCAMIŞ
Üye : Doç. Dr. Sami ÖZCAN


.....
.....
.....

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..16..07..2004... gün ve ...23/49..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Doç. Dr. Ayla ÖZCAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
Tablo Listesi	I
Grafik Listesi	II
Şekil Listesi	III
Önsöz	IV
1. GİRİŞ	1
1.1. Embriyonal Dönemde İskelet Kaslarının Gelişimi	2
1.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri (Insulin-Like Growth Factors)	5
1.2.1. IGF Reseptörlerinin Yapısı ve Fonksiyonları	8
1.2.2. IGF Bağlayıcı Proteinler	9
1.2.3. Kas Gelişiminde IGF'lerin Rolü	11
2. MATERYAL VE METOT	13
2.1. Enjeksiyon Prosedürü	13
2.2. Embriyoların Toplanması ve Histolojik Preparatların Hazırlanması	13
3. BULGULAR	15
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	33
5. ÖZET	39
6. SUMMARY	40
7. KAYNAKLAR	41
8. ÖZGEÇMİŞ	45

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. IGF-I uygulanan ve kontrol gruplarının, 7. günden 16. güne kadar olan süre içerisindeki çizgili kas hücre çaplarının (μ), kendi grupları içinde istatistiksel açıdan değerlendirilmesi. abcdefg: Aynı grup içinde ortak harf taşımayan ortalamalar arasındaki farklar istatistiki açıdan önemlidir. n: Sayım yapılan birim alan sayısı.	22
Tablo 2. Günlere göre IGF-I uygulanan ve kontrol grubu çizgili kas hücre çaplarının (μ) gruplar arasında istatistiksel açıdan değerlendirilmesi ve t-değerleri. n: Ölçüm yapılan birim alan sayısı. ** P < 0.01 *** P < 0.001.	22
Tablo 3. 7. günden 16.güne kadar gelişim süresinde, IGF-I uygulanan ve kontrol grubu kaslarda toplam kas hücre sayılarının gruplar arasında istatistiksel açıdan değerlendirilmesi ve t-değerleri. n: Sayım yapılan tüm alan sayısı. *** P < 0.001.	23

GRAFİK LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Grafik 1. IGF-I uygulanan ve kontrol grubu embriyolarda M. Longus colli dorsalis, pars thoracica (M. Spinalis thoracis) kasında kas teli çaplarının yaşa bağlı değişimi.	23
Grafik 2. IGF-I uygulanan ve kontrol grubu embriyoların M. Longus colli dorsalis, pars thoracica (M. Spinalis thoracis) kasındaki toplam kas teli sayısının yaşa bağlı değişimi.	24
Grafik 3. IGF-I uygulanan ve kontrol grubu embriyoların M. Longus colli dorsalis, pars thoracica (M. Spinalis thoracis) kasında birim alandaki kas teli sayısının yaşa bağlı değişimi.	24

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. İskelet kası miyogenezisinin şematize yapısı ve genlerin etkisi.	3
Şekil 2. Büyüme hormonu ile insulin benzeri büyüme faktörleri ve onların bağlayıcı proteinleri arasındaki ilişki.	6
Şekil 3. İnkübasyonun 7. gününde miyotüp oluşumu.	25
Şekil 4. İnkübasyonun 7. gününde çizgili kas tellerinde enine bantlaşma.	26
Şekil 5. İnkübasyonun 7. gününde kas hücrelerinde glikojen yoğunluğu.	27
Şekil 6. İnkübasyonun 9. gününde primer demetler.	28
Şekil 7. İnkübasyonun 10. gününde primer ve sekonder demetler.	28
Şekil 8. İnkübasyonun 12. gününde çizgili kas tellerinde enine bantlaşma.	29
Şekil 9. İnkübasyonun 12. gününde görülen kas mekikleri.	29
Şekil 10. İnkübasyonun 13. gününde çizgili kas tellerinde enine bantlaşma.	30
Şekil 11. İnkübasyonun 14. gününde M. Longus colli dorsalis, pars thoracica (M. Spinalis thoracis) kasının genel görünümü.	30
Şekil 12. İnkübasyonun 15. gününde M. Longus colli dorsalis, pars thoracica (M. Spinalis thoracis) kas tellerinin genel görünümü.	31
Şekil 13. İnkübasyonun 16. gününde M. Longus colli dorsalis, pars thoracica (M. Spinalis thoracis) kasının genel görünümü.	31
Şekil 14. İnkübasyonun 16. gününde M. Longus colli dorsalis, pars thoracica (M. Spinalis thoracis) kas tellerinde enine bantlaşma yapısı.	32

ÖNSÖZ

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (Insulin-Like Growth Factors, IGF's) peptidlerinin embriyonik ve fötal büyüme ve gelişmede önemli bir role sahip olduğu, IGF'lerin kas büyümesi ve gelişmesi üzerine çok önemli etkilerinin olduğu ve IGF-I ve IGF-II'nin miyoblastlarda proliferasyon ve diferensiasyonu uyardığı, besin alınımını artırdığı ve protein yıkımına engel olduğu belirtilmiştir.

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I'in (IGF-I) tavukların çizgili kası üzerine etkisi hem in vitro hem de in vivo yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca 3 günlük tavuk embriyolarına in ovo recombinant human IGF-I enjeksiyonunun, embriyo aşamasında ve takiben yumurtadan çıktıktan sonra çizgili kas gelişimini artırdığı bildirilmiştir. Bu çalışma, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I'in Japon bıldırcını embriyolarının M. Longus colli dorsalis, pars thoracica (M. Spinalis thoracis) kasının gelişimi üzerine etkisini histolojik olarak incelemek amacıyla yapılmıştır.

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında çalışma azmini, bilgiyi ve uygulamayı öğrendiğim, her konuda yardımlarını ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Nurhayat GÜLMEZ' e, Yrd. Doç. Dr. Hakan KOCAMIŞ' a, Doç. Dr. Şahin ASLAN' a, Yrd. Doç. Dr. Mustafa SAATÇI'ye, Yrd. Doç. Dr. Turgut KIRMIZIBAYRAK'a, ayrıca Yrd. Doç. Dr. Mümtaz NAZLI' ya, ve maddi desteğinden dolayı KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Yönetim Kurulu Başkanlığına, maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen aileme ve emeği geçen herkese teşekkür ederim.

1. GİRİŞ:

Kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde bıldırcının geçmişi oldukça yeni sayılır. Yakın zamana kadar daha çok bir av hayvanı olarak insanların ilgisini çekmiş olup, zevk amacıyla hobi olarak da yetiştirilmiştir. Bıldırcının et ve yumurtasından yararlanılması amacıyla seleksiyona tabi tutulup, bu yönde yetiştirilmeye başlanması çok yenidir. Son yıllarda bıldırcının hayvansal protein kaynağı olarak üretime sokulmasına hizmet edebilecek bilgiler sahaya aktarılmaktadır.

Kas telleri (fibra muskularis) organizmanın aktif hareketlerini gerçekleştirmek için yapısal farklılaşmaya uğramış, özel dizilimde miyofibriller taşıyan kas hücreleridir (34,40,61). Normal durumdaki bir iskelet kası telinde aktin ve miyozinden oluşan miyoflamanların yerleşimine bağlı olarak miyofibril boyunca koyu ve açık bölgeler izlenir. Açık renkte görünenlere izotrop bantlar (I), koyu renkte görünenlere ise anizotrop bantlar (A) denir. Normal rutin boyamalarda I bandı asit boyalarla, A bandı ise bazik boyalarla boyanır (25,34,40,61,70).

Kanatlı iskelet kası hücrelerinde çekirdekler (nükleuslar) birden fazla ve oval şekillidir. Nükleuslar sarkolemin hemen altında bulunmasına rağmen bazı türlerde hücrenin ortasına yerleştiği de bildirilmektedir (25,34,61). Morfolojik özelliklerindeki farklılıklar açısından kanatlılardaki iskelet kası telleri memeli hayvanlardakine benzer yapıda olup (25,34,61,70), beyaz kas telleri, kırmızı kas telleri ve intermediyer kas telleri olmak üzere üç gruba ayrılırlar (34,61). Kanatlı kas tellerinin çapları, memeli hayvanlardaki gibi 10-120 mikron değerleri arasındadır (4,25,34,61). Beyaz kas telleri kalın, kırmızı kas telleri ise ince çaplıdır (12,25,34,61). Kasın hareket tipi, egzersiz miktarı, yaş, beslenme ve hayvanların bulunduğu sınıfa bağlı olarak da kas tellerinin çapı değişmektedir (61). Bu kas tellerini birbirinden ayıran en önemli özelliklerden biriside içerdikleri miyoglobinin miktarıdır. Beyaz kas tellerinde az, kırmızı kas tellerinde yoğun, intermediyer kas tellerinde ise orta derece de miyoglobinin bulunur (12,34,61).

Miyofibrillerin kas teli içindeki yerleşimi bakımından da kas telleri arasında farklılıklar vardır. Beyaz kas tellerinde miyofibriller tek tek ve eşit aralıklarla yerleşmişlerdir. Kırmızı kas tellerinde ise bir miktar miyofibril bir araya gelerek Cohnheim alanları adı verilen toplulukları oluştururlar (34,61). Cohnheim alanları, kanatlılarda genellikle birbirleri ile anastomozlaşan değişik biçimli bantlar halindedir (61). Güvercinlerin M. Pectoralis superficialisinden alınan örneklerin, histokimyasal inceleme sonuçlarına göre, beyaz kas tellerinin fazla miktarda glikojen içerdiği fakat yağdan yoksun olduğu, kırmızı kas tellerinde ise yağ oranının fazla, glikojen miktarının çok az olduğu belirtilmiştir (25).

Embriyoda iskelet kası hücreleri mezenşimden köken alır. Premiyoblastların temel oluşturduğu miyoblastlar birbirlerine kaynaşarak (füzyon) miyotüpleri meydana getirir ve miyotüplerde birleşerek miyofibrilleri oluştururlar (43,62,71,80).

Gençlerde kas tellerinde az miktarda miyofibril bulunur. Böyle kas telleri serbest ribozomlardan zengindir. Bu ribozomlar kas proteinlerini sentezlerler ve bu proteinler, yeni filamanlar halinde mevcut miyofibrillere eklenirler (61). Gelişim süresince belli bir zamana kadar kas lifleri kalınlık ve uzunluk itibari ile büyür, yeni miyoblastların (satellit hücrelerinden kaynaklanan) farklılaşması ile sayıca artarlar (4). Gelişmiş bir kişide kasın normalden fazla kalınlaşması, mevcut kas demetindeki liflerin çoğalması ile değil de liflerin hacimce büyümesi ile olur (4,61). Liflerin içerisinde yeni miyofibriller oluşmayıp sadece sarkoplazma kütlesi çoğalmıştır, miyofibril ve hücre sayısında değişme yoktur (4).

İskelet kaslarında kas telleri bir araya gelerek primer, sekonder ve tersiyer demetleri oluştururlar. Primer demetleri oluşturan kas tellerini sarkolemin dışında retikulum iplikleri taşıyan ince bir bağ dokusu (endomizyum) çevrelemiştir. Primer ve sekonder demetleri endomizyumdan daha kalın, kollagen ve elastik ipliklerden zengin bağ dokusu (perimizyum) sarar. Değişik büyüklükteki kas demetlerinden oluşan kasın bütününe kuşatan bağ dokusu ise epimizyumdur (25,34,40,61).

1. 1. Embriyonal Dönemde İskelet Kaslarının Gelişimi

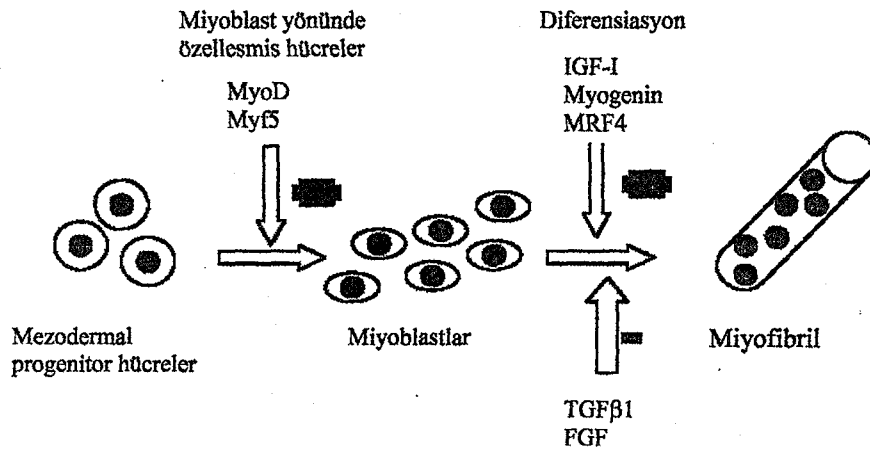
İskelet kası hücreleri (miyoblastlar) somitlerden ortaya gelişir (28,31,43,58,71,74). Somitler nöral tüpün her iki yanında yer alan paraksiyal mezodermin, kranialden kaudele doğru ilerleyen segmentasyonu ile oluşur (28,58,60). Mezodermden somitlerin ne zaman ve nasıl oluşacağı önceden belirlenmiştir (71).

Normal gelişimde çizgili kaslar miyoblastlardan gelişir. Miyoblastları oluşturan bu ilk hücrelere premiyoblast yada ilk miyoblastta denir (43,71,80). Bu premiyoblastları diğer kök hücrelerden morfolojik olarak ayırt etmek oldukça zordur (71).

Sırt kaslarını oluşturacak olan miyoblastlar, miyotomlarda segmental düzlem hizasında kas lifleri şeklinde birleşirler. Bu lifler inerve olduktan sonra sırt kaslarına dönüşürler. Kas lifleri nöral tüpe paralel uzanır. Segmental sırt kasları doğrudan miyotomlardan ortaya çıkmaktadır. Dermatomiyotomların ventral duvarında tek tek bulunan miyoblastlar ventrale doğru göç eder. Bunlar vücut duvarının ve ekstremiteler tomurcuklarının çizgili kaslarını oluşturacak olan iskelet kası kök hücreleridir (58). Ventral vücut duvarı ve ekstremiteler kaslarını oluşturacak olan miyoblastlar, miyotom ile dermatom arasındaki geçiş

bölgesinden tek tek göç ederler (58,74). Miyoblastların ekstremite tomurcuklarına olan bu göçü, segmente özgü CAM (Cell Adhesion Molecule) bileşimleri tarafından yönetilmektedir (58). Kas oluşum modelleri miyoblastların göç ettiği bağ dokuları tarafından kontrol edilir. Bu bağ dokuları baş bölgesinde, nöral krest hücrelerinden türer; vücut duvarı ve ekstremitelere ise somatik mezodermden köken alır (60).

Miyogenik regülatör faktörler (MRFs), sadece iskelet kaslarında ekspres olan transkripsiyonel faktörlerdir (74). Bunlar iskelet kasını oluşturacak kök hücrelerinden kasları oluşturma işlevinden sorumlu olan genlerdir. Bunlardan ilk keşfedileni MyoD genidir (58). Her çeşit dokuya dönüşebilen kök hücrelerin (multipotent), miyogenik kök hücrelerine dönüşümünden MyoD geni sorumludur. Bir kasın diferensiyasyonu için MyoD hızlı kaslarda, Myogenin ise yavaş kaslarda etkilidir (71). Bir diğer düzenleyici gen Myf-5 genidir. Myf-5 geni; miyotomlardaki miyoblastların özelliklerini kazanmasında, Myogenin geni ise kas tüplerinin terminal farklılaşmasında rol oynar (58). Bütün bunlara ilave olarak bir de MRF4 geni yer alır. MyoD ve Myf-5 genlerinin, progenitör hücrelerin miyoblast yönünde çoğalmalarından ve proliferasyonundan, Myogenin ve MRF4 genlerinin de diferensiyasyondan sorumlu olduğu bildirilmiştir (74). Kas fibrillerinin ve bağ dokunun ortaklaşa gelişmesine katkıda bulunan diğer bir büyüme faktörü ise, TGF β 1 (Transforming Growth Faktör- β)'dir. Lokal olarak TGF β 1 uyarıldığında fibroblastlar tarafından bağ doku gelişimini hızlandıran lokal maddeler üretirken, aynı miyogenezisi inhibe eder (71).



Şekil 1. İskelet kası miyogenezisinin şematize yapısı ve genlerin etkisi (74).

Miyotomda bulunan ve göç etmekte olan miyoblastlar, morfogenezle ilişkili hareketleri gerçekleştiren diğer embriyonal hücreler gibi muskarinik asetil kolin reseptörleri ihtiva ederler. Bu reseptörlerin uyarılması, InsP3 (İnositol fosfat-3) üzerinden, hücre içi kalsiyumun açığa çıkmasına yol açmakta ve açığa çıkan bu kalsiyum aktin-miyozin filamanlarının ameboid hareket benzeri kasılımını düzenlemektedir (58).

Miyotomu oluşturan epitel benzeri hücreler farklılaşacakları yerlere göç ederler ve miyoblastlara dönüştürler (80). Premiyoblastların temel oluşturduğu miyoblastlar birbirlerine füzyonla miyotüpleri meydana getirir ve miyotüplerde birleşerek miyofibrilleri oluştururlar (1,43,62,71,80). Miyoblastlar önce mitoz bölünme ile çoğalarak sayılarını artırır (1,80). Bu mitoz bölünme sayısı genetik olarak programlanmıştır. Embriyoların somitlerindeki mezodermal hücreler IGF-I ve PDGF (Platelet Derived Growth Factor) gibi büyüme faktörlerinin kontrolü altında çok sık olarak mitoz yaparlar (71).

Miyoblastlarda ağırlıklı olarak RNA sentezi olur. Bunun sonucu olarak ta büyük oval nükleus, belirgin bir nükleolus, yaygın kromatin ve bir çok ribozom meydana gelir. Miyoblastlar iki ucunda incelen ovale benzeyen bir yapı sergilerler (71). Miyoblastlar çok çekirdekli çizgili kasları yapabilmek için birbirleri ile birleşirler (füzyon). Miyoblastlar birbirleri ile temas ettiği yerlerde, ki burası genelde uçtaki sitoplazma uzantıdır, tight junctionlar oluştururlar (56,71).

Miyoblast içindeki cAMP miktarının artması füzyon olaylarını başlatır (71). Füzyon iki miyoblast arasındaki bir noktadan başlar (56,71). İki miyoblast arasında bağlantı kurmak için oluşturulan küçük delikler büyür, birleşince de membranda iz kalmaz. Hücre membranı altında koyu bir ağ meydana gelir, bu ağ zamanla yeniden yapılanma meydana getirir (miyotüp yapımı için) (71). Sonra bu hücreler, sitoplazmalarını kaynaştırarak (füzyon) çok çekirdekli miyotüpleri oluştururlar. Kontraktıl elemanların sentezlenmesiyle, enine çizgili iskelet kasına farklılaşacak olan bu miyotüpler, bir sinsityum halindedirler (1). Bu multinükleer sinsityumda, diferensiyel olmuş bir kas hücresi için özel ve karakteristik olan proteinler, yani aktin, myozin, tropomiyozin ve troponin (1,74) ile yine protein tabiatında olan asetil kolin reseptörleri ve kreatin fosfokinaz gibi maddeler bol miktarda sentezlenir. Kontraktıl elemanların sentezi sentralden başlayarak olur, bu arada nükleuslar, kontraktıl elemanların sentezinin artmasıyla yavaş yavaş periferde doğru itilirler ve çekirdekler miyofibriller tarafından sarılan sarkoplazmanın altına yerleşir (71). Miyotüpler, gelişip fibra muskularisleri oluşturma yolunda diferensiyel olarak tek tek veya gruplar halinde bağdokusu tarafından sarılırlar (1). Miyofibrillerde bulunan tüm proteinlerin sentezi aynı anda olur fakat

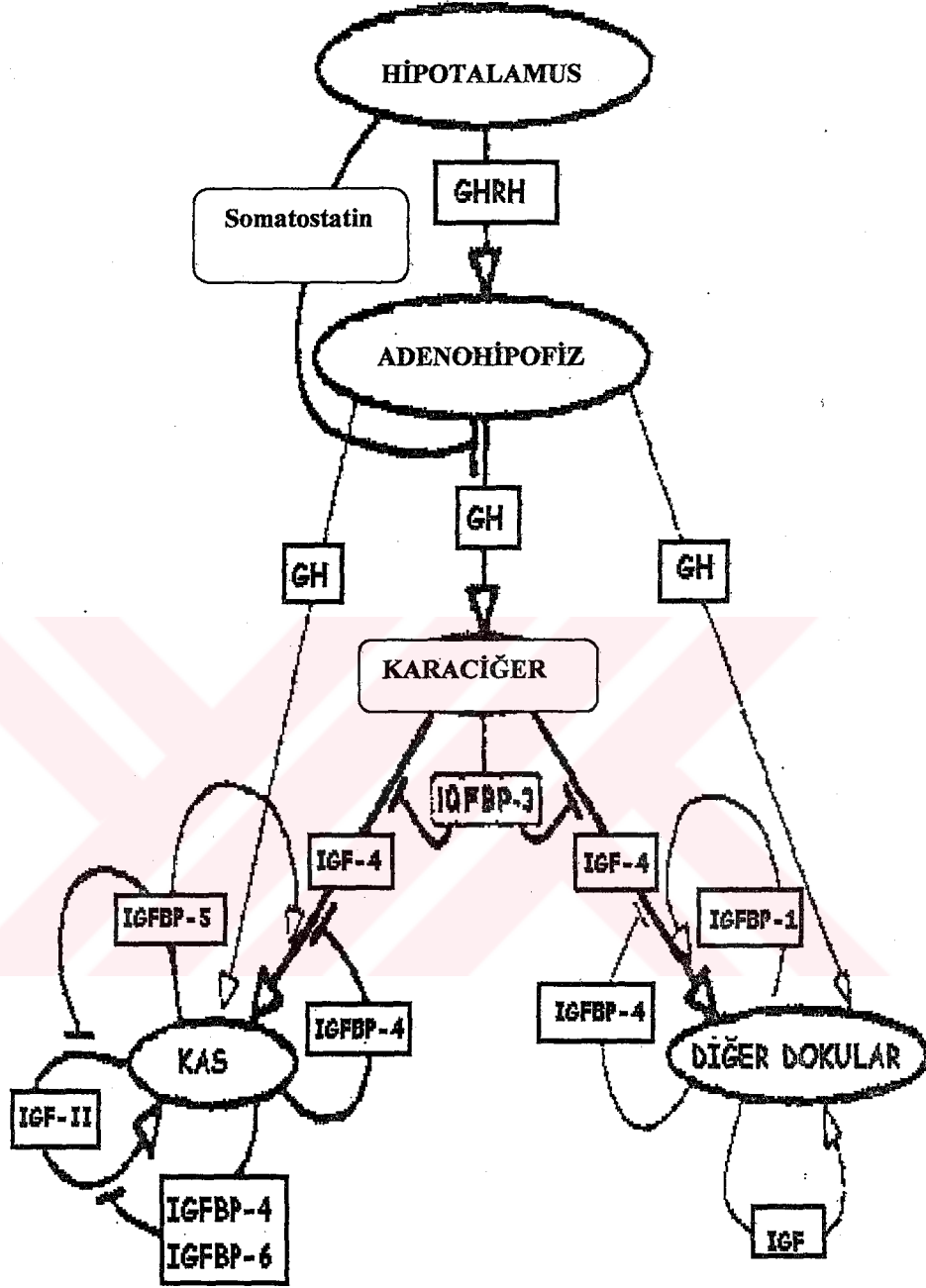
farklı kaslarda farklı büyüklükte miyoflamentler gözükür (71). Myozin 15-16 nm çapında, aktin 5-6 nm çapında, Z çizgisindeki flamentler ise 1-6 nm çapında gözükür (70,71).

T3 (Triiyodotironin) ve bunun gibi faktörler, miyoblastların aktivitesini düzenlerler. Hücre proliferasyonunu kontrol eden diğeri bir unsur da hücre siklusunun uzunluğudur. Siklusta G1 süresi değıştirilerek miyoblast proliferasyonu azaltılıp, artırılabilir (71). Kas dokusundaki miyofibrillerin sayısı doğumda sabitlenmiştir (56). Postnatal dönemdeki kas fibril sayısı; kök hücre (satellit hücre) sayısı ve bu kök hücrelerin bölünme sayısı tarafından belirlenir (43,71). Mitotik siklus ile miyoblast füzyonu arasındaki ilişki üzerine civciv iskelet kası üzerinde yapılan in vitro çalışmada, miyoblastların S, G2, M, fazlarında füzyonunun gerçekleşmediğı gösterilmiştir. Füzyon sadece G1 fazında meydana gelmektedir. Miyojenik hücreler G1 fazında birbirleriyle kontak kuramazlarsa S fazına devam ederler (7).

1. 2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri (Insulin-Like Growth Factors)

Büyüme hormonu, doğum sonrası büyüme, normal karbonhidrat, lipit, azot ve mineral metabolizması için gereklidir. Fakat, büyüme hormonu başta kemik, kıkırdak ve iskelet kası olmak üzere büyüme yeteneğinde olan hemen bütün beden hücrelerine doğrudan etkimeyip somatomedin adı verilen bir grup peptid aracılığı ile etkimektedir. Somatomedinlerin büyüme üzerindeki birçok etkisi, insülinin hem büyüme üzerindeki etkilerine hem de yapısal olarak insülinin amino asit dizilimine benzemektedir. Bu nedenle somatomedinler, insülin-benzeri büyüme faktörleri (insülin-like growth factors-IGF) olarak da adlandırılırlar (24,27,82).

IGF sistemi; IGF-I, IGF-II, IGF reseptörleri ve IGF bağlayıcı proteinlerden (IGFBPs) oluşmuştur (20,74). IGF ailesinin peptidlerinin, embriyonik ve fetal büyüme ile gelişmede önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir (47,75). IGF'lerin değışik dokularda sentezlendikleri ve bu olayda otokrin/parakrin mekanizmanın rol oynadığı bildirilmektedir (20,47,75).



Şekil 2. Büyüme hormonu ile insulin benzeri büyüme faktörleri ve onların bağlayıcı proteinleri arasındaki ilişki (20).

İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-I ve IGF-II) pankreastan salgılanmamalarına rağmen yapısal ve fonksiyonel olarak insülin ile ilişkilidirler (54). İnsülin benzeri büyüme faktörleri multifonksiyonel metabolik ve anabolik özellikte bir gruptur (47). İnsülin'in hücre büyümesi ve çoğalması üzerine etkilerini, IGF-I ve IGF-II'nin neden olduğu benzer etkilerden ayırt etmek güçtür. İnsülin'in, muhtemelde IGF-I ve IGF-II'nin, organogenesis ve gelişmedeki rolü, nadir görülen leprekaunizm (bir çeşit cücelik) olgularında açıklanmıştır. IGF-I ve IGF-II sırası ile 70 ve 67 amino asit içeren tek zincirli peptidlerdir. IGF-I ve IGF-II arasında %62 oranında benzerlik vardır ve her ikisinin içerdikleri peptid yapıları %50 oranında insülin ile özdeşdir. İnsülin benzeri büyüme faktörü I'in (IGF-I) primer, sekunder ve tersiyer yapısı, insüline %40 oranında benzerlik gösteren, molekül ağırlığı yaklaşık 7.6 KDa ağırlığında, 70 aminoasitden oluşan bir peptidtir (33,48). IGF-I'in amino asit sıralanmasının saptanması ilk olarak 1978'de (57) insan serumundan izole edilmiş peptidler üzerinde yapılan çalışmada ortaya konmuştur. IGF-I dört alt üniteden oluşmuştur. Bu alanlar A, B (insuline benzer), C (proinsuline birleşmiş peptidin analogu) ve D (insulinde mevcut değildir) alanlarından ibarettir (35). D alanı IGF-I'in, mitogenik gücüne katkıda bulunan karboksilin kısmıdır (33). İnsülin çok güçlü bir metabolik hormondur. Ancak IGF'ler büyümeyi uyarmada daha etkindir (54). IGF'lerin biyolojik etkileri, hücre yüzeyindeki sadece IGF'lere ilgi duyan reseptörlere bağlanması ile olmaktadır (64,82).

Büyüme ve büyüme ile ilgili doku ve organlarda büyüme hormonunun etkisi 70 aminoasit içeren IGF-I aracılığı ile başlar (2,20,27,82). Önceden somatomedin C olarak ta adlandırılan bu polipeptid, yapı bakımından proinsuline ve insülin reseptörlerine bağlanmasıyla da insuline benzer. IGF-II'nin kandaki düzeyi IGF-I'in iki katı olmasına karşın, büyüme hormonu etkileri ile en fazla ilgili olanı IGF-I'dir (82). IGF-I'in embriyodaki fonksiyonu IGF-IR (IGF-I Reseptörü)' üne bağlanmasıyla mümkündür ve GH'(Growth Hormon) dan bağımsızdır (2,47).

Kanatlı ve memeli IGF sistemleri arasında farklılıklar vardır. Bunlardan en belirgin olanı, tavuklarda bulunan serbest katyon mannoz 6- fosfat reseptörüdür (20,47), bu IGF-II'yi bağlamaz. Dolayısıyla kanatlılarda IGF-II'nin biyolojik fonksiyonlarına IGF-I R aracılık eder (47).

IGF-I sentezinin ve sekresyonunun yetişkin hayvanlarda asıl kaynağı karaciğer olmasına rağmen hemen hemen bütün dokularda sentezlendiği bildirilmiştir (6,9,66). IGF-I sekresyonu tipik olarak büyüme hormonuna bağlı olmasına rağmen, tavuk embriyo gelişimi

esnasında IGF-I'in sekresyonunun büyüme hormonundan bağımsız olduğu bildirilmiştir (73). Tavuk embriyolarının gelişimi aşamasında, IGF-I geninin ilk blastoderm safhasında gözlemlendiği (68), IGF-I'in serumda, inkübasyonun 9. gününde ölçülebildiği bildirilmiştir (41).

IGF-I'in erken ekspresyonu bu peptidin tavuk embriyo gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Örneğin, in vitro olarak IGF-I'in, endoderm, ektoderm ve mezodermden kaynaklanan 20 değişik hücrede DNA sentezini stimüle ettiği bildirilmiştir (77). IGF-I'in çizgili kas üzerine etkisi, in vitro olarak IGF-I' in myogenin genini stimüle ederek miyoblast diferensiasyonunu hızlandırdığı (20,21,63) ayrıca protein yıkımını azaltıp besin alınımını artırarak miyoblastlarda proliferasyonu hızlandırdığı bildirilmiştir (18). İn vivo olarak da 2 günlük tavuk embriyolarına IGF-I enjeksiyonunun (10-100 ng/per embriyo), 4 günlük tavuk embriyolarında genel gelişmeyi, büyümeyi ve metabolik parametreleri artırdığı gözlemlenmiştir (26). Ayrıca 3 günlük tavuk embriyolarına in ovo recombinant human IGF-I enjeksiyonunun embriyo aşamasında ve takiben yumurtadan çıktıktan sonra çizgili kas gelişimini artırdığı bildirilmiştir (42).

Tavuklarda, insan IGF-I'inin biyolojik aktivitesi üzerine bir çok kanıtlar bulunuyor. Örneğin; recombinant human IGF-I, tavuk embriyo kondrositlerinde RNA, protein, proteoglikan ve DNA sentezini uyarır (23). İn vitro bir araştırmada da rh IGF-I'in (recombinant human IGF-I) yüksek titrede tip I IGF reseptörüne bağlanarak, yumurtadan çıkmış tavuklardan izole edilmiş kas hücrelerinde proliferasyonu, diferensiasyonu ve protein gelişimini uyardığı gösterilmiştir (14).

IGF-I'e ilaveten ikinci bir insülin benzeri büyüme faktörü de IGF-II'dir. 7.5 KD ağırlığında bir polipeptit olup, yetişkin insan ve tavuk plazmasında 20-80 nM'lik konsantrasyonda bulunur (11). Memelilerdeki fetal büyüme faktörü olarak kabul edilmektedir (47). IGF-II proteini ve IGF-II gen ekspresyonunun 4 günden büyük tavuk embriyolarının bacak, göz ve kalbinde bulunduğu tespit edilmiştir (16,47). Buna rağmen IGF-II'nin kanatlılardaki biyolojik fonksiyonları tam aydınlatılamamıştır.

1.2.1. IGF Reseptörlerinin Yapısı ve Fonksiyonları

Hücre membranına lokalize olan IGF reseptörlerinin iki tipi (IGF-IR ve IGF-IIR) vardır. Bunlar enzim bağlayıcı reseptör ailesine aittir (53,76).

IGF-I reseptörü (IGF-IR), insülin reseptörüne çok benzer, muhtemelen aynı hücre içi mekanizmayı kullanır. IGF-IR tipik bir tirozin-spesifik protein kinaz olup, disülfit köprüsü tarafından bağlanan iki β alt ünitesi (90 KDa) ve iki α alt ünitesinden (135 KDa) oluşan

glukozlanmış heterodimerdir (38,45). Ligand tarafından aktif hale getirilmiş α alt üniteleri extraselüler bağlanma alanından ibarettir. β alt üniteleri ise bir transmembran alanından ibarettir ve intraselüler tirozin otofosforilasyonundan sorumludur (37,59).

IGF-I reseptörünün, hücre siklusunun ilerleyişi, hücrenin yaşaması, farklılaşması ve gelişimi bakımından kontrol edilmesinde koordine edici bir rolü vardır (47). Bu reseptörün farelerde doğum öncesi inaktivasyonu (knockout), bir çok dokuda hipoplazi oluşturarak geriye dönüşümsüz şiddetli büyüme bozukluklarına neden olur. Reseptör yokluğuna rağmen bu hayvanlar canlı olarak doğar fakat birkaç saniye içinde solunum yetmezliğinden ölürlere (64). Büyüme periyodu esnasında GH- IGF-IR ekseninin, endokrin duruma, genetiğe, yaşa ve beslenme şartlarına bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (47).

IGF-II reseptörü (IGF-IIR) yapısal olarak IGF-IR'den farklıdır (38,45,64). Monomerik bir proteindir ve mannoz fosfat reseptörü olarak bilinir. Tip-II reseptörü otokinaz aktiviteden yoksun bir monomerdur (250 KDa) (38,45). Bu reseptörün sinyal aktarımı şimdiye kadar görülmemiştir. Bu nedenle IGF-II'nin, IGF-I üzerinden faaliyet gösterdiği düşünülmektedir. IGF-IIR'leri IGF-II'nin sirkülasyondan kaldırılmasında rol oynar. IGF-IIR geni farelerde gen manuplasyonları ile ortadan kaldırıldığında, iskelet anomalileri, fetusta aşırı büyüme ve doğuma yakın zamanda ölüm gözlenmiştir. Bunun sebebi ise fetusun yüksek düzeyde IGF-II'ye maruz kalmasıdır ve buda IGF-II'nin fetal büyümedeki rolünü gösterir (64).

1.2.2. IGF Bağlayıcı Proteinler

İnsülininden farklı olarak IGF'ler, serumda ve diğer biyolojik sıvılarda bulunan yapısal ve evrimsel olarak birbirine benzeyen 6 (IGFBP-1'den IGFBP-6'ya kadar adlandırılan (33)) tane bağlayıcı proteine sahiptir. Dolaşımda IGF'lerin %75-80'i 150 kDa'luk bir kompleks halinde bulunur. Bu komplekste bir molekül IGF-I yada IGF-II, bir molekül 85 kDa'luk aside dayanıksız protein alt ünitesi ve IGFBP-3 (IGF bağlayıcı protein-3) yer alır. Geriye kalan IGF'ler (%20-25) diğer bağlayıcı proteinlerle 50 kDa'luk bir kompleks yapar. IGF'lerin %2-3'lük bir kısmı da serbest olarak sirkülasyonda bulunur (64).

Bazı bağlayıcı proteinler dokuya özgü olarak eksprese olur ve her bir IGF için farklı affiniteye sahiptir. IGFBP'ler sirkülasyonda bulunan yüksek miktardaki IGF'lerin insülin'e benzer etkilerini azaltarak faaliyetlerini engellemenin yanı sıra IGF'lerin fonksiyonlarını negatif yada pozitif olarak düzenleme yeteneğine de sahiptirler. Son çalışmalar IGFBP'lerin

IGF'lerden bağımsız olarak ta fonksiyon gördüklerini bildirmektedir. Son yıllarda 6 tane yüksek affiniteli IGFBP'nin yanı sıra, 4 tane de düşük affiniteli bağlayıcı protein varlığından söz edilmektedir. Düşük affiniteli bağlayıcı proteinler IGFBP'lere benzeyen proteinler olarak adlandırılır. IGFBP'lerin proteolizi, fosforilasyonu ve hücrelere yada ekstrasellüler matrise yapışması IGFBP'lerin IGF'lere bağlanma affinitelerini etkileyen üç mekanizmadır. IGFBP'lerin in vivo rolleri iki nedenden dolayı hala kesin olarak bilinmemektedir. Birincisi fonksiyon ve regülasyonlarının kompleks olmasından, ikincisi ise IGFBP'lerle ilgili bilgilerin çoğunluğunun in vitro çalışmalardan elde edilmesinden dolayıdır (64).

IGF'ler şüphesiz fetusun gelişmesinde rol oynarlar. IGF-I, IGF-II yada IGF-I R'nün genetik olarak ortadan kaldırıldığı farelerde doğumda önemli derecede büyüme geriliği gözlenmiştir. Özellikle insanlarda umbilikal kanda bulunan IGF-I miktarı ile fetus ağırlığı ve doğum ağırlığı arasında doğru orantı vardır. Aynı şekilde IGFBP-1'in insanlarda ve kemirgenlerde uterus içerisindeki büyümenin düzenlenmesine katıldığı bilinir (64).

IGFBP'lerin, IGF'lerin hipoglisemik fonksiyonlarını azaltıcı rolleriyle beraber IGFBP-1'in karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesi açısından özel bir rolü vardır. IGFBP-1, IGF-I ile birlikte ratlara intravenöz olarak enjekte edildiğinde IGFBP-1, IGF-I'in hipoglisemik etkisini azaltmıştır. Ayrıca IGFBP-1 tek başına intravenöz olarak enjekte edildiğinde ise kanda glikoz seviyesini yükseltmiştir (20).

Glukagon ve glikokortikoidlerin aksine (ki bunlar IGFBP-1 geninin ekspresyonunu stimüle eder) insülin, IGFBP-1 geninin ekspresyonunu inhibe eder. Kan dolaşımında IGFBP'ler içerisinde en çok bulunan IGFBP-2'dir. Bu bağlayıcı protein IGF-II'ye IGF-I'e nazaran daha yüksek affiniteyle bağlanır. IGF-II'nin yüksek düzeyde eksprese olduğu transgenik farelerde serum IGFBP-2 seviyesi artmıştır. IGFBP-3, serumda diğer IGFBP'lere oranla daha çok bulunur. IGFBP-3'ün IGF'lere olan affinitesi diğer bağlayıcı proteinlere oranla çok yüksektir. IGFBP-3'ün IGF'lere olan ilişkisi hem inhibisyon hem de stimülasyonla sonuçlanabilir. Bunlara ilaveten IGFBP-3, IGF'lerden bağımsız olarak ta büyümeyi stimüle edebilir. IGFBP-4 ilk olarak insan osteosarkomasında izole edilmiştir. Embriyonik gelişim sırasında ise, gelişmekte olan extremitte tomurcuklarında eksprese olur. Buna ilaveten kıkırdak dokunun gelişeceği yerlerde de saptanmıştır. IGF-I bilinen en iyi antiapoptotik faktörlerden biridir. Embriyonik gelişim sırasında IGFBP-4'ün interdigital (parmak arası) dokulardaki ekspresyonunun, IGF-I'in antiapoptotik etkisini kaldırmaya yönelik olduğu yorumu yapılmıştır. IGFBP-5 kemik dokularında en yaygın bulunan bağlayıcı proteindir. IGFBP-5 hidroksiapatitlere karşı aşırı affinitesinden dolayı, IGF'lerin, özellikle

IGF-II'nin depolanmasında görevlidir. IGFBP-6, IGF-II'ye IGF-I'e nazaran daha yüksek affinite ile bağlanır (64).

1.2.3. Kas Gelişiminde IGF'lerin Rolü

IGF'lerin kas büyümesi ve gelişmesi üzerine çok önemli etkilerinin olduğu bildirilmiş (20,75) olup, bu etkilerin çoğunun IGF-I reseptörleri aracılığı ile olduğu gösterilmiştir (75).

IGF-I ve IGF-II miyoblastlarda proliferasyon ve diferensiasyonu, hücre içine besin alımını artırır ve protein yıkımına engel olur (75). Ayrıca in vitro olarak, hormonların, serum veya diğer proteinlerin yokluğunda, kas hücreleri IGF'lerin fizyolojik düzeyleri ile muamele edildiği zaman bu IGF'lerin anabolik etkileri gözlemlenmiştir. IGF'lerin kas hücreleri üzerine etkileri daha çok dolaşımdaki normal yada normale yakın konsantrasyonları ile olur (19,49). IGF-I'in fizyolojik konsantrasyonları, rat L6 miyoblastları (18), primer tavuk embriyo miyoblastları (63) ve rat satellit hücreleri (13) gibi kas hücre tiplerinin bir çok çeşitinde differensiyasyonu uyarır.

Miyoblast kültürlerinde IGF'lerin miyoblast proliferasyonunu uyardığı bildirilmiştir (20). Büyüme hormonu normal dolaşımdaki düzeylerinden daha yüksek konsantrasyonda verildiği zaman bile kültür miyoblastlarında anabolik etki uyarmaz (17,18,19). Bu veriler büyüme hormonunun kas hücreleri üzerine anabolik etkilerinin IGF'ler aracılığı ile olduğunu göstermektedir. Ayrıca yetişkin ratların extensor digitorum longus kasında bir hasar meydana getirilerek yapılan bir araştırmada (15), IGF-I'in, iskelet kaslarının rejenerasyonu esnasında, büyüme hormonundan bağımsız olarak, tropik faktör gibi lokal bir şekilde üretildiği ve kas IGF-I mRNA düzeyinin en yüksek seviyesinin de hasardan 3 gün sonra bulunduğu bildirilmiştir. Bu şekilde IGF-I mRNA ekspresyonunun, miyoblast proliferasyon ve diferensiyasyon periyodu ile uyumakta olduğu kabul edilmektedir. Her ne kadar IGF-I mRNA'sındaki artışı başlatan hücrel sinyaller bilinmese de, kas rejenerasyonu esnasında IGF-I üretimindeki artışın yangısal yanıt sırasında salınan faktörlere yada hücrel proliferasyon/differensiyasyona bağlı olabileceği düşünülmektedir (42).

Bir diğer araştırmada (22) rat kalp kaslarının IGF-I'e yağ dokudan 20 kat daha hassas olduğu ve muhtemelen IGF-I'in, IGF reseptörleri vasıtasıyla kalpte glukoz metabolizmasını etkilediği bildirilmiştir. Bu yüzden hayvanlara IGF'ün fizyolojik konsantrasyonlarının tatbik edilmesi, yağ dokuda herhangi bir etki olmaksızın kaslarda glikojen ve protein sentezinde bir artışa yol açabilir.

Besin ve enzimlerin gerekli olduğu bir periyot olan hücre siklusunun G1 fazındaki miyoblastlar, ya S fazı ile (DNA sentezi fazı) devam ederler yada siklustan geri çekilir ve birbirleriyle kaynaşarak postmitotik miyotüp biçimine dönerler. Bu yüzden bir mitojenin, IGF-I'de olduğu gibi DNA sentezini artırma özelliği, hücre siklusunun G1 fazındaki hücre için harcanan zamanı minimize eder. IGF'lerin, serumsuz medium da inkube edilmiş L6 miyoblastlarda diferensiyasyonu uyardığı ve IGF konsantrasyonuna bağlı stimülasyonun derecesinin düşük konsantrasyonlarda (0.1-10 ng/ml) uyarıcı olduğu, fakat yüksek konsantrasyonların (100 ng/ml veya daha fazla) etkiyi azalttığı, IGF-I'in IGF-II veya insulinden yaklaşık olarak 10 kat daha kuvvetli etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu da proliferasyon ve diferensiyasyonun özellikle IGF-I tarafından uyarıldığını gösterir (18).

IGF-I'in çizgili kas üzerine etkisi in vitro olarak IGF-I'in myogenin genini stimüle ederek miyoblast diferensiyasyonunu hızlandırdığı (21,63), ayrıca protein yıkımını azaltıp besin alınımını artırarak miyoblastlarda proliferasyonu hızlandırdığı bildirilmiştir (18). İn vivo olarak ta 2 günlük tavuk embriyolarına IGF-I enjeksiyonunun (10-100 ng/per embriyo) 4 günlük tavuk embriyolarında genel gelişmeyi, büyümeyi ve metabolik parametreleri artırdığı gözlenmiştir (26).

Kocamış ve arkadaşları (42) tarafından, 3 günlük tavuk embriyolarına in ovo recombinant human IGF-I enjeksiyonunun (100 ng/per embriyo) embriyo aşamasında ve takiben yumurtadan çıktıktan sonra çizgili kas gelişimini artırdığı bildirilmiştir. Bu çalışmada aynı enjeksiyon prodesüdürenün Japon Bildircını embriyolarının çizgili kaslarının gelişimi üzerine etkilerinin histolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada materyal olarak Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Uygulama ve Araştırma Çiftliğinden sağlanan, 40 adet dömlü Japon bildircini (*Coturnix coturnix japonica*) yumurtası kullanıldı. Yumurta içi enjeksiyon aşağıda tarif edildiği gibi yapıldı (42).

2.1. Enjeksiyon Prosedürü:

İnkübasyonun 3. günündeki yumurtaların küt uçları % 70'lik etanol ile dezenfekte edildikten sonra bu küt uça bir noktadan, chorio-allantoic zara zarar vermeden, dışı aleti (dental drill bit) ile küçük bir delik açıldı. Açılan delikten, ucuna 22 Gauge'lik enjektör iğnesi takılı, otomatik pipetle, her bir yumurtanın albumini içerisine bir kez olmak üzere recombinant human IGF-I (100 ng/ embriyo) enjekte edildi. Recombinant human IGF-I (rh IGF-I) 10 ml asetik asit ve % 0,1'lik BSA (Bovine Serum Albumin) ile hazırlandı. Enjeksiyondan sonra açılan delik sticker ile kapatılarak kontrol grubu yumurtalar ile birlikte nem oranı % 86-87, sıcaklığı 37 °C' ye ayarlanan inkübatöre konuldu (42). Uygulamada kullanılan recombinant human IGF-I Dr. A. F. Parlow (UCLA, CA, USA) tarafından sağlanmıştır.

2.2. Embriyoların Toplanması ve Histolojik Preparatların Hazırlanması:

Yumurtaların kuluçka makinasına ilk konulduğu saat "0" zaman dilimi kabul edilip, 7. günden itibaren kuluçkadan çıkış gününe kadar (16. gün) düzenli olarak 24 saatte bir, enjeksiyon yapılan grup ve kontrol grubundan yumurtalar alındı.

Yumurtalardan embriyo toplama işlemi, petri kabı içerisinde ve canlı olmaları dikkate alınarak yapıldı. Araştırmada embriyoların *M. Longus colli dorsalis*, *pars thoracica* (*M. Spinalis thoracis*) kası (5) alındı. Toplanan embriyolar % 10'luk formol-alkol ve bouin tespit solusyonları içinde tespit edildi. Tespit olan doku örnekleri; dereceli alkoller, metil benzoat ve benzollerden geçirildikten sonra paraplastta bloklanarak her bir bloktan 5-6 mikron kalınlığında seri kesitler alındı. Kesitlere; rutin incelemeler için Crossmanın üçlü boyaması ve Hematoksilen-eosin boyamaları ile glikojen için PAS (periodic acid Schiff) boyaması (44) uygulandı.

Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskobunda (Olympus BX51) incelendi. Bulgular mikrofotografi ile tespit edildi. Mikrometrik ölçümler, mikroskoba uyarlanan okülemikrometre yardımıyla alındı. Hücre sayımları birim alanda (0.01 mm², birim alan kabul edildi.) ve araştırılan kasın enine kesitinin tamamında yapıldı.

İstatistiki değerlendirme için minitab paket programı (52) ile F-testi ve T-testi (36) uygulandı.



3. BULGULAR

İnkübasyonun 7. günü; İnkübasyonun bu gününde kontrol grubu embriyolarda, *M. Longus colli dorsalis, pars thoracica (M. Spinalis thoracis)* kası şekillenmişti. Kas telleri belirgin bir demet yapısı oluşturmamakla birlikte, 3-5 tanesinin bir araya toplandığı, fakat tam bir demet yapısı oluşturmadığı ve hücrelerarası bağ doku oranının fazla olduğu gözlemlendi. Çekirdekler genellikle kas hücresinin ortasında yerleşmiş ve oval, bazılarında ise yuvarlak şekilli idi. Boyuna kesitlerde bazı alanlarda miyoblastların kaynaşarak miyotüpleri oluşturduğu gözlemlendi (Şekil-3). Miyotüpü oluşturan hücrelerin çekirdekleri oval şekilli idi ve miyotüpün merkezinde sıralanmıştı. Bu günde morfolojik olarak kırmızı ve beyaz kas hücresi ayrımı yapılamadı, fakat enine çizgilenme belirlemeye başlamıştı. PAS boyamasıyla kas hücrelerinde glikojen yoğun olarak gözlemlendi. Kontrol grubunda kas hücresi sayısı ortalama, birim alanda 76.50, tüm alanda 430.90 iken birim alandaki kas hücresi çapı 3.72μ olarak ölçüldü.

IGF-I enjekte edilmiş embriyolarda, 7. günde kasın kontrol grubuna göre daha iyi geliştiği gözlemlendi. Enine çizgilenme kontrol grubuna göre daha belirgindi (Şekil-4). Glikojen miktarının da kontrol grubuna göre fazla olduğu dikkati çekti (Şekil-5).

IGF-I enjekte edilmiş embriyolarda bu günde, kas hücresi sayısının birim alanda ortalama 95 adet, tüm alanda ise ortalama 548.60 adet olduğu ve kas hücre çapının ise ortalama 5.01μ olduğu tespit edildi. IGF-I uygulanan grupta, kontrol grubuna göre kas hücrelerinin sayısının hem birim alanda, hem de tüm alanda daha fazla sayıda olduğu ve tüm alandaki fark istatistik olarak ($P < 0.001$) önemli bulundu (Tablo 3.). Kontrol grubu ile IGF-I uygulanan grup arasında, kas hücre çaplarının istatistik açıdan farklı ($P < 0.001$) olduğu belirlendi (Tablo.2).

İnkübasyonun 8. günü; Bu günde kontrol grubunda bulgular, 7. gündeki bulgularla benzer olarak gözlemlendi. Fakat kas hücrelerindeki enine çizgilenmenin 7. güne göre daha belirgin olduğu, miyotüplerin daha uzun bir yapı kazandığı, çekirdek sayısındaki artma ile beraber çaptada büyüme gözlemlendi. Ayrıca kas tellerinin enine kesitlerinde çekirdeklerin ortada ve yuvarlak olduğu, periferde olan çekirdeklerin ise daha oval bir şekilde olduğu belirlendi. Miyotüpler içerisinde merkezi konumlu çekirdeklerin daha düzenli sıralandığı görüldü. Kas hücrelerinde glikojen miktarı 7. güne göre azalmıştı. Kas hücresi sayısı kontrol grubunda ortalama, birim alanda 73.90, tüm alanda ise 480.30 adet sayıldı. Kas hücre çapı ise 5.01μ olarak ölçüldü.

IGF-I' enjekte edilmiş grupta, gelişmenin kontrol grubuna göre biraz daha ileri düzeyde olduğu gözlemlendi. Enine çizgilenme daha belirgindi. Kas hücresi sayısının birim alanda ortalaması 80.60, tüm alanda ise 586.20 adet ve kas hücre çapı ise ortalama 6.23 μ olarak ölçüldü. Bu günde bir önceki güne göre kas hücre sayıları artarken her iki grupta da bağ doku oranının azaldığı gözlemlendi. Ayrıca kontrol grubu ile IGF-I uygulanan gruplar arasında kas hücre sayılarının tüm alanda istatistiki olarak ($P < 0.001$) önemli olduğu belirlendi (Tablo 3.). Embriyoların gelişimine paralel olarak kontrol grubunun 7. ile 8. günleri arasında kas hücre çapındaki büyüme farkının önemli olmasına rağmen, IGF-I uygulanan grubun 7. ile 8. günleri arasında farkın önemli olmadığı (Tablo 1.), ancak kontrol grubu ile IGF-I uygulanan grup arasında, kas hücre çaplarının istatistiki açıdan farklı ($P < 0.001$) olduğu belirlendi (Tablo.2). Kas hücrelerinde glikojen miktarı 7. güne nazaran azalmakla birlikte kontrol grubundan daha fazla olduğu gözlemlendi.

İnkübasyonun 9. günü; Kontrol grubunda gelişmenin bir önceki güne göre daha ileri düzeyde olduğu, kas dokuda hücre sayısı artarken, bağ doku oranının önceki güne göre azaldığı gözlemlendi. Kas hücrelerinin bir araya gelerek primer demetlerin oluştuğu saptandı (Şekil-6). Çekirdek yerleşiminin bazı hücrelerde periferde ve uzun-oval şekilli olduğu ve miyotüplerin boylarının gelişime paralel olarak uzadığı ve çapta da artma olduğu belirlendi. 8. günde başlayan, glikojen miktarındaki azalma bu günde daha bariz olarak görüldü. İnkübasyonun bu günündeki kontrol grubun da birim alandaki kas hücrelerinin sayısı ortalama 68.70, tüm alanda 533.80 adet iken kas hücresi çaplarının ortalama 6.33 μ olduğu belirlendi.

IGF-I uygulanan gruptaki kas hücrelerinde glikojen miktarı, kontrol grubundan fazla, fakat bir önceki günkü IGF-I uygulanmış gruptan az olarak belirlendi. Ayrıca bu gündeki IGF-I uygulanan grupta, birim alandaki kas hücrelerinin sayıları ortalama 69.70 adet, tüm alanda 626.40 adet olduğu ve kas hücresi çapları ise ortalama 6.95 μ olarak tespit edildi. Bu günde birim alanda kas hücre çapları bakımından kontrol grubunun kendi içerisinde hem 8. ile 9. günler, hem de 7. ile 9. günler arasındaki farkın önemli, IGF-I uygulanan grupta ise 8. ile 9. günler arasında önemli bir fark olmamasına rağmen 7. ile 9. günler arasındaki farkın önemli olduğu tespit edildi (Tablo 1.). Bununla beraber kontrol grubu ile IGF-I uygulanan grupların, 9. gününde kas hücresi çapı bakımından aralarındaki farkın istatistiki açıdan ($P < 0.001$) önemli olduğu bulundu (Tablo 2.).

Kas hücre çaplarının büyümesi nedeni ile beraber birim alana düşen kas hücresi sayısı azalmıştı. Ancak kontrol grubu ile IGF-I uygulanan gruplar arasında kas hücre sayı farkının tüm alanda istatistiki olarak ($P < 0.001$) önemli olduğu tespit edildi (Tablo 3.).

İnkübasyonun 10. günü; Bu günde de kontrol grubunda embriyonun gelişimine paralel olarak kasın gelişimi devam ediyordu. Bu gelişimde, her iki grupta da kendi içlerinde kas hücre çapı bakımından 9. ile 10. günler arasında önemli bir fark olmadığı ancak her iki grubunda 8. ile 10. günleri arası farkın önemli olduğu belirlendi (Tablo 1.). Kas hücrelerinin oluşturduğu primer ve sekonder demetler belirgin olarak gözlemlendi (Şekil-7). Dokuda bağ doku oranının önceki güne göre azaldığı, hücre oranının giderek arttığı ve kas hücrelerinin çekirdeklerinin oval şekilde ve çok sayıda olduğu gözlemlendi. Diğer taraftan miyotüplerin şekillenip, büyümelerinin de devam ettiği saptandı. Bu günde her iki grup embriyoların kas hücrelerinin de glikojen miktarı iyice azalmıştı. Kontrol grubunda kas hücresi sayısı ortalaması birim alanda 61.60 adet, tüm alanda 595.80 adet iken hücre çapı ortalama 7.39 μ olarak ölçüldü. IGF-I uygulanan grubun kas hücre sayısının birim alanda 67.60 adet, tüm alanda 657.30 adet olduğu ve hücre çapının ise ortalama 8.16 μ olduğu belirlendi.

Bu günde kas hücrelerinin çapının IGF-I uygulanan grupta daha büyük olduğu ve iki grup arasında kıyaslandığında ise farkın ($P < 0.001$) önemli olduğu bulundu (Tablo 2.). Ayrıca kas hücrelerinin sayıları bakımından da iki grup arasında, tüm alandaki kas hücresi sayısının farklı ($P < 0.001$) olduğu belirlendi (Tablo 3.).

İnkübasyonun 11. günü; Bu gündeki bulgular, bağ doku oranında azalma, kas hücresi ve damar yoğunluğundaki artma dışında bir önceki güne ait bulgularla benzer olarak gözlemlendi. M. Longus colli dorsalis, pars thoracica (M. Spinalis thoracis) kasının bulunduğu bölgeden, bütün embriyodan alınan enine kesitlerde göğüs kasları gibi bazı kasların kas hücrelerinde PAS boyamasıyla glikojen gözlenirken M. Longus colli dorsalis, pars thoracica (M. Spinalis thoracis) kasında gözlenemedi. Kas hücrelerinin birim alandaki ortalama sayısının 58.90 adet ve tüm alanda 696.80 adet olduğu belirlendi, kas hücresi çapı ise 8,63 μ olarak ölçüldü. IGF-I uygulanan grupta ise kas hücre sayısının birim alanda ortalama 57.40 adet, tüm alanda ise 743.60 adet olduğu ve hücre çapının da ortalama 10,03 μ olduğu tespit edildi. Bu günde hem kontrol hem de IGF-I uygulanan gruptaki kas hücrelerinin çapındaki artışın bir önceki güne göre istatistiki açıdan önemli olduğu (Tablo 1.) ve kontrol grubu ile IGF-I grubu arasında kas hücrelerinin çap farklarının ($P < 0.001$) önemli olduğu tespit edildi (Tablo 2.).

Ayrıca kas hücrelerinin sayısal değerlendirilmesinde tüm alandaki hücre sayısı farkının ($P < 0.001$) önemli olduğu gözlemlendi (Tablo 3.).

İnkübasyonun 12. günü; Bulgular 11. günde benzer olmakla beraber miyofibrillerde enine bantlaşma daha net görüldü (Şekil-8). Ayrıca kas mekikleri de bu günde bariz olarak belirlendi (Şekil-9). İnkübasyonun bu günündeki kontrol grubuna ait kas hücrelerinin birim alandaki sayısı ortalama 56.80 adet, tüm alanda 782.10 adet sayılırken kas hücresi çapı ise ortalama 10.36μ olarak ölçüldü. IGF-I uygulanan grupta ise birim alandaki kas hücresi sayısı ortalama 52.80 adet, tüm alanda kas hücresi 782.10 adet iken kas hücresi çapı ise ortalama 11.16μ olarak ölçüldü.

Gelişimle doğru orantılı olarak kontrol grubunun kendi içerisinde kas hücresi çaplarının bir önceki gün ile farklarının önemli olmasına rağmen IGF'I uygulanan grupta 11. ile 12. gün arasında çap bakımından önemli bir fark görülmedi (Tablo 1.). Ancak iki grup çap bakımından kıyaslandığında ise IGF'I uygulanan gruptaki kas hücrelerinin çaplarının kontrole göre daha büyük olduğu ve istatistiki açıdan ($P < 0.001$) önemli olduğu görüldü (Tablo 2.).

Kas hücre sayıları iki grupta incelendiğinde birim alana düşen kas hücresinin, IGF-I uygulanan grupta az olduğu, kontrol grubunda ise daha fazla olduğu gözlemlendi. Bunun yanı sıra tüm alandaki kas hücre sayıları kıyaslandığında ise IGF'I uygulanan grubun kontrole göre daha fazla sayıda kas hücresi içerdiği ve bunun da ($P < 0.001$) önemli olduğu belirlendi (Tablo 3.).

İnkübasyonun 13. günü; Kas hücrelerinin sayısının arttığı ve çekirdeklerin çoğunlukla periferde ve oval şekilde olduğu görüldü. Enine kesitlerde kas hücreleri arasında paketlenmenin daha sıkı olduğu, hücrelerin değişik şekiller aldığı, kas dokusu oluşumunun tam olarak şekillendiği ve yaygın olarak kan damarlarının bulunduğu gözlemlendi. Miyofibriller diğerlerine göre çok daha büyük olan hücrelerde bariz olmasına rağmen, bu günde de kırmızı kas-beyaz kas teli ayrımı tam yapılamadı. Boyuna kesitler de ise 7. günde belirlenen enine çizgilenme gelişimle beraber barizleşirken bu günde daha da belirgin olarak görüldü (Şekil-10). Ayrıca bu günde birim alandaki kas hücresi sayısı ortalama 52.20 adet, tüm alanda 967.80 adet sayılırken kas hücresi çapı ise ortalama 11.03μ olarak ölçüldü.

IGF-I uygulanan grubun 13. gününde ise enine kesitlerde bulguların benzer olduğu gözlemlendi. Grupların her ikisinde de, IGF-I grubunda biraz daha fazla olmak üzere, glikojen

yeniden belirlendi. Kas hücre sayısı birim alanda ortalama 50.30 adet iken tüm alanda 1049.80 adetti, kas hücresi çapı ise ortalama 11.81 μ değerinde bulundu.

Gelişimin bu gününde grupların kendi içerisindeki kas hücre çapındaki artışın her iki grup içinde bir önceki güne nazaran önemli bir anlam ifade etmediği halde her iki grupta da 11. günle kıyaslanınca önemli bir farkın olduğu görüldü (Tablo 1.). Bu gündeki kontrol grubu ile IGF-I uygulanan grup arasında ise hücre çapı farkının ($P < 0.001$) önemli olduğu gözlemlendi (Tablo 2.). İki grup arasında tüm alandaki kas hücre sayısı farklarının ise istatistiki açıdan ($P < 0.001$) önemli olduğu tespit edildi (Tablo 3.).

İnkübasyonun 14. günü; Kontrol grubunda enine kesitlerde kas hücreleri arasında daha sıkı bir paketlenme olduğu gözlemlendi (Şekil-11). Bu günde kırmızı kas-beyaz kas teli ayırımı bazı bölgelerde yapılmaya başlandı. Kas hücre sayısının birim alanda 51.80 adet, tüm alanda 1081 adet olarak sayılırken kas hücre çaplarının da ortalama 11.37 μ olduğu tespit edildi.

IGF-I uygulanan grubun 14. gününde de bulguların benzer olduğu gözlemlendi. Kas hücre sayısı birim alanda ortalama 49.10 adet, tüm alanda 1116.20 adet iken kas hücresi çapının da ortalama olarak 11,89 μ değerinde olduğu belirlendi. Yine bu günde de her iki grubun da kendi içerisinde kas hücre çapları farkının önceki iki güne göre önemli olmadığı (Tablo 1.), ancak kas hücrelerinin çap farkının iki grup arasında ($P < 0.01$) önemli olduğu tespit edildi (Tablo 2.).

Birim alana düşen kas hücrelerinin sayısı, çaptaki artışa bağlı olarak düşmekle beraber IGF'I uygulanan grupta daha büyük çapa sahip fakat daha az sayıda hücre sayılırken kontrol grubunda daha küçük çapa sahip ama daha çok sayıda hücre sayıldı. Her iki grup arasındaki kas hücresi sayı farkının tüm alanda ($P < 0.001$) önemli olduğu belirlendi (Tablo 3.). Ayrıca glikojenin her iki grupta da 13. güne göre biraz daha arttığı gözlemlendi.

İnkübasyonun 15. günü; Enine kesitlerde demet yapılarının belirgin olduğu ve demetler arasında yaygın olarak kas mekiklerinin, kan damarlarının bulunduğu, ayrıca kırmızı-beyaz kas teli ayırımının daha bariz yapılabildiği belirlendi (Şekil-12).

Kontrol grubu embriyoların birim alandaki kas hücre sayılarının ortalama 48 adet, tüm alanda ortalama 1241.90 adet olduğu ve kas hücresi çaplarının da ortalama 11.99 μ olduğu saptandı. Aynı gündeki IGF-I uygulanan grupta, kas hücre sayısının birim alanda 44.70 adet, tüm alandaki kas hücre sayısının ortalama 1320.50 adet olduğu ve birim alandaki kas hücre çaplarının da ortalama 13.57 μ olduğu tespit edildi.

Kas hücrelerinin çapları bakımından kontrol grubunun kendi içerisinde 12. ile 15. günleri arasında önemli bir fark olmadığı görülmesine rağmen IGF-I uygulanan grubun kendi içerisinde 12. ile 14. günler arası fark olmadığı, ancak 12. ile 15. günde önemli bir fark olduğu tespit edildi (Tablo 1.). Kontrol grubu ile IGF-I uygulanan gruplar arası kas hücrelerinin çap farkının da ($P < 0.001$) önemli olduğu bulundu (Tablo 2.).

Kas hücre sayılarının iki grup arasındaki farkın tüm alanda ($P < 0.001$) önemli olduğu belirlendi (Tablo 3.). Yine glikojen miktarının önceki günlere göre azaldığı ve IGF-I uygulanan grupta kontrol grubuna göre daha az olduğu görüldü.

İnkübasyonun 16. günü; Enine kesitlerde kas dokunun tam teşekkül ettiği (Şekil-13), miyofibril ayrımının tam olarak yapılabildiği, boyuna kesitlerde de çizgilenmenin tam olarak meydana geldiği izlendi (Şekil-14).

Kas hücresi sayısı kontrol grubunda birim alanda ortalama 48 adet, tüm alanda 1262.70 adet iken birim alanda kas çapı ortalama 14.32 μ olarak ölçüldü. IGF-I uygulanan grupta ise birim alanda ortalama hücre sayısı 44.2 adet, tüm alanda 1403.7 adet sayılırken birim alanda kas teli çapının 15.63 μ olduğu görüldü. Glikojenin her iki grupta da ortadan kalktığı gözlemlendi.

Gelişimin devam etmesine paralel olarak hem kontrol grubunun hem de IGF-I uygulanan grupların kendi içerisindeki gelişiminin çap bakımından 15. güne göre istatistiki açıdan önemli olduğu (Tablo 1.) ve kas hücre çapları açısından da bu gündeki kontrol ile IGF-I uygulanan grup arasındaki farkın ($P < 0.001$) önemli olduğu belirlendi (Tablo 2.). Tüm alandaki kas hücresinin sayısı bakımından da her iki grup arasındaki farkın ($P < 0.001$) önemli olduğu tespit edildi (Tablo 3.).

Araştırılan bütün günlerde *M. Longus colli dorsalis*, *pars thoracica* (*M. Spinalis thoracis*) kasında, kas teli yoğunluğu kasın ventral kısmında dorsal kısımdan daha yoğun olarak gözlemlendi.

Araştırmanın başlangıç günü olan 7. günden itibaren yumurtadan çıkış gününe kadar *M. Longus colli dorsalis*, *pars thoracica* (*M. Spinalis thoracis*) kasının gelişiminin, yaştaki gelişmeye paralel olarak hem kas hücresi sayısının hem de bu hücrelerin çapının artmaya devam ettiği gözlemlendi. Kas teli çapının, gelişime paralel olarak artması sonucunda, birim alana düşen kas hücresi sayısının gelişimle ters orantılı olarak azaldığı belirlendi. IGF-I uygulanan gruptaki embriyolarda bu gelişimin kontrol grubundan daha hızlı olduğu saptandı.

Ölçümler ve sayımlardan elde edilen tüm sonuçlar, ilgili tablo ve grafiklerde gösterilmiştir.



Tablo 1. IGF-I uygulanan ve kontrol gruplarının, 7. günden 16. güne kadar olan süre içerisindeki çizgili kas hücre çaplarının (μ), kendi grupları içinde istatistiksel açıdan değerlendirilmesi.

GÜN	n	IGF-I uygulanan Grup $\bar{X} \pm S\bar{X}$	Kontrol Grubu $\bar{X} \pm S\bar{X}$
7	40	5.01 \pm 0.15 ^g	3.72 \pm 0.12 ^f
8	40	6.23 \pm 0.14 ^{fg}	5.01 \pm 0.18 ^e
9	40	6.95 \pm 0.18 ^{ef}	6.33 \pm 0.14 ^d
10	40	8.16 \pm 0.23 ^e	7.39 \pm 0.17 ^d
11	40	10.03 \pm 0.20 ^d	8.63 \pm 0.20 ^c
12	40	11.16 \pm 0.22 ^{cd}	10.36 \pm 0.20 ^b
13	40	11.81 \pm 0.25 ^c	11.03 \pm 0.21 ^b
14	40	11.89 \pm 0.28 ^c	11.37 \pm 0.22 ^b
15	40	13.57 \pm 0.46 ^b	11.99 \pm 0.23 ^b
16	40	15.63 \pm 0.62 ^a	14.32 \pm 0.48 ^a

abcdefg: Aynı grup içinde ortak harf taşımayan ortalamalar arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemlidir.

n: Sayım yapılan birim alan sayısı.

Tablo 2. Günlere göre IGF-I uygulanan ve kontrol grubu çizgili kas hücre çaplarının (μ) gruplar arasında istatistiksel açıdan değerlendirilmesi ve t-değerleri.

GÜN	n	IGF-I uygulanan Grup $\bar{X} \pm S\bar{X}$	Kontrol Grubu $\bar{X} \pm S\bar{X}$	t- değeri
7	40	5.01 \pm 0.15	3.72 \pm 0.12	7.49***
8	40	6.23 \pm 0.14	5.01 \pm 0.18	7.55***
9	40	6.95 \pm 0.18	6.33 \pm 0.14	4.51***
10	40	8.16 \pm 0.23	7.39 \pm 0.17	4.39***
11	40	10.03 \pm 0.20	8.63 \pm 0.20	8.75***
12	40	11.16 \pm 0.22	10.36 \pm 0.20	5.33***
13	40	11.81 \pm 0.25	11.03 \pm 0.21	5.12***
14	40	11.89 \pm 0.28	11.37 \pm 0.22	2.91**
15	40	13.57 \pm 0.46	11.99 \pm 0.23	4.73***
16	40	15.63 \pm 0.62	14.32 \pm 0.48	5.78***

** P < 0.01

*** P < 0.001

n: Ölçüm yapılan birim alan sayısı.

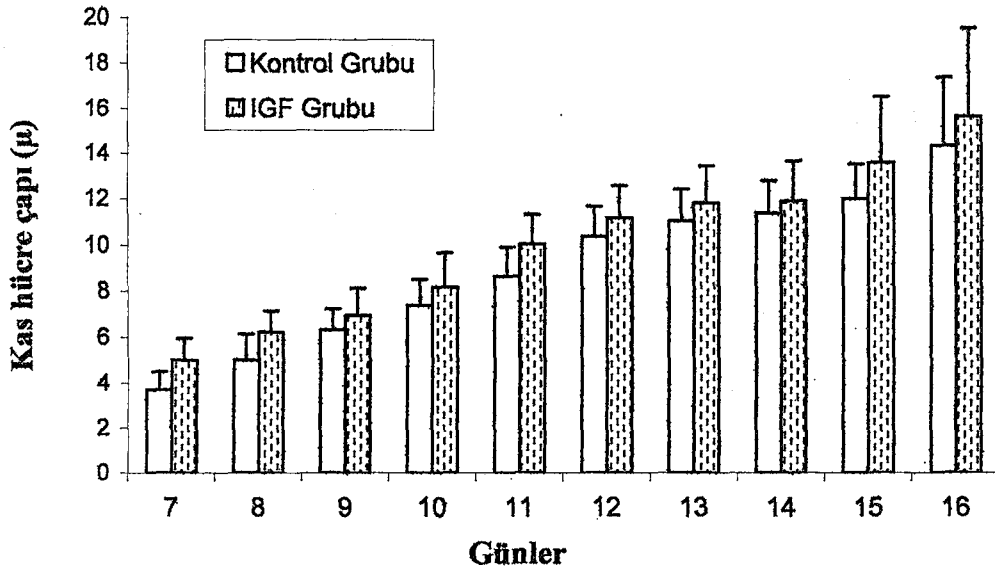
Tablo 3. 7. günden 16.güne kadar gelişim süresinde, IGF-I uygulanan ve kontrol grubu kaslarda toplam kas hücre sayılarının gruplar arasında istatistiksel açıdan değerlendirilmesi ve t-değerleri.

GÜN	n	IGF-I uygulanan Grup $\bar{X} \pm S\bar{X}$	Kontrol Grubu $\bar{X} \pm S\bar{X}$	t- değeri
7	10	548.60 \pm 2.0	430.90 \pm 2.3	38.87***
8	10	586.20 \pm 1.5	480.30 \pm 1.8	44.94***
9	10	626.40 \pm 2.1	533.80 \pm 1.9	33.16***
10	10	657.30 \pm 2.0	595.80 \pm 1.8	22.78***
11	10	743.60 \pm 1.6	696.80 \pm 1.3	22.14***
12	10	871.00 \pm 1.8	782.10 \pm 1.3	40.44***
13	10	1049.80 \pm 1.7	967.80 \pm 2.1	30.39***
14	10	1116.20 \pm 1.7	1081.80 \pm 1.4	15.61***
15	10	1320.50 \pm 0.8	1241.90 \pm 1.1	73.18***
16	10	1403.70 \pm 1.2	1262.70 \pm 1.7	68.78***

*** P < 0.001

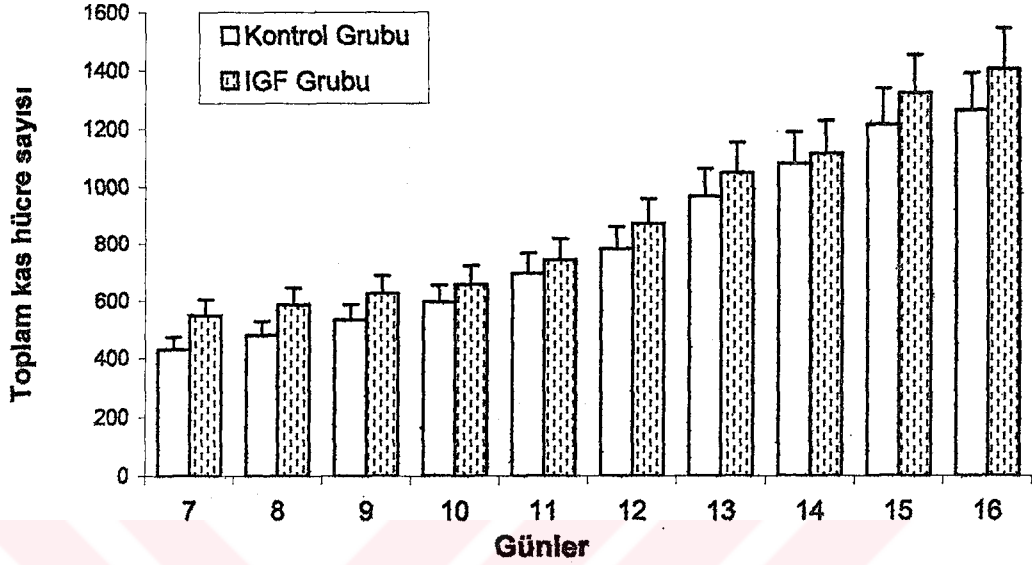
n: Sayım yapılan tüm alan sayısı.

Grafik 1. IGF-I uygulanan ve kontrol grubu embriyolarda M. Longus colli dorsalis, pars thoracica (M. Spinalis thoracis) kasında kas teli çaplarının yaşa bağlı değişimi.



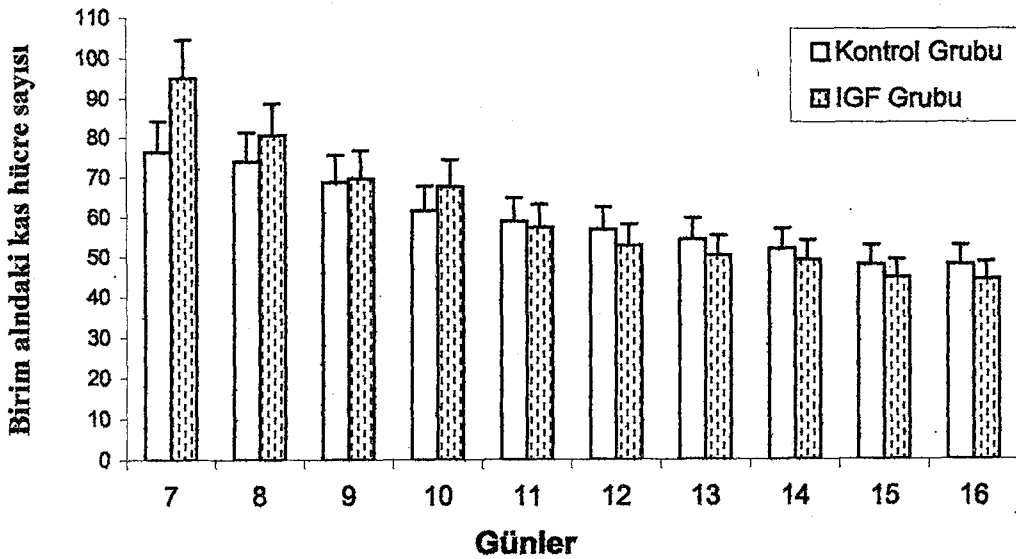
Her gün için IGF-I uygulanan grupla kontrol grubu P<0.001 düzeyinde farklıdır.

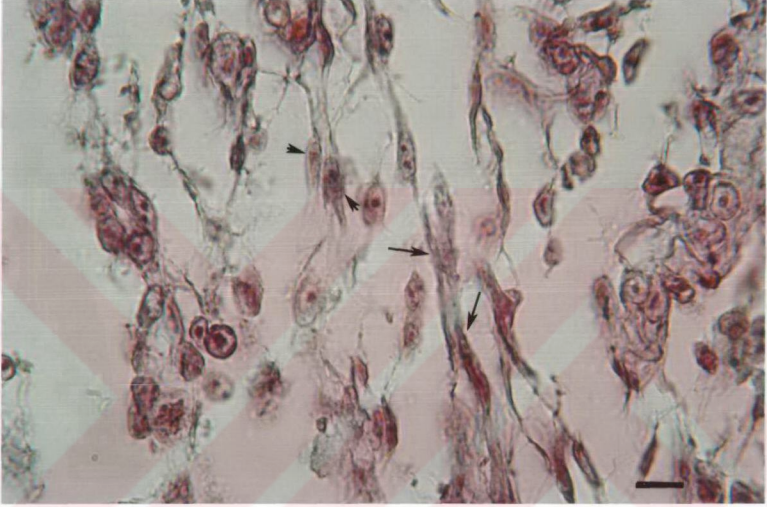
Grafik 2. IGF-I uygulanan ve kontrol grubu embriyoların *M. Longus colli dorsalis*, *pars thoracica* (*M. Spinalis thoracis*) kasındaki toplam kas teli sayısının yaşa bağlı değişimi.



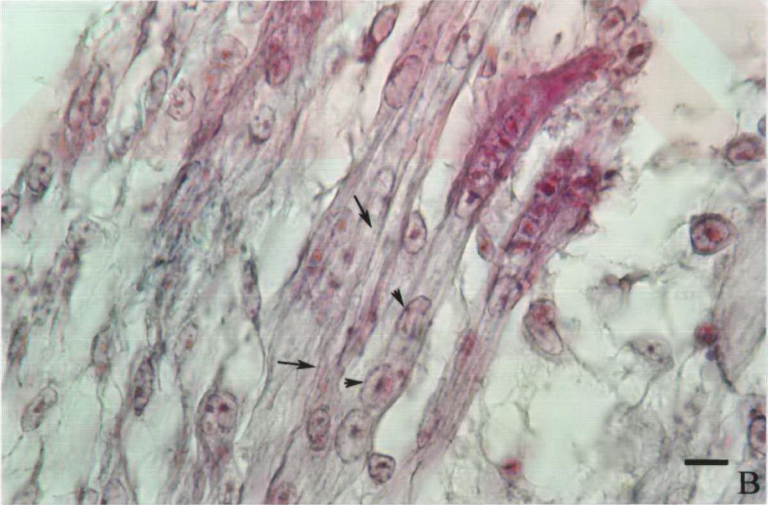
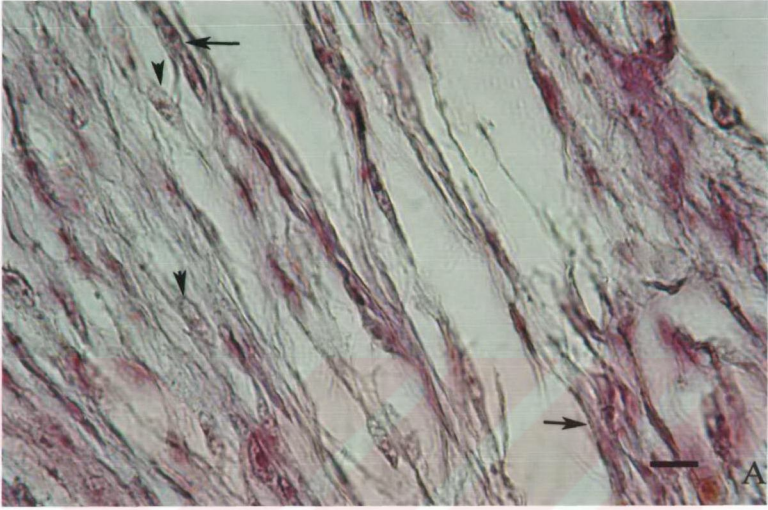
Her gün için IGF-I uygulanan grupla kontrol grubu $P < 0.001$ düzeyinde farklıdır.

Grafik 3. IGF-I uygulanan ve kontrol grubu embriyoların *M. Longus colli dorsalis*, *pars thoracica* (*M. Spinalis thoracis*) kasında birim alandaki kas teli sayısının yaşa bağlı değişimi.

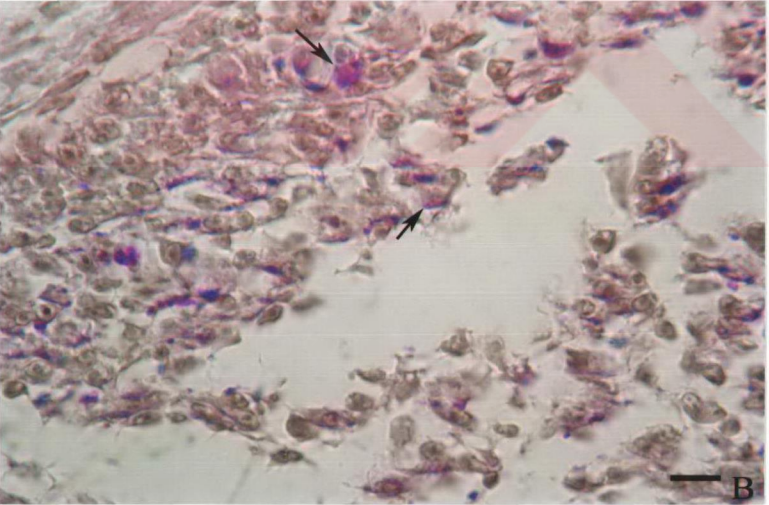
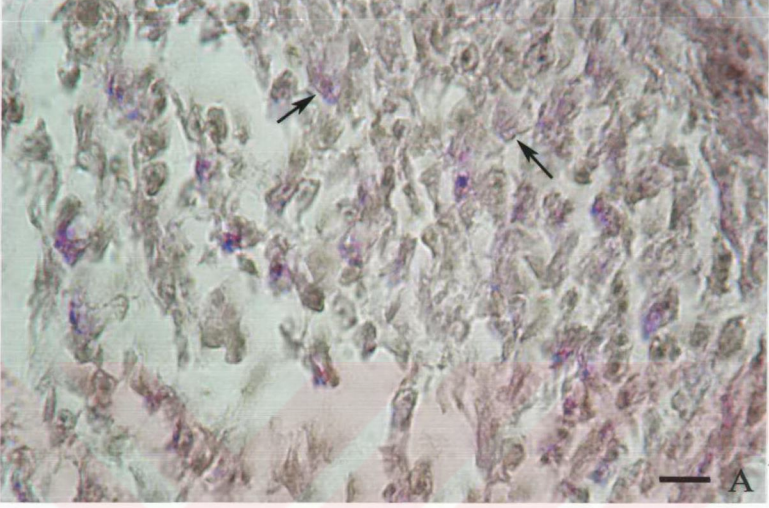




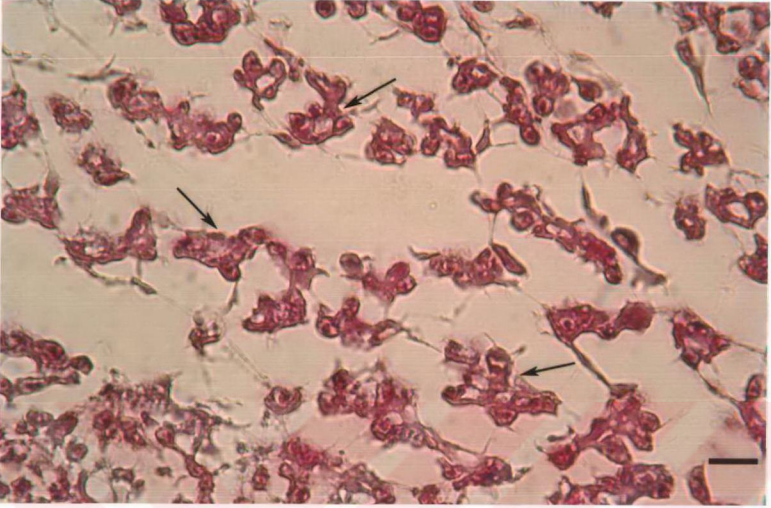
Şekil 3. İnkübasyonun 7. gününde miyotüp oluşumu. Oklar: Miyotüp oluşumu.
Ok başı: Çekirdek. Üçlü boyama. Bar: 20 μ m.



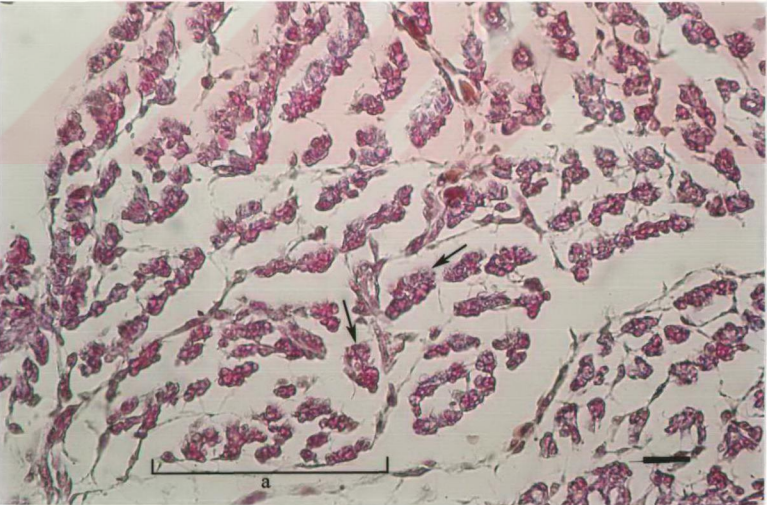
Şekil 4. İnkübasyonun 7. gününde çizgili kas tellerinde enine bantlaşma.
 A: Kontrol grubu. B: IGF-I uygulanan grup. Oklar: Enine bantlaşma.
 Ok başı: Çekirdek. Üçlü boyama. Bar: 20 μ m.



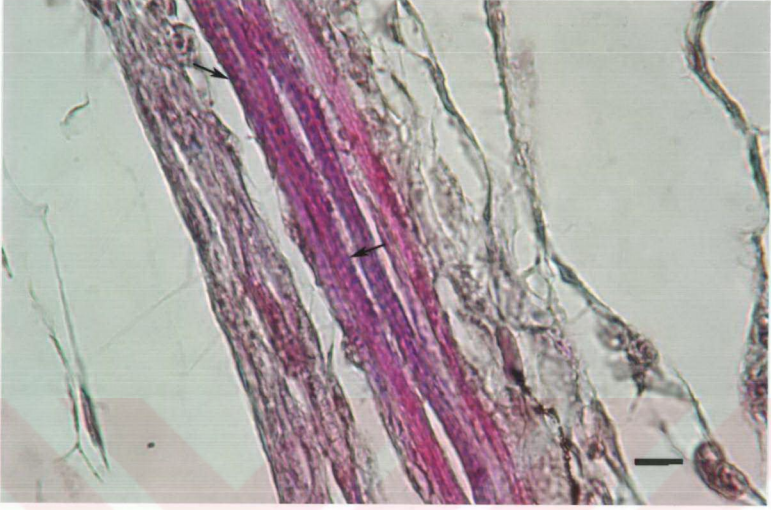
Şekil 5. İnkübasyonun 7. gününde kas hücrelerinde glikojen yoğunluğu. Oklar: Glikojen
A: Kontrol grubu. B: IGF-I uygulanan grup. PAS boyama. Bar: 20 μ m.



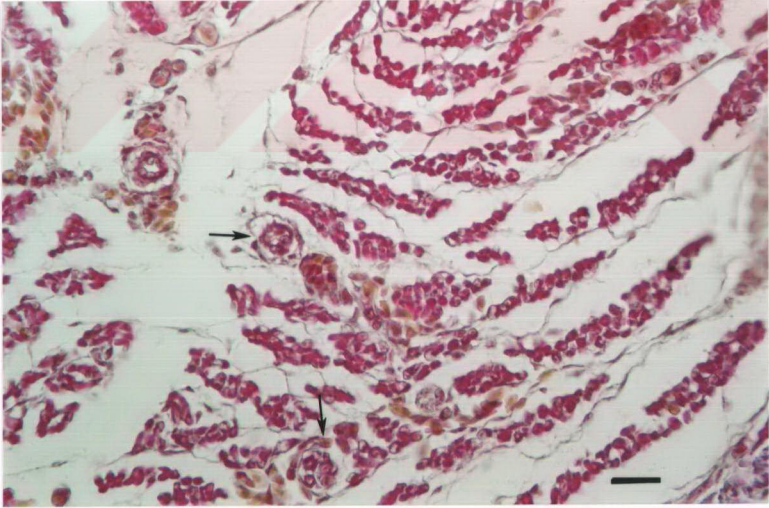
Şekil 6. İnkübasyonun 9. gününde primer demetler. Oklar: Primer demetler.
Üçlü boyama. Bar: 20 μm .



Şekil 7. İnkübasyonun 10. gününde primer (oklar) ve sekonder (a) demetler.
Üçlü boyama. Bar: 50 μm .



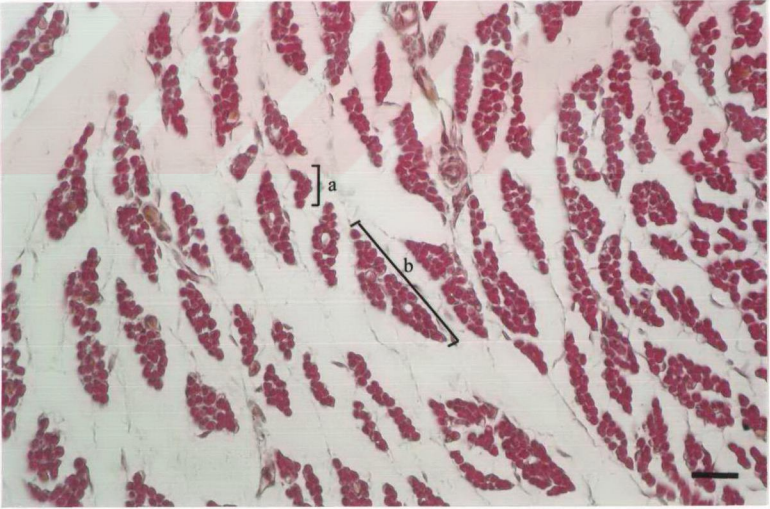
Şekil 8. İnkübasyonun 12. gününde çizgili kas tellerinde enine bantlaşma.
Oklar: Enine bantlar. Üçlü boyama. Bar: 20 µm.



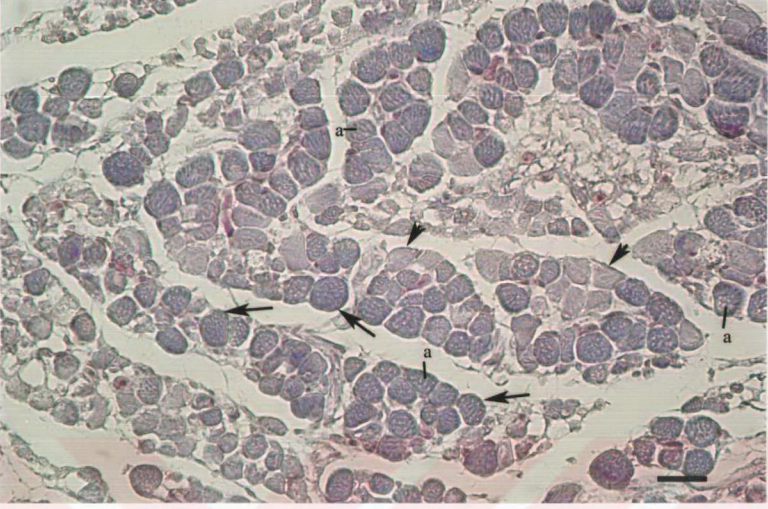
Şekil 9. İnkübasyonun 12. gününde görülen kas mekikleri.
Oklar: Kas mekikleri. Üçlü boyama. Bar: 50 µm.



Şekil 10. İnkübasyonun 13. gününde çizgili kas tellerinde enine bantlaşma.
Oklar: Enine bantlaşma. Ok başı: Çekirdek. Üçlü boyama. Bar: 20 µm.



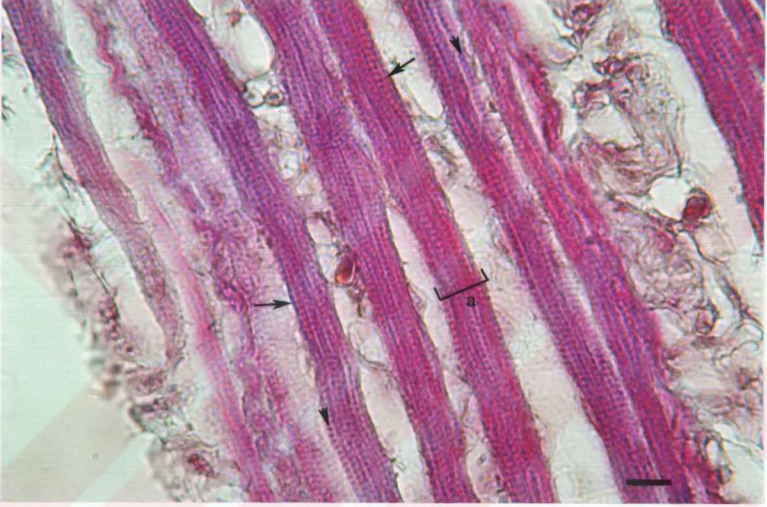
Şekil 11. İnkübasyonun 14. gününde M. Longus colli dorsalis, pars thoracica
(M. Spinalis thoracis) kasının genel görünümü.
a: Primer demet. b: Sekunder demet. Üçlü boyama. Bar: 50 µm.



Şekil 12. İnkübasyonun 15. gününde M. Longus colli dorsalis, pars thoracica (M. Spinalis thoracis) kas tellerinin genel görünümü. a: Miyofibril. Oklar: Beyaz kas teli. Ok başı: Kırmızı kas teli. Üçlü boyama. Bar: 50 μ m.



Şekil 13. İnkübasyonun 16. gününde M. Longus colli dorsalis, pars thoracica (M. Spinalis thoracis) kasının genel görünümü. a: Primer demet. b: Sekunder demet. Üçlü boyama. Bar: 200 μ m.



Şekil 14. İnkübasyonun 16. gününde *M. Longus colli dorsalis*, pars thoracica (*M. Spinalis thoracis*) kas tellerinde enine bantlaşma yapısı.
Oklar: Enine bantlaşma. Ok başı: Miyofibril. a: Kas teli.
Üçlü boyama. Bar: 20 μm .

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çok yönlü bir süreç olan embriyonik ve fetal büyüme, seçilmiş hücrelerin proliferasyonu, uyarılması, göçü, diferensiyasyonu ve programlı hücre ölümünden oluşur (33).

Embriyoda iskelet kası, kökenini somitin dorso-lateral (Dermomiyotom) bölümünden alır (28,31,43). Bazı kaynaklarda (58), sırt kaslarını oluşturacak olan miyoblastların, miyotomlarda segmental düzlem hizasında kas lifleri şeklinde birleştiği ve bu liflerin inerve olduktan sonra sırt kasları haline geldiği bildirilmiştir. Chevallier (10), kanat ve scapula kas dokusu hücrelerinin 12-20. somitlerden, pelvis ve bacak kaslarının da 26-32. somitlerden orijin aldığını belirtmiştir. Somitlerden miyojenik hücrelerin migrasyon zamanı açık bir şekilde tespit edilememesine rağmen Hamburger ve arkadaşları (30), miyojenik hücrelerin ilk defa 15. somitten ayrıldığını (20-22 somite sahip embriyolarda) ileri sürmüş olup, bunun 14. safhaya (inkübasyonun 2.5. günü) denk geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca Grim (29), bu prosesin 36. somit safhasına kadar devam ettiğini, Sweeney ve arkadaşları (72) farklılaşmanın 25. safhaya (inkübasyonun 6. günü) kadar başlamadığını, Michael ve arkadaşları (50) myogenezisin, tavuklarda 26. safhada, bıldırcınlarda ise 6. günde başladığını bildirmişlerdir. Yapılan başka bir araştırmada (55) ise, civciv embriyonik göğüs ve bacak kaslarında asıl miyojenik periyodun, yaklaşık olarak inkübasyonun 7-17. günleri arasında olduğunu, bu periyot esnasında hem göğüs hem de bacadaki tamamen farklılaşmış hücrelerin oranının, inkübasyonun 7. gününden 18. gününe kadar % 80 oranında arttığı bildirilmiştir. Bizde bu araştırmaların ışığı altında inkübasyonun 7. gününde aldığımız *M. Longus colli dorsalis*, *pars thoracica* (*M. Spinalis thoracis*) kasının bu günde, kas hücrelerinin çok küçük olduğunu ve çekirdeklerin çoğunlukla ortada ve yuvarlağa yakın şekilli olduğunu, miyoblastların füzyon yaparak miyotüp oluşturduklarını ve miyotüpü oluşturan hücrelerin çekirdeklerinin oval şekilli olup miyotüpün merkezinde sıralandığını ve miyogenezisin 16. güne kadar devam ettiğini gözlemledik. Bu bulgularımız Sweeney ve arkadaşları (72), Michael ve arkadaşları (50) ile O'Neill'in (55) bulgularını desteklemektedir.

Kas dokusunun prenatal olarak miktarı, embriyonun mezoderm tabakasındaki miyoblast hücre artışıdır (56,60). Normal gelişimde çizgili kaslar miyoblastlardan gelişir (43,71,80). Miyogenezis olgusunun, miyoblastların mitoz bölünme yoluyla yeterli sayıya ulaştıktan sonra, birbirleriyle füzyon yaparak miyotüpleri şekillendirmesi ve daha sonra da bu miyotüplerde aktin-miyozin filamanlarının sentezlenmesiyle bunların fibra muskularislere dönüştüğü bildirilmiştir (1,71). Erken safhalarda da bulunan çizgilenme yapısının, yapılan bir

çalışma da (46) yaklaşık iki haftalık süre içerisinde daha iyi gözleendiği belirtilmiş olup, bizim incelememizde de 7. günde yeni belirmeye başlayan bantlaşma yapısının özellikle inkübasyonun 12. ve 13. günündeki embriyolarda daha iyi gözlenmesi ile araştırmacıların (46) bulguları ile uyumlu bulunmuştur.

Genel olarak araştırmacılar (25,34,61) ergin hayvanların iskelet kasında, kas tellerinin birden fazla sayıda ve periferik yerleşimli, yassı nükleuslar taşıdığını bildirmektedir. Bazı kaynaklarda (61) kanatlıların bazılarında nükleusların, kas tellerinin merkezinde yerleştiği bildirilmiştir. Bıldırcınların, *M. Longus colli dorsalis*, *pars thoracica* (*M. Spinalis thoracis*) kas grubunda nükleuslar yassı-oval ve sarkolemmanın altında yerleşimleri ile genel bilgilere (25,34,61) uygun bulunmuştur. İncelediğimiz kas tellerinin bazılarında nükleuslar kas tellerinin merkezinde gözlenmekle beraber miyogenezisin başlangıcında gözlenen bu durumun gelişime paralel olarak değiştiği ve çekirdeklerin yassılaşılarak periferik yerleştiği sonucuna varılmıştır.

Morfolojik özellikleri açısından kanatlılardaki iskelet kaslarının yapısı memeli hayvanlardakine benzer yapıda olup; beyaz, intermedier ve kırmızı kas tellerini içerdiği bildirilmektedir (25,34,61,70). Sadece beyaz veya sadece kırmızı kas telleri içeren kaslar varsa da kasların çoğunluğunun her üç kas telini de birlikte içerdiği bildirilmiştir (34,61). Ayrıca *in vitro* bir çalışmada (51), 3-6 günlük embriyolarda, bıldırcında arka bacak, tavuktan ise birçok bölgeden alınan kaslarda miyoblastların, % 60-90 hızlı, %10-40 mix (hızlı/yavaş) ve % 0-3 de yavaş kas olmak üzere üç farklı yapıya ayrıldıkları ve 9-12. günde embriyolarda hızlı kasın % 99-100 oranında tamamlandığı ifade edilmiştir. Bizim örneklerimizde de inkübasyonun 7.gününden 13. gününe kadar olan süre içerisinde kas tellerinde morfolojik ayırım yapılamamasına rağmen, inkübasyonun sonraki günlerinde özellikle kırmızı ve beyaz kas teli ayırımı yapılabilmektedir.

Miyofibrillerin kas tellerinde farklı dağılım gösterdikleri, beyaz ve intermedier kas tellerinde eşit aralıklarda yerleştiği, kırmızı kas tellerinde ise gruplar oluşturduğu (Conheim alanları) bildirilmiştir (25,61). *M. Longus colli dorsalis*, *pars thoracica* (*M. Spinalis thoracis*) kası örneklerinin enine kesitlerinde literatür bildirimlerine uygun olarak beyaz kas tellerinde özellikle inkübasyonun 15. ile 16. günlerinde, miyofibrillerin homojen bir dağılım gösterdikleri, kırmızı kas tellerinde ise birbiriyle anastomozlaşmış Conheim alanları oluşturdukları görüldü.

İskelet kaslarının organizasyonunda, kas tellerinin bağ dokusu ile sarılarak gruplar oluşturdukları bilinmektedir (25,34,64). Bu bağ dokusu bölmelerinin kanatlı hayvanlarda daha ince yapıya sahip olduğu bildirilmiştir (34). Kas tellerini saran endomizyumun çok ince

retikulum ipliklerinden oluştuğu, primer demetleri saran perimizyumun kollagen ipliklerden biraz daha zengin olduğu, epimizyumun ise daha kalın kas demetlerini sardığı bildirilmektedir (25,34,61). İncelediğimiz *M. Longus colli dorsalis*, *pars thoracica* (*M. Spinalis thoracis*) kası örneklerinde de kas tellerinin etrafını endomizyumun sardığını ve kas hücreleri arasında sıkı bir paketlenmenin olduğunu, bunu da endomizyumdan daha kalın olan perimizyumun sararak primer demetleri oluşturduğu gözlemlendi. Bir kastaki primer demetlerin bir araya toplanarak sekonder demetleri oluşturduğu ve bunun da gittikçe kalınlaşan perimizyumla, kasta bulunan bütün demetlerin ise epimizyum tarafından çevrildiği belirlendi.

Kanatlı hayvanlarda (25,34,61) kas tellerinin çaplarının, memeli hayvanlarda (4,61) olduğu gibi 10-120 μ arasında değiştiği bildirilmektedir. Yaptığımız çalışmada kas telleri çapları inkübasyonun 7. gününde kontrol grubunda ortalama 3.72 μ , IGF-I uygulanan grupta ise ortalama 5.01 μ ölçüldü. Fakat inkübasyonun son günü olan 16. günde ise, kontrol grubunda ortalama 14.32 μ , IGF-I uygulanan grupta ise ortalama 15.63 μ olarak ölçüldü. Özellikle inkübasyonun son günlerinde ölçülen bu değerlerin literatür bildirimlerine (25,34,61) uygun olduğu belirlendi.

İskelet kasında beyaz kas tellerinin kalın, kırmızı kas tellerinin ise ince çaplı oldukları bildirilmektedir (25,34,61). Bizim incelediğimiz *M. Longus colli dorsalis*, *pars thoracica* (*M. Spinalis thoracis*) kası örneklerinin enine kesitlerinde, özellikle morfolojik ayırım yapılabilen inkübasyonun 14. gününden itibaren beyaz kas tellerinin kırmızı kas tellerine göre daha geniş çaplı oldukları gözlemlendi.

İskelet kaslarının uzama derecesini algılayan, sadece iskelet kaslarında bulunduğu, sensorik sinir tellerinden çok zengin oldukları ve birer kontrol merkezi gibi kasların çalışmalarını koordine ettikleri bildirilen (61) kas mekiklerini, bizde incelediğimiz *M. Longus colli dorsalis*, *pars thoracica* (*M. Spinalis thoracis*) kası örneklerinin enine kesitlerinde özellikle 12. günden itibaren gözlemledik. Kanatlılarda kas mekiklerinin meydana gelişi ile ilgili herhangi bir literatüre rastlanmadı.

Memelilerde olduğu gibi glikozun anaerobik ve aerobik parçalanması erken kanatlı yaşamının büyüme fazları ve morfogenezi için enerji sağlar. Embriyonik yaşamın erken dönemlerinde kanatlı plazmasında 100 mg/dl'den daha az olan glikoz düzeyi yumurtadan çıkış zamanında 150-160 mg/dl'ye yükselir ve yumurtadan çıktıktan sonra plazma glikoz düzeyi birkaç hafta veya birkaç ay artarak 190-220 mg/dl'ye ulaşır. Ayrıca kanatlı embriyolarının pentoz yolu aktivitesi, dokudan dokuya değişmekle beraber özellikle 8 ve 15. günler arasında pik yaptığı bildirilmiştir (70). George ve Berger araştırmalarında (25)

M. Pectoralis superficialis de beyaz kas tellerinin fazla; kırmızı kas tellerinin ise daha az miktarda glikojen içerdiğini bildirmiş olup, kanatlılardaki M.pectoralis ve M. Supracoracoideus dışındaki kaslarda, kırmızı kas tellerinin beyaz kas tellerinden daha fazla glikojen içerdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacılar kuluçka döneminde tavuk embriolarının kaslarındaki glikojen oranının kuluçka sonuna doğru 15. güne dek azaldığını, daha sonra ise tekrar arttığını tespit etmişlerdir. PAS ile boyanan M. Longus colli dorsalis, pars thoracica (M. Spinalis thoracis) kası örneklerinde, inkübasyonun 7. gününde yoğun olarak gözlenen glikojen miktarının her iki grupta da inkübasyonun 10. gününde azaldığı, 11. gününde ise gözlenememesine rağmen 13. günde artmaya başladığı ve inkübasyonun 16. gününde ortadan kalktığı gözlemlendi. Glikojen yoğunluğundaki bu değişimlerin, araştırılan kasın inkübasyonun çeşitli günlerindeki farklı gelişim aktivitesiyle ilgili olduğu düşünüldü.

IGF ailesi peptidlerinin, embriyonik ve fetal büyüme ile gelişmede önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir (47,75). Murray ve arkadaşları (54) insülinin en güçlü metabolik hormon olduğunu ancak IGF'lerin büyümeyi uyarmada daha güçlü olduklarını bildirmişlerdir. IGF'lerin kas büyümesi ve gelişmesi üzerine çok önemli etkilerinin olduğu bildirilmiştir (20,75) olup, bu etkilerin çoğunun IGF-I reseptörleri aracılığı ile olduğu gösterilmiştir (75). Miyoblast kültürlerinde IGF'lerin miyoblastları uyardığı bildirilmiştir (20). IGF-I ve IGF-II'nin miyoblastlarda proliferasyon ve diferensiasyonu uyardığı, besin alınımını artırdığı ve protein yıkımına engel olduğu belirtilmiştir (75). Van Wyk'e (77) göre IGF-I, endoderm, ektoderm ve mezodermden kaynaklanan 20 değişik hücrede DNA sentezini stimüle eder ve IGF-I'in erken ekspresyonu, bu peptidin tavuk embriyo gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Vasilatos ve arkadaşları (79) IGF-I'in yumurtadan çıkmış tavuk hücrelerinin metabolizmasını, farklılaşmasını ve proliferasyonunu etkilediğini bildirmişlerdir. Bazı araştırmacılar (20,21,63) IGF-I'in çizgili kas üzerine etkisini, IGF-I' in myogenin genini stimüle ederek miyoblast diferensiasyonunu hızlandırdığını, Ewton ve arkadaşları da (18) IGF-I'in protein yıkımını azaltıp besin alınımını artırarak miyoblastlarda proliferasyonu hızlandırdığı şeklinde bildirmişlerdir. Girbau ve arkadaşları (25) tarafından 2 günlük tavuk embriolarına IGF-I enjeksiyonunun genel gelişim ve büyümeyi (vücut ağırlığı, total protein, DNA, RNA), 4 günlük tavuk embriolarında biyokimyasal farklılaşmayı (total kreatin kinaz) ve metabolik parametreleri (trigliseridler, kolesterol ve fosfolipidleri) artırdığı gözlenmiştir.

Ayrıca Kocamış ve arkadaşları (42) tarafından, 3 günlük tavuk embriolarına in ovo recombinant human IGF-I enjeksiyonunun embriyo aşamasında ve takiben yumurtadan çıktıktan sonra çizgili kas gelişimini artırdığı bildirilmiştir. Bununla beraber insan IGF-I'nin tavuk embrioları içerisine iki enjeksiyon olarak uygulanmasının yumurtadan çıkmış

tavukların ne vücut ağırlıklarını nede diğer metabolik parametrelerini artırdığı bildirilmiştir (69).

Tavuklarda, insan IGF-I'inin biyolojik aktivitesi üzerine bir çok kanıt bulunmaktadır. Human IGF-I, tavuk embriyo kondrositlerinde RNA, protein, proteoglikan ve DNA sentezini uyarır (23). Ayrıca rh IGF-I'in (recombinant human IGF-I) yüksek titrede tip1 IGF reseptörüne bağlanarak, yumurtadan çıkmış tavuklardan izole edilmiş kas hücrelerinde proliferasyonu, diferensiyasyonu ve protein gelişimini uyardığı gösterilmiştir (14,63).

Ayrıca hipofizektomi yapılmış ratlara (65), IGF olaylarının tersine çevrildiği cüce farelere (78) ve büyüme hormonu yetersiz mutant ratlara (67) insan IGF-I'in verilmesinin vücut ağırlığını ve diğer birkaç büyüme parametresini artırdığı bildirilmiştir.

IGF-I, tavukların embriyonik gelişimi esnasında önemli bir rol oynar (41). Hindi ve tavuk embriyolarında IGF-I plazma seviyesinin midembriyogenezis periyodunda pik yaptığı bildirilmiştir (20,41,47). IGF-I değerlerinin 10. günde yaklaşık olarak 3ng/ ml olduğu ve 15-17. günlerde 10 kat artarak 30-35 ng/ml ye çıktığı, yumurtadan çıktıktan sonra 10 ng/ml'ye düştüğü bildirilmiştir (41). IGF'lerin kas hücreleri üzerine etkileri daha çok dolaşımdaki normal yada normale yakın konsantrasyonları ile olur (19,49).

IGF-I'in fizyolojik konsantrasyonları, rat L6 miyoblastları (18), primer tavuk embriyo miyoblastları (63) ve rat satellit hücreleri (13) gibi kas hücre tiplerinin bir çok çeşitinde differensiyasyonu uyarır. IGF'in dolaşımdaki düzeyinin normal değerlerinin % 50 üzerinde olduğu zaman kemik ve kas büyümesini yaklaşık olarak % 30 artırdığı bildirilmiştir (20). Bütün bunlara ilaveten IGF-I; tavuk embriyo kondrositlerinde RNA, protein, proteoglikan ve DNA (23,39), embriyonik tavuk kıkırdakları ile prolinin birleşimini ve kıkırdak ağırlığında artışı (8) uyarır. IGF-I'in fibroblast proliferasyonunu (32) ve tavuk hepatositlerinde hepatik glikojen, RNA ve protein sentezini uyardığı (81), ayrıca embriyonik fibroblastlar ile glukoz ve amino asit yükselmesini artırdığı bildirilmiştir (9). Tip-1 reseptörünün yüksek affinite de IGF-I'e bağlanması yumurtadan çıkmış tavuk kas hücrelerinde proliferasyonu, differensiyasyonu ve protein gelişimini uyardığı (14,63) ve kalp mezenseşimal hücrelerinde proliferasyonu artırdığıda bildirilmiştir (3). IGF'lerin bu özelliklerinden dolayı, gelecekteki çalışmalarda bıldırcınlardaki kemik doku üzerine IGF'lerin etkiside detaylı olarak araştırılmalıdır.

Araştırmamızda IGF-I uygulanan gruptaki embriyoların *M. Longus colli dorsalis*, *pars thoracica* (*M. Spinalis thoracis*) kasının gelişiminde hem hücre çaplarının hem de hücre sayılarının, kontrol grubuna göre daha hızlı artış göstermesi bu araştırmacıların bulgularını desteklemektedir.

Sonuç olarak; Bildircinlerin *M. Longus colli dorsalis, pars thoracica (M. Spinalis thoracis)* kasının, araştırmaya başladığımız 7. günde yeni yeni şekillenmeye başladığı ve gelişmeye paralel olarak kas hücresinin sayıca artmasıyla beraber çaplarında da artış olduğu saptandı. Kas hücresinin çaplarının günlük artmasının yanı sıra IGF-I uygulanan gruptaki embriyolarda 7. ile 9., 10. ile 11. ve 11. ile 13. günler arasında farkın önemli olduğu ve özellikle 14. 15. ve 16. günler arasındaki farkın istatistiki açıdan önemli olduğu belirlendi. Kontrol grubunda ise hem 7. 8. ve 9. günler arasında hem de 10. 11. ve 12. günler arasında farkın önemli olduğu, 12. ile 15. günler arasında önemli bir fark olmadığı ancak 15. ile 16. günler arasındaki farkın istatistiki açıdan önemli olduğu belirlendi. Ayrıca kontrol grubu ile IGF-I uygulanan gruplar hem kas hücresi çapı hem de kas hücresinin sayısı bakımından günlük olarak kıyaslandığında farkın istatistiki açıdan $P < 0.001$ düzeyinde önemli olduğu tespit edildi.

Araştırmamızın amacı olan IGF-I uygulamasının kasın gelişimi üzerindeki etkilerinin olumlu olduğu ve gelişimi hızlandırdığı sonucuna varıldı.

5. ÖZET

Bu araştırma, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I'in Japon bildiricini embriyolarının *M. Longus colli dorsalis, pars thoracica (M. Spinalis thoracis)* kasının gelişimi üzerine etkisini histolojik olarak incelemek amacıyla yapıldı. Bu çalışmada, materyal olarak 40 adet döllü Japon bildiricini yumurtası kullanıldı.

İnkübasyonun 3. günündeki yumurtaların küt uçları % 70'lik etanol ile dezenfekte edildikten sonra bu küt uçta bir noktadan, chorio-allantoic zara zarar vermeden, her bir yumurtanın albumini içerisine bir kez olmak üzere recombinant human IGF-I (100 ng/embriyo) enjekte edildi. İnkübasyonun 7-16. günlerinde her gün toplanan embriyolardan hazırlanan histolojik preparatlar ışık mikroskopunda incelendi.

Gelişim süreci içerisinde, inkübasyonun 7. gününde yeni belirmeye başlayan bantlaşma yapısı özellikle inkübasyonun 12. ve 13. günündeki embriyolarda daha iyi gözlemlendi. İskelet kası tellerinin birden fazla sayıda ve periferik yerleşimli, yassı nükleuslar taşıdığı gözlemlendi. On üçüncü güne kadar olan süre içerisinde kas tellerinde morfolojik ayırım yapılamamasına rağmen, inkübasyonun sonraki günlerinde özellikle kırmızı ve beyaz kas teli ayırımı yapılabildi. Kas mekikleri ise inkübasyonun 12. gününde gözlemlendi. İnkübasyonun 7. gününde yoğun olarak gözlenen glikojen miktarının her iki grupta da inkübasyonun 10. gününde azaldığı, 11. gününde ise gözlenememesine rağmen 13. günde artmaya başladığı ve inkübasyonun 16. gününde ortadan kalktığı gözlemlendi. Ayrıca miyofibril ayırımının tam olarak yapılabildiği inkübasyonun 16. gününde kas dokunun tam teşekkül ettiği izlendi.

Sonuç olarak; Kas hücre çaplarının günlük artmasının yanı sıra IGF-I uygulanan gruptaki embriyolarda 7. ile 9., 10. ile 11. ve 11. ile 13. günler arasında farkın önemli olduğu ve özellikle 14. 15. ve 16. günler arasındaki farkın istatistiki açıdan önemli olduğu belirlendi. Ayrıca kontrol grubu ile IGF-I uygulanan gruplar hem kas hücresi çapı hem de kas hücre sayısı bakımından günlük olarak kıyaslandığında farkın istatistiki açıdan $P < 0.001$ düzeyinde önemli olduğu tespit edildi.

Araştırmamızın amacı olan IGF-I uygulamasının kasın gelişimi üzerindeki etkilerinin olumlu olduğu ve gelişimi hızlandığı sonucuna varıldı.

6. SUMMARY

The objective of the present study was to evaluate the effects of Insulin-like Growth Factor-I on histological development of m. Longus colli dorsalis, pars thoracica (m. Spinalis thoracis) muscles of Japanese quail embryos. Total of forty fertilized eggs were used.

In ovo administration of rhIGF-I (100ng/per embryo) was performed through the blunt end of the eggs. Before injection, blunt end of the eggs was sterilized with 70 % ethanol. A single hole was created with dental drill bit without penetrating the chorio-allantoic membrane. For histological evaluation, embryos were collected daily on days between 7 and 16 th of embryonic development.

Although banding pattern began to appear on embryonic day 7, it was easily seen on embryonic day 12 and 13. Myofibrils had several oval-shaped nuclei that were peripherally located. We were able to morphologically distinguish muscle fibers from embryonic day 13. Muscle bundles were clearly seen on embryonic day 12. Although the glycogen amount in both groups was decreased at E 10, it was increased at E 13. It appeared that skeletal muscle structure was completed at E 16 on which muscle fibers were clearly countable.

In conclusion, in ovo administration of the rhIGF-I increased the diameter of muscle fibers on E 7, 9, 10, 11 and 13. Additionally, in ovo IGF-I injection significantly increased both the diameter and number of muscle fibers ($P < 0.001$). Therefore, it was concluded that IGF-I accelerated the skeletal muscle development in quail embryos.

7. KAYNAKLAR

1. Altunay, H.: Bildircin (*Coturnix coturnix japonica*) iskelet kasında in vitro miyogenesis. Ankara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. Ankara. (1994).
2. Baker, J., Liu, J., Robertson, E. J., Efstratiadis, A.: Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, Vol, 75: 73-82, 1993.
3. Balk, S.D., Shiu, R. P. C., Lafleur, M. M. and Young, L. L.: Epidermal growth factor and insulin cause normal chicken mesenchymal cells to proliferate like their rous sarcoma virus- infected counterparts. *Proc. Soc. Natl. Acad. Sci.* 79: 1154-1157, 1982.
4. Başaran, A.: Tıbbi Biyoloji. 5. Baskı. Nobel & Güneş Tıp Kitapevi Bursa. 1999.
5. Baumel, J. J.: Handbook Of Avian Anatomy: Nomina Anatomica Avium. Second Edition Cambridge. 1993.
6. Bick, T., Amit, T., Barkey, R. J., Hertz, P., Youdim, M. B. H., and Hochbera, Z.: The interrelationship of growth hormone (GH), liver membrane GH receptor, serum GH-binding protein activity, and IGF-I in the male rat. *Endocrinology* 126: 1914-1920, 1990.
7. Bischoff, R., and Holtzer, H.: Mitosis and processes of differetiation of myogenic cells in vitro. *J. Cell Biol.* 41: 188-200, 1969.
8. Burch, W. M., Weir, S., and Van Wyk, J. J.: Embryonic chick cartilage produces its own somatomedin-like peptide to stimulate cartilage growth in vitro. *Endocrinology* 119: 1370-1376, 1986.
9. Cynober, L., Aussel, C., Chatelain, P., Vaubourdolle, M., Agnerary, J., and Ekindjian, O. G.: IGF-I action on 2-deoxyglucose and amino isobutyrate uptake in chick embryo fibroblasts. *Biochemie.* 67: 1185-1190, 1985.
10. Chevallier, A.: Role of the somitic mesoderm in the development of the thorax in bird embryos. *J. Emb. Exp. Morph.* 49: 73-78, 1979.
11. Czech, M. P.: Signal transmission by the IGFs. *Cell* 59:235-238, 1989.
12. Çörekçi, İ., Dağlıoğlu, S.: Farklı oranlarda ham protein içeren rasyonlarla beslenen broiler civcivlerin ergin döneme kadar M. Pectoralis superficialis ve M.biceps femoris kaslarının gelişiminin histomorfolojik ve histokimyasal yöntemlerle incelenmesi. *İ. Ü. Vet. Fak. Derg.* 22 (1), 157-176, 1996.
13. Dodson, M. V., Allen, R. E., and Hossner, K. L.: Ovine somatomedin, multiplication-stimulating activity, and insulin promote skeletal muscle cell proliferation in vitro. *Endocrinology* 117: 2357-2363, 1985.
14. Duclos, M. J., Wilke, R. S., and Goddard, C.: Stimulation of DNA synthesis in chicken muscle satellite cells by insulin and insulin-like growth factors: Evidence for exclusive mediation by type-1 IGF receptor. *J.Endoc.* 128: 35-42, 1991.
15. Edwall, D., Schalling, M., Jennische, E., and Norsted, G.: Induction of IGF-I messenger ribonucleic acid during regeneration of rat skeletal muscle. *Endocrinology* 124: 820-825, 1989.
16. Engstrom, W., Bell, K. M., and Schofield, P. N.: Expression of the insulin-like growth factor-II gene in the developing chick limb. *Cell. Biol. Int. Rep.* 11: 415-421, 1987.
17. Ewton, D. Z., and Florini, J. R.: Relative effects of the somatomedins, MSA, and growth hormone on myoblasts and myotubes in culture. *Endocrinology* 106: 577-588, 1980.
18. Ewton, D. Z., and Florini, J. R.: Effects of somatomedins and insulin on myoblast differentiation in vitro. *Dev. Biol.* 86: 31-36, 1987.
19. Florini, J. R., Nicholson, M. L., and Dulak, N. C.: Effects of peptide anabolic hormones on growth of myoblasts in culture. *Endocrinology* 101: 32-41, 1977.

20. Florini, J. R., Ewton, D. Z., and Coolican, S. A.: Growth hormon and the insulin-like growth faktor system in myogenesis. *Endocrine Reviews*, Vol 17. No 5, 1996.
21. Florini, J. R., Ewton, D. Z., Falen, S. L., and Van Wyk J. J.: Biphasic concntration dependency of stimulation of myoblast differentiation by somatomedins. *Am. J. Physiol.* 250: 771-778, 1986.
22. Froesch, E. R., Schmid, C., Zangger, T., Schoenle, E., Eigenmann, E., and Zapf, J.: Effects of IGFs on growth and differentiation of muscle and bone. *J. Anim Sci.* 63:57-75, 1986.
23. Froesch, E. R., Zapf, J., Audhya, T. K., Ben Porath, E., Segen, B. J., and Gibson, K. D.: Nonsuppressible insulin-like activity and thyroid hormones: Major pituitary-dependent sulfation factors for chick embryo cartilage. *Prog. Natl. Acad. Sci* 73:2904-2908, 1976.
24. Ganong, W. F.: *Tıbbi Fizyoloji*. Barış Kitapevi. 1999
25. George, J. C. and Berger, A. J.: *Avian Myology*. Academic Pres New York. London. 1966.
26. Girbau, M., Lesniak, M. A., Gomez, J. A., and De Pablo F.: İnsulin and insulin-like growth facrot-1 both stimulate metabolism, growth and differentiation in the post-neurola chick embryo. *Endocrinology* 121:1477-1482, 1987.
27. Guyton, A. C., Hall, J. E.: *Tıbbi Fizyoloji*. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. İstanbul. 1996.
28. Gürsoy, E., Koptagel, E.: *Embriyoloji Atlası*. Esnaf Ofset Matbaacılık. İstanbul. 1997.
29. Grim, M.: Differentiation of myoblasts and relationship between somites and the wing bud of the chick embryo. *Z. Anat. Entwiki-Gesch.* 132: 260-271, 1970.
30. Hamburger, H., and Hamilton, H.L.: A. Series of normal stages in the development of chick embryo. *J. Morp.* 88:49-92, 1951.
31. Hassa, O., Aştı, N. R.: *Embriyoloji*. 3. Baskı. Ankara. 1997.
32. Hasselbacher, G. R., Andres, Y., and Humbel, R. E.: Evidence for the synthesis of a somatomedin similar to IGF-I by chick embryo liver cells. *Eur. J. Biochem.* 111: 245-250, 1980.
33. Hill, D. J.: Relationships of insulin-like growth factors and their binding proteins to embryonic development. *J. Anim. Sci* 74 (Suppl.2):85-93, 1996.
34. Hodges, R. D.: *The Histology Of The Fowl*. Academic Pres. London. 1974.
35. Humbel, R. E.: İnsulin-like growth factors-I and -II. *Eur. J. Biochem.* 190: 445-462. 1990.
36. Kabukçu, M. A.: *Sağlık Sosyal ve Fen Bilimlerinde Uygulamalı İstatistik*. Selçuk Üniv. Ziraat Fak. Tarım Ekonomi Bölümü. Konya. 1994.
37. Kasuga, M., Karlsson, F. A., Kahn, C. R.: Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science* 215:185-187, 1982.
38. Kasuga, M., Van Obberghen, M., Nissley, S. P. and Rechler, M. M.: Demonstration of two subtypes of insulin-like growth factor receptors by affinity cross-linking. *J. Biol Chem.* 256:5305-5310, 1981.
39. Kemp, S. F., Kearns, G. L. Smith, W. G., and Elders M. J.: Effects of IGF-I on the synthesis and processing of glycosaminoglycan in cultured chick chondrocytes. *Acta. Endoc.* 119:245-250, 1989.
40. Kierszenbaum, A. L.: *Histology and Cell Biology* New York Mobsy. 2002.
41. Kikuchi, K., Buonomo, F. C., Kajimoto, Y., Rotwein, P.: Expression of insulin-like growth factor-I during chicken development. *Endocrinology*. Vol.128, No:3 USA. 1991.

42. Kocamış, H., Kirkpatrick-Keller, D. C., Klandorf, H., and Killefer, J.: In ovo administration of recombinant human insulin-like growth factor-I (rh IGF-I) alters postnatal growth and development of the broiler chicken. *Poultry Science*. 77: 1913-1919, 1998.
43. Latshaw, W.: *Veterinary Developmental Anatomy*. Toronto Philadelphia. 1987.
44. Luna, L. G.: *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. Third Ed. Mc Graw-Hill Book Comp. 1968.
45. Massague, J., and Czech, M. P. The subunit structure of two distinct receptors for insulin-like growth factors-I and II and their relationship to the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 257: 5038-5046, 1982.
46. Mc Donald, K. A., Lakonishok, M., and Hortwiz, A. F.: αv and $\alpha 3$ integrin subunits are associated with myofibrils during myofibrillogenesis. *J. Cell Science*. 108: 2573-2581, 1995.
47. McMurtry, J. P., Francis, G. L., Upton, Z.: Insulin-like growth factors in poultry. *Domestic Animal Endocrinology* Vol. 14(4): 199-229. New York. 1997.
48. McMurtry, J. P., Francis, G. L., Upton, F. Z., Rosselot, G., and Broth, D. M. Developmental changes in chicken and turkey IGF-I studied with homologous radioimmunoassay for chicken IGF-I. *J. Endoc.* 142: 225-234. 1994.
49. Merrill, G. F., Florini, J. R., and Dulak, N. C.. Effects of multiplication stimulating activity on AIB transport into myoblast and myotube cultures. *J. Cell. Physiol.* 93: 173-182, 1977.
50. Michael, M. I., El-Mekkawy, D. A., Ibrahim, L. L., El-Zayat, M. A., El-Wakil, A. A.: Development of the wing in embryonic stages of the chick and quail 11-histological studies. *J. Egypt. Ger. Soc. Zool.*, Vol. 25 (B), 83-111, 1998.
51. Miller, J. B., Stockdale, F. E.: Developmental regulation of the multiple myogenic cell lineages of the avian embryo. *J. Cell Biol.* 103: 2197-2208, 1986.
52. Minitab for Windows, Release 10. Minitab Inc. USA. 1994.
53. Moxham, C. P., Duronino, V., and Jacobs, S.: IGF-I receptor B-subunit heterogeneity: Evidence for hybrid tetramers composed of IGF-I and insulin receptor heterodimers. *J. Biol. Chem.* 264: 13238-13244, 1989.
54. Murray, Robert K., Mayes, Peter A., Granner, Darly K., Rodwell Victory W.: Harper'ın Biyokimyası, Barış Kitabevi, İstanbul, 595-614. 1993.
55. O'Neill, M.C.: Growth and differentiation during myogenesis in the chick embryo. *Develop. Biol.* 120: 465-480, 1987.
56. Reeve, T.: *Muscle Development Durig Restriction And Re-alimentation*. Chapter 4.
57. Rinderknecht, E., and Humbel, R. E.: Primary structure of human insulin-like growth factor-II. *FEBS. Lett.* 89: 283-290, 1978.
58. Rothenburger, A., Gay, R.: *Renkli Embriyoloji Atlası (Color Atlas Of Embryology)* Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti. İstanbul. 2000.
59. Rubin, J. B., Shia, M. A., and Pilch, P. F.: Stimulation of tyrosinespecific phosphorylation in vitro by IGF-I. *Nature* 305: 438-440, 1983.
60. Sadler, T. W.: *Langman's Medikal Embriyoloji*. Palme Yayıncılık 6.Baskı. 1993.
61. Sağlam, M., Aştı, R. N., Özer, A.: *Genel Histoloji* 6. Baskı Yorum Matbaacılık. Ankara. 2001.
62. Sanger, J. W., Chowrashi, P., Shaner, N. C., Spalthoff, S., Wang, J.: Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells. *clinical orthopaedics and related research*. Number 403, S 153-162. Philadelphia. 2002.
63. Schmid, C., Steiner, T., and Froesch, E. R.: Preferential enhancement of myoblasts differentiation by IGF-1 and II in primary cultures of chick embryonic cells. *FEBS Lett.* 116: 117-121, 1983.

64. Schneider, Marlon R., Lahm, Harald, Wu, Minyao, Hoeflich, Anders, and Wolf, Eckhard.: Transgenic mouse models for studying the functions of insulin-like growth faktor-binding proteins. *The FASEB Journal*, Vol 14, April. 2000.
65. Schoenle, E., Zapf, J., Hauri, C., Steiner, T., and Froesch, E. R.: Comparison of in vitro effects of IGF-I and II and of growth hormone in hypophysectomized rats. *Acta Endoc.* 108: 167-174, 1985.
66. Schwander, J. C., Hauri, C., Zapf, J., and Froesch, E. R.: Synthesis and secretion of IGF-I and its binding protein by the perfused rat liver: Dependence on growth hormone status. *Endocrinology* 113: 297-305, 1983.
67. Scottner, A., Clark, R.G., Fryklund, L., and Robinson, T.: Growth responses in a mutant dwarf rat to human growth hormone and recombinant human IGF-I. *Endocrinology* 124: 2519-2526, 1989.
68. Serrano, J., Shuldiner, A. R., Roberts, C. T., LeRoith, D., and De Pablo, F.: The insulin-like growth factor-I gene is expressed in chick embryos during early organogenesis. *Endocrinology* 127: 1547-1550, 1990.
69. Spencer, G. S. G., Garssen, G. J., Gerrits, A. R., Spencer, E. M., and Kestin, S. C.: Lack of effect of exogenous IGF-I on chick embryo growth rate. *Repro. Nutr. Dev.* 30: 515-521, 1990.
70. Sturkie, P. D.: *Avian Physiology*. Fourth Edition. Springer-Verlag New York. 1986.
71. Swatland Internet; http://www.aps.uoguelph.ca/~swatland/ch6_0.htm, Prenatal Development Of Skeletal Muscle. 2003.
72. Sweeney, L. J., Kennedy, J.M., Zak., R., Kokjohn, K., and Kelly, S.W.: Evidence for expression of a common myosin heavy chain phenotype during initial stages of avian embryogenesis. *Dev. Biol.* 133: 361-374, 1989.
73. Tanaka, T., Hayashida, Y., Sagaguchi, T., Ohkubo, T., Wakita, M., Hoshino, S., and Nakashima, K.: Growth hormone independent expression of IGF-1 messenger RNA in extrahepatic tissues of the chicken. *Endocrinology* 137: 30-34, 1996.
74. Thomson, S. R.: Inhibition of skeletal myogenesis by activated raf-kinase. The Pennsylvania State University. 2003.
75. Tollefsen, S. E., Lajara, R., McCusker, R. H., Clemmons, D. R., and Rotwein, P.: Insulin-like growth factors (IGFs) in muscle development. *The Journal of Biological Chemistry* 264: 13810-13817, 1989.
76. Treadway, J. L., Morrison, B. D., Goldfine, I. D., and Pessin, J. E.: Assembly of insulin/IGF-I hybrid receptors in vitro. *J.Biol. Chem.* 264:21450-21453, 1989.
77. Van Wyk, J. J.: The somatomedins: Biological actions and physiologic control mechanism. *Hormonal proteins and peptides* pp. 82-125. Academic press, New York. 1984.
78. Van Bull-Offers, S., Veda, I., and Van Den Brande, J. L.: Biosynthetic somatomedin (IGF-1) increases the length and weight of snell dwarf mice. *Pediatr. Res.* 20: 825-827, 1986.
79. Vasilatos-Youngken, R., and Scanes, C.: Growth hormone and insulin-like growth factors in poultry growth: Required, optimal or ineffective? *Poultry Sci.* 70: 1764-1780, 1991.
80. Wheater, P. R., Burkitt, H. G., Daniels, V. G.: *Wheater's Functional Histology*. First Edition New York and Tokyo. 1993.
81. Widmer, U., Schmid, C., Zapf, J., and Froesch, E. R.: Effects of insulin-like growth factors on chick embryo hepatocytes. *Acta. Endoc.* 108: 237-244, 1985.
82. Yılmaz, B.: *Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi*. Feryal Matbaacılık. Ankara. 1999.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kars 1974 doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi Kars'ta tamamladım. Lisans eğitimimi Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesinde 1998 yılında tamamladım. Mezuniyet sonrası özel veteriner kliniğinde 1 yıl çalıştım. 1999-2000 tarihleri arasında askerlik görevimi yaptım. 2001 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün açmış olduğu yüksek lisans sınavını kazanarak Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım. 2003 yılında aynı anabilim dalına Araştırma görevlisi olarak atandım. Halen KAÜ. Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

