

## YUMURTAYA VERİLEN AFLATOKSİN B<sub>1</sub>'İN ETÇİ PİLİÇLERDE TİBİANIN PROKSİMAL BÜYÜME PLAĞININ EMBRİYONİK GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ\*

Yasemin Öznurlu<sup>1</sup>@

İlhami Çelik<sup>2</sup>

### Effects of in ovo Administrated Aflatoxin B<sub>1</sub> on the Embryonic Development of Proximal Tibial Growth Plate in Broiler Chickens

**Özet:** Bu çalışmada, yumurtaya verilen aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)'in etçi pilicilerde, tibia'nın ve bunun proksimal büyüme plağının embriyonik gelişimi üzerindeki etkileri histolojik ve histometrik yöntemlerle belirlendi. Toplam 1024 adet kuluçkalık yumurta; kontrol, delinip-kapatılan, solvent, 2.5ng AFB<sub>1</sub>/yumurta, 5ng AFB<sub>1</sub>/yumurta, 7.5ng AFB<sub>1</sub>/yumurta, 10ng AFB<sub>1</sub>/yumurta, 15ng AFB<sub>1</sub>/yumurta, 17.5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta ve 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta olmak üzere 10 gruba ayrıldı. Test solüsyonları hava kamarası yoluyla ve inkübasyon öncesi enjekte edildi. Inkübasyonun 13, 15, 17, 19. ve 21. günleriyle, kuluçkadan çıkışı takiben birinci ve ikinci haftalarda her gruptan 5'er hayvandan tibia örnekleri alındı. Tibia örnekleri, yumuşak dokuları uzaklaştırıldıktan sonra hassas terazide tartıldı ve dijital kumpas ile uzunlukları belirlendi. Takiben, rutin histolojik tekniklerde takipleri yapılarak parafinde bloklandı. Bloklardan alınan 6 µm kalınlığındaki kesitler üçlü boyama, hematoksilin-eozin, Schmorl'un pikro-tiyonin metodu, Alizarin red-S ve Von Kossa metotlarıyla boyandı. AFB<sub>1</sub> verilen grupların ortalama tibia uzunlukları ve ağırlıklarının, kontrol, delinip-kapatılan ve solvent gruplarınıninkilerden önemli (P<0.05) derecede düşük olduğu belirlendi. Aynı dokulardan hazırlanan preparatların ışık mikroskopik incelemelerde, büyüme plakasında rezerv, proliferatif ve hipertrofik zonların, AFB<sub>1</sub> verilen gruplarda önemli derecede (P<0.05) incelendiği; tranzisyonel zonun ise özellikle 17.5 ng ve 20 ng/AFB<sub>1</sub>/yumurta gruplarında önemli derecede (P<0.05) genişlemiş olduğu dikkati çekti. Yumurtada bulunan AFB<sub>1</sub>'in, embriyonun iskelet sisteminin embriyonik gelişimini baskıladığı ve bu etkilerinin özellikle büyüme plakasının rezerv, proliferatif ve hipertrofik zonlarında belirgin olduğu sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Broiler, Aflatoksin B<sub>1</sub>, Embriyonik Gelişim, Büyüme Plağı

**Summary:** In this study, detrimental effects of in ovo given aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) on the embryonic development of tibia and its proximal growth plate were determined by means of histologic and histometric methods. For this purpose, 1024 eggs of Hubbard parent stocks were divided into 10 groups, which designed as controls, drilled-sealed group, solvent group, 2.5 ng AFB<sub>1</sub>/egg group, 5 ng AFB<sub>1</sub>/egg group, 7.5 ng AFB<sub>1</sub>/egg group, 10 ng AFB<sub>1</sub>/egg group, 15 ng AFB<sub>1</sub>/egg group, 17.5 ng AFB<sub>1</sub>/egg group and 20 ng AFB<sub>1</sub>/egg group. Test solutions were injected via the air-sac at pre-incubation period. Five eggs from each group were opened at 13rd, 15th, 17th, 19th, 21th day of incubation, and also at 1st and 2nd weeks of post hatch. At these periods, soft tissues were removed from the tibia, their length was measured with a measured with a digital callipers and following weighed. The relative tibia weights (g of tibia 100g-1 of embryos and chicks) were calculated. The tibial tissue samples were processed for routine histological techniques. The results of tibial measurements have revealed that AFB<sub>1</sub> treated groups displayed lower mean tibial lengths and weights when compared to the drilled-sealed and solvent groups (P<0.05). Results of the light microscopic investigations have showed that both proliferative and hypertrophic zones significantly (P<0.05) narrowed in all AFB<sub>1</sub> treated groups whereas, the transitional zone thickened in both 17.5 and 20 ng AFB<sub>1</sub> /egg groups when compared to the controls, drilled-sealed and solvent groups. The results have revealed that in ovo given AFB<sub>1</sub> at the doses of 17.5 AFB<sub>1</sub> /egg and 20 ng AFB<sub>1</sub> /egg might interfere and to cause retardation of embryonic development of the skeletal system. The effects are more pronounced in tibia and its proximal growth plate.

**Key Words:** Broiler, Aflatoxin B<sub>1</sub>, Embryonic Development, Growth Plate

#### Giriş

Aflatoksinler (AF), *Aspergillus* cinsi mantarlar ve

özellikle de *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un toksik metabolitleridir. Doğada, yemlerde ve yem hammaddelerinde üreyen *Aspergillus* türlerinin ürettiği af-

Geliş Tarihi : 18.11.2004 @: yasemin\_ozkan@hotmail.com

\* Bu çalışma, Yasemin Öznurlu'nun aynı konudaki Doktora Tezi'nin bir bölümüdür.

1. Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, AFYON

2. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, KONYA

latoksinlerin çok büyük oranı (%75-83) aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)'dir ve aflatoksikozlardan da büyük oranda bu aflatoksin sorumludur (Leeson ve ark 1995, Oğuz 1997, Oğuz ve ark 2000b). Aflatoksinler ve özellikle AFB<sub>1</sub>, kanatlı sektöründe yumurta verimini ve damızlık yumurtaların kuluçka randımanını da düşürmektedir (Leeson ve ark 1995, Çelik ve ark 2000a).

Gerek memeli hayvanlar ve gerekse de kanatlılarda yapılan deneysel çalışma (Ellis ve Dipaolo 1967, Mayura ve ark 1998, Çelik ve ark 2000a, Sur ve Çelik 2003) sonuçları, AF'nin ve özellikle de AFB<sub>1</sub>'in oldukça güçlü embriyotoksik etkilerinin olduğunu ortaya koymaktadır. Kanatlılarda, memelilerdeki gibi bir fetal-maternal ilişki bulunmamakla birlikte, yemlerle alınan AF'ler belli oranlarda yumurtaya da geçmektedir. Yapılan hesaplamalar, AFB<sub>1</sub>'in yemden yumurtaya geçiş oranının 1/2200-1/2500 arasında olduğunu ortaya koymaktadır (Hamilton 1982). Yumurtaya geçen AFB<sub>1</sub>, özellikle kuluçkanın erken dönemlerinde yüksek oranda embriyonik ölüme ya da gelişme geriliğine yol açmaktadır (Cilievici ve ark 1980, Çelik ve ark 2000a, Sur ve Çelik 2003).

Et tavuğu yetiştiriciliğinde hayvanların kısa sürede kesim ağırlığına ulaşmaları amaçlandığından; besleme döneminde ortaya çıkan her türlü olumsuz faktör gelişmeyi engellemekte, verimi ve kârlılığı düşürmektedir. Ayrıca, besleme süresinin kısa ve bunun sonucu olarak yem tüketim hızının da yüksek olması nedeniyle, yemde düşük düzeyde AF bulunsa bile hayvanlar yüksek miktarda AF almaktadır. Aflatoksikozisli et tavuklarında dikkati çeken en belirgin bulgular, yem tüketimi ile canlı ağırlık kazancının ve yemden yararlanma oranının düşmesidir (Diener ve Davis 1985, Oğuz ve Kurtoğlu 2000).

AF'lerin iskelet sisteminin gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların büyük çoğunluğu, besleme döneminde yapılan yedirme çalışmalarıdır. Bu çalışmalarda (Huff ve ark 1980, Maurice ve ark 1983, Wyatt ve Jensen 1990, Farquharson 1999), yemle düşük dozlarda alınan AFB<sub>1</sub>'in dahi broilerlerde kemik dayanıklılığını azalttığı ve kırılabilirliği arttırdığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, AFB<sub>1</sub>'in kemik dokusu ve iskelet sisteminin embriyonik gelişimi üzerindeki etkileri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda (Çelik ve ark 2000a, Sur 2001), embriyonik dönemde maruz kalınan AFB<sub>1</sub>'in, embriyonik hücreler üzerinde letal sitotoksik etkisi yanında bu hücrelerin diferansiyasyonunu bozabileceği de ileri sürülmüştür. Bununla birlikte, yumurtada bulunan AFB<sub>1</sub>'in, uzun kemiklerin embriyonik gelişimi ve bu kemiklerin büyüme plağı üzerindeki etkileri hakkında yeterli bilgi bu-

lunmamaktadır.

Tibia en hızlı büyüyen ve basınca en fazla maruz kalan kemiklerden biri olduğundan bunun proksimal büyüme plağı, iskelet sisteminde bozukluklara yol açan faktörlerden en fazla etkilenen bölgedir. Bu yüzden tibia, iskelet sisteminin gelişimi ve bozuklarının belirlenmesi amacıyla üzerinde en fazla çalışılan kemiktir. Tibial büyüme plağındaki kondrositlerin çoğalma ve diferensiyasyon hızları, bu kemiğin hern uzama hızını ve hem de ulaşabileceği uzunluğu belirler. Özellikle et piçilerinde; tibial diskondroplazi, osteokondrozis, raşitizm, epifiz ayrılması, tibia rotasyonu, tibia bükülmesi, gastrocnemius tendonunun yırtılması ve kayması olgular sıklıkla rastlanan iskelet bozukluklarıdır. Bu nedenle tibianın proksimal büyüme plağı, gerek deneysel çalışmalarda ve gerekse de iskelet sistemi hastalıklarının teşhisinde özel bir öneme sahiptir (Leterrier ve Nys 1992).

Büyüme plağı, değişik kondrosit tiplerinin şekillendirdiği farklı hücre zonlarından oluşur ve her bir zon, farklı diferensiyasyon evrelerindeki kıkırdak hücrelerini barındırır (Germiller ve Goldstein 1997). Orth (1999), kanatlıların tibial büyüme plağında, memelilerdeki rezerv zona karşılık gelen dinlenme fazındaki hücrelerin oluşturduğu zon, proliferatif zon, ve hipertrofik zon olmak üzere 3 zonun bulunduğunu bildirmişse de çoğu araştırmacı (Haynes ve ark 1985, Leach ve Gay 1987, Germiller ve Goldstein 1997, Farquharson ve Jefferies 2000), proliferatif zon ile hipertrofik zon arasında belirgin bir tranzisyonel zonun bulunduğunu da ifade etmektedirler. Büyüme plağındaki hücrelerin olgunlaşması, kanatlı ve memeli türlerinin her ikisinde de düzenli bir sıra halinde gerçekleşmekle birlikte; kanatlılardaki kondrosit sütunları daha uzun olup, nispeten daha düzensiz dizilmiş olan hücre sütunlarından meydana gelmektedir (Kember ve ark 1990).

Memelilerde uzun kemiklerin uzama hızları, büyüme plağının hipertrofik zonundaki kondrositlerin proliferasyon hızlarındaki ve hacimlerindeki artışlarla belirlendiği halde; kanatlılarda, proliferatif zon kondrositlerinin bölünme ve büyüme hızları tarafından belirlenmektedir (Kember ve ark 1990, Germiller ve Goldstein 1997, Farquharson ve Jefferies 2000).

Büyüme plağı zonlarındaki kondrositler belirli diferansiyasyon aşamaları geçirerek bir sonraki zonu oluşturmakta ve hipertrofiye olan hücrelerden en alt katmandakileri programlı hücre ölümü ile yıkılmaktadırlar (Erenpreisa ve Roach 1999, Orth 1999). Hücre diferansiyasyonunu ve programlı hücre ölümünü aksatan herhangi bir faktör, büyüme plağı zonlarının genişlemesine yol açabilmektedir. Bu durumda da ağırlığı taşıyamayan tibiada önemli yapısal ve

fonksiyonel bozukluklar ortaya çıkabilmektedir.

Bu çalışmada, yumurtaya 2.5ng AFB<sub>1</sub>/yumurta, 5ng AFB<sub>1</sub>/yumurta, 7.5ng AFB<sub>1</sub>/yumurta, 10ng AFB<sub>1</sub>/yumurta, 15ng AFB<sub>1</sub>/yumurta, 17.5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta ve 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta dozlarında verilen AFB<sub>1</sub>'in, kuluçkanın farklı dönemlerindeki embriyo ağırlıkları ve kuluçka sonrası ilk iki hafta süresince civciv ağırlıkları ile tibianın proksimal büyüme plakasındaki kondrosit zonlarının genişlikleri üzerindeki etkileri, ışık mikroskopik düzeyde belirlenmiştir.

### Materyal ve Metot

**Yumurta materyali:** Bu amaçla, yemlerinde düzenli olarak aflatoksin kontrolleri yapılan ve ölçülebilir düzeyde (<1 ppb) aflatoksin içermeyen yemle beslenen Hubbard ırkı broiler anaçlara ait 1024 adet kuluçkalık yumurta kullanıldı.

**Aflatoksin B<sub>1</sub> solüsyonlarının hazırlanması:** Çalışmada, kristalize haldeki saf aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) standardı (Makor Chemical Co., Jerussalem, Israel) kullanıldı.

Kristalize haldeki saf AFB<sub>1</sub>, benzende çözülürülerek 20 µg/mL AFB<sub>1</sub> içeren stok solüsyon hazırlandı. Bu solüsyondan, çalışmada kullanılacak olan her grup için gereken AFB<sub>1</sub> miktarını içeren hacimlerdeki çözeltiler farklı tüplere aktarıldı. Tüpler ağızları açık halde karanlıkta bekletilerek benzeri tamamen uçuruldu. Tüplere, önceden hesaplanarak belirlenen hacimlerde %99.9'luk etil alkol ilave edildi ve dipteki AFB<sub>1</sub> tamamen çözülürüldü. Takiben, her yumurtaya enjekte edilen 20 µL'sinde gerekli olan AFB<sub>1</sub> miktarını içeren ve etil alkol konsantrasyonu da %30 olan test solüsyonlarının hazırlanması amacıyla her şişeye yeterli hacimde steril bidistile su ilave edildi.

Test solüsyonlarının, AFB<sub>1</sub> konsantrasyonları, standart alüminyum plakalar (Merck) kullanılarak İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Chromatography, TLC) ve Floresans Spektrofotometre (Camag II. Basel, Switzerland; emisyon dalga boyu 425 nm, eksitasyon dalga boyu 365 nm) ile kontrol edildi. Çalışma solüsyonları bulunan tüpler alüminyum folyo ile sarılarak, kullanılıncaya kadar buzdolabında (+4 °C'de) muhafaza edildi.

**Deney gruplarının oluşturulması ve AFB<sub>1</sub> solüsyonlarının yumurtalara enjeksiyonu:** Bu çalışmada kullanılan yumurtalar, özellikleri Tablo 1'de verilen 10 ayrı gruba ayrıldı.

Enjeksiyon işleminden önce yumurtalar hassas terazisi (Sartorius, PT 120) ile tartıldı ve takiben küt uçları %96'luk etil alkolle dezenfekte edildi. Tüm enjeksiyonlar hava kamerası yoluyla ve kuluçka başlangıcında gerçekleştirildi. Delikler özel yumurta delicisi ile açıldı ve enjeksiyonu takiben hemen sıvı parafinle kapatıldı. Enjeksiyonlar steril uçlu mikropipette (Sealpette, Jencons, Finland) gerçekleştirildi. Kuluçka işlemleri, S.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki 2000 yumurta kapasiteli kuluçka makinesinde (Gostyn, Poland), optimal koşullarda (37.8°C sıcaklık ve % 60-84 nispi nem ve günde en az 4 kez çevirme) gerçekleştirildi.

**Yumurtaların açılması ve doku örneklerinin alınması:** Büyüme plağının embriyonik gelişimini incelemek amacıyla kuluçkanın 13, 15, 17 ve 19. günlerinde, her gruptan 5'er yumurta, tartımı takiben açıldı. Embriyonik gelişim dönemleri Hamburger-Hamilton (1951) skalasına göre belirlendi ve takiben embriyolar hassas teraziyle tartıldı. Embriyo ağırlıkları ve yumurta ağırlıkları verileri kullanılarak rölatif embriyo ağırlıkları (embriyo ağırlığı+yumurta ağırlığı X 100) hesaplandı.

Tablo 1. Çalışmada oluşturulan gruplar ve bu gruplardaki yumurtalara uygulanan işlemler

Gruplar	Yumurtalara uygulanan işlem (Test solüsyonu hacmi 20 µL'dir)
Kontrol, n=74	Hiçbir işlem uygulanmadı.
Delinip-kapatılan, n=75	Delip-kapatma
Solvent, n=85	%30 ETOH enjeksiyonu
2.5 ng AFB <sub>1</sub> , n=90	2.5 ng AFB <sub>1</sub> enjeksiyonu
5 ng AFB <sub>1</sub> , n=95	5 ng AFB <sub>1</sub> enjeksiyonu
7.5 ng AFB <sub>1</sub> , n=95	7.5 ng AFB <sub>1</sub> enjeksiyonu
10 ng AFB <sub>1</sub> , n=100	10 ng AFB <sub>1</sub> enjeksiyonu
15 ng AFB <sub>1</sub> , n=110	15 ng AFB <sub>1</sub> enjeksiyonu
17.5 ng AFB <sub>1</sub> , n=150	17.5 ng AFB <sub>1</sub> enjeksiyonu
20 ng AFB <sub>1</sub> , n=150	20 ng AFB <sub>1</sub> enjeksiyonu

Histolojik ve morfolojik incelemeler için her hayvanın sağ ve sol tibiaları alındı. Kemikler, yumuşak dokuları uzaklaştırıldıktan sonra hassas teraziyle tartıldı ve dijital kumpasla (Electronic Digital Caliper, 0-150 mm,  $\pm 0.01$  mm hassasiyetli) boylan ölçüldü.

Kuluçkadan çıkışın ilk gününde ve kuluçkadan çıkışı takip eden 1. hafta ile 2. hafta sonunda her gruptan 5'er hayvanın sağ ve sol tibiaları alındı. Bu kemiklere de embriyonik dönemde alınan kemiklere uygulanan işlemler uygulandı.

Genel histolojik yapının belirlenmesi amacıyla; alınan tibiaların birer tanesi fosfat tamponlu (0.1 M, pH 7.4) formal-salin solüsyonunda tespit edildikten sonra % 5'lik nitrik asit solüsyonunda dekalsifiye edildi. Doku örnekleri; bilinen histolojik yöntemlerle yıkama, dehidrasyon ve parlatma işlemlerini takiben parafinde bloklandı. Bloklardan alınan 6  $\mu$ m kalınlığındaki kesitler Crossmon'un üçlü boyası (Culling ve ark 1985), hematoxilen-eozin (Culling ve ark 1985), Schmorl'un pikro-tiyonin metodu (Stevens ve ark 1990) metotlarıyla boyandı. Her hayvanın ikinci tibiası ise Alizarin red-S (Stevens 1990) ve von Kossa (Stevens ve ark 1990) boyama yöntemleriyle boyandı.

Hazırlanan preparatlar Leitz Laborlux-12 model araştırma mikroskobunda incelenerek, büyüme plakasındaki zonların genişlikleri, dış ve iç lateral bölgeler

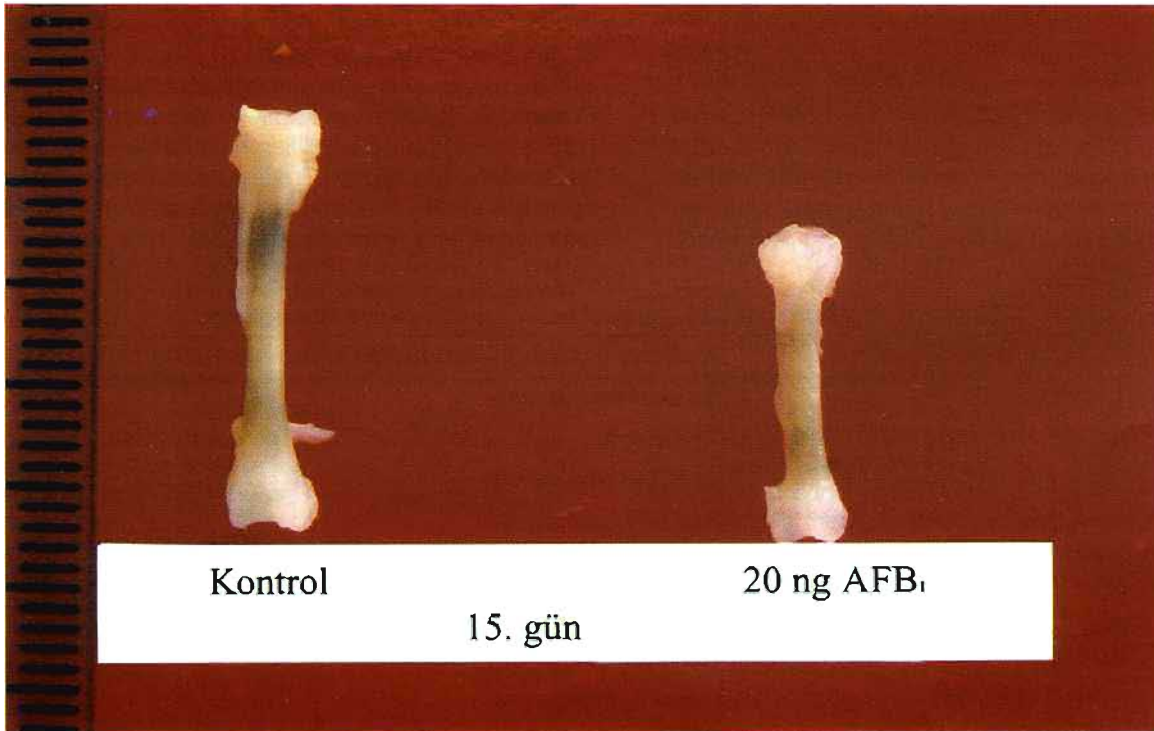
ile orta hatta olmak üzere üç ayrı bölgede çizgisel oküler mikrometre ile ölçüldü. Gerekli görülen bölgelerin fotoğrafları, DS-5M dijital kamera ve DS-L1 kamera kontrol ünitesiyle donatılan Nikon E-400 model mikroskopla çekildi.

İstatistiksel analizler: Elde edilen sayısal veriler One-Way Anova testi (SPSS 8.0, 1997) ile analiz edilerek gruplar arası farkların önem dereceleri belirlendi.

### Bulgular

**Rölatif Embriyo Ağırlıkları:** Kuluçkanın farklı dönemlerinde tespit edilen ortalama rölatif embriyo ağırlıkları ve kuluçka sonrası ortalama civciv ağırlıkları Tablo 2' de verilmiştir. AFB<sub>1</sub> verilen grupların rölatif embriyo ağırlıkları; kuluçka dönemi boyunca, kontrol, delinip-kapatılan ve solvent gruplarıninkilerden önemli derecede ( $P < 0.05$ , Tablo 2) düşük bulunmuştur. Kuluçkadan çıkış günü ve takip eden 1. haftada, AFB<sub>1</sub> verilen grupların canlı ağırlık ortalamaları da kontrol gruplarınkinden önemli derecede ( $P < 0.05$ , Tablo 2) düşük ise de, AFB<sub>1</sub> verilen gruplar arasındaki farklar önemsizdi ( $P > 0.05$ , Tablo 2).

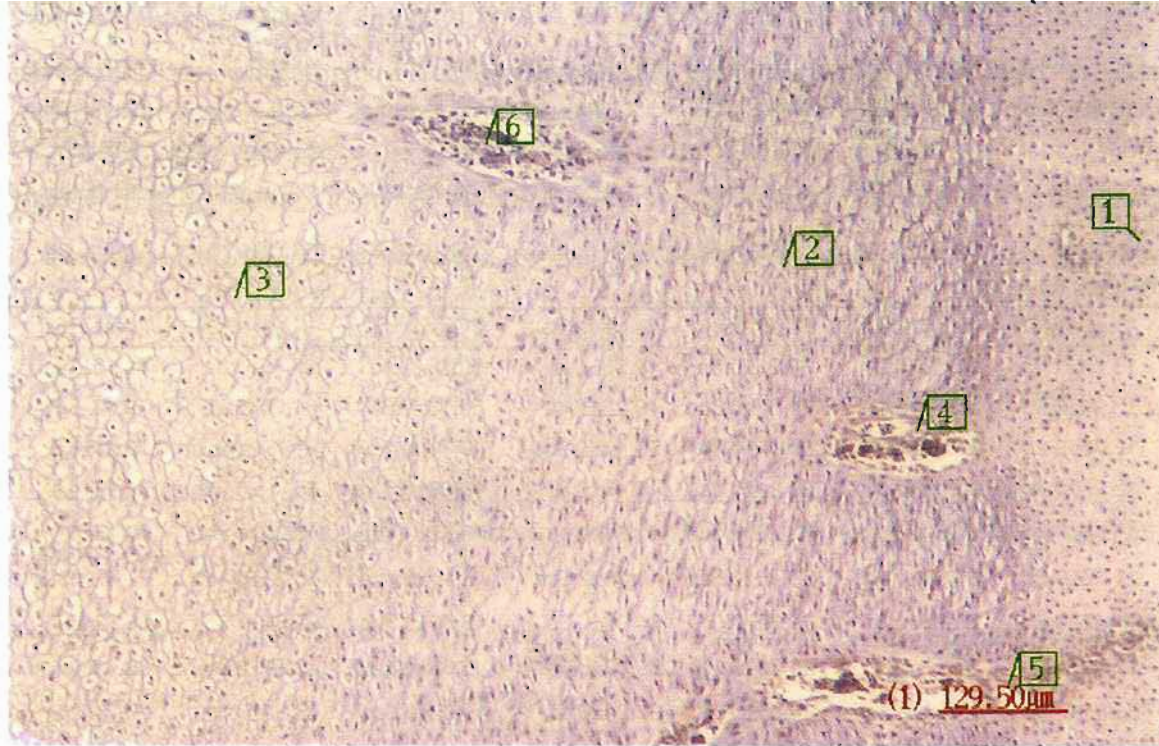
**Tibia'dan Elde Edilen Bulgular:** Grupların, tibia uzunlukları ile tibia ağırlıkları Tablo 3 ve 4'te verilmiştir. AFB<sub>1</sub> verilen gruplarda tibia uzunluğu ile ağırlığının önemli derecede ( $P < 0.05$ ) düşük olduğu (Tablo 3 ve



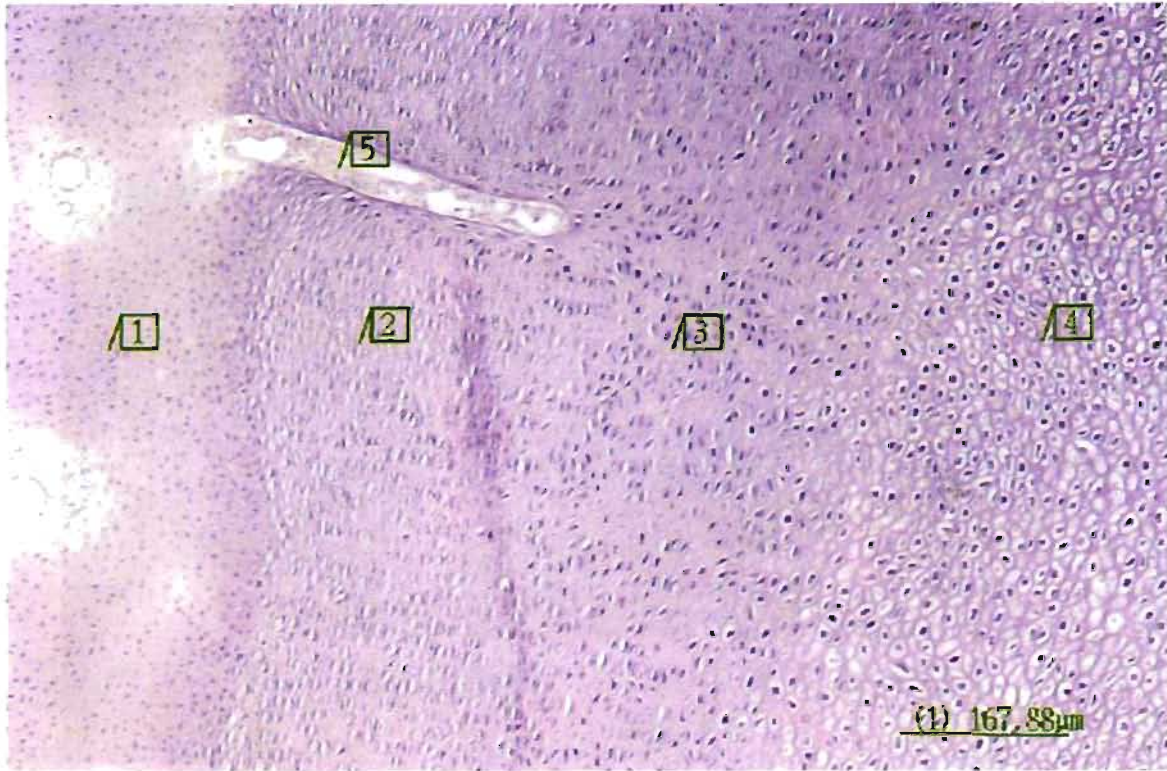
Şekil 1. Kuluçkanın on beşinci gününde kontrol ve 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuna ait embriyoların tibiaları görülmekte



Şekil 2. Kuluçkanın on dokuzuncu kontrol ve 20 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuna ait embriyoların tibia ları görülmekte



Şekil 3. Kuluçkanın on dokuzuncu gününde 5 ng AFB<sub>1</sub>/yumurta grubuna ait bir embriyonun tibia kesiti. Tibia'nın epifizeyal bölgesi (1) ile büyüme plağının proliferatif (2) ve tranzisyonel zonlarına (3) ve invaze olan damar kesitleri (4, 5, 6) görülmektedir. Hematoksilen-Eosin, Bar: 129,50 µm.



Şekil 4. Kuluçkadan çıkışın ilk gününde solvent grubuna ait bir civcivin tibia kesiti . Elüvyeme plağında embriyonik dönem boyunca gözlenmeyen rezerv zon (2) ile proliferatif zon (3), tranzisyonel zon (4), epifiz kırırdağı (1) ve büyüme plakasına invaze olan epifizyal bir damar kesiti (5) izlenmektedir. Hematoksilen-Eozin, Bar: 167,88  $\mu$ m.

4), aynı zamanda bu hayvanlarda iskelet sisteminin genel gelişiminin de baskılanmış olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 1 ve 2).

Işık mikroskopik incelemelerde, embriyonik

dönem boyunca büyüme plağının rezerv zon dışındaki bütün kondrosit zonları belirgin olarak ayırt edilirken (Şekil 3); rezerv zon, kuluçkadan çıkışın ilk gününden itibaren bellirgin bir bölge halinde gözlenmiştir (Şekil 4).

Tablo 2. Kuluçka dönemi ve kuluçka sonrası dönemin farklı gün ve haftalarında tespit edilen ortalama rölatif embriyo ağırlıkları ile ortalama civciv ağırlıkları (g)

Gruplar=5	13. gün ( $\bar{x}\pm Ss$ )	15. gün ( $\bar{x}\pm Ss$ )	17. gün ( $\bar{x}\pm Ss$ )	19. gün ( $\bar{x}\pm Ss$ )	21. gün ( $\bar{x}\pm Ss$ )	1. hafta ( $\bar{x}\pm Ss$ )	2.hafta( $\bar{x}\pm Ss$ )
Kontrol	15,14 $\pm$ 1,4a	27,13 $\pm$ 0,9a	38,23 $\pm$ 0,8a	49,38 $\pm$ 1,2a	50,70 $\pm$ 1,1a	62,55 $\pm$ 4,3a	81,10 $\pm$ 10,6
Delinip-kapatılan	13,91 $\pm$ 0,9b	25,24 $\pm$ 0,1b	34,54 $\pm$ 0,5b	48,27 $\pm$ 1,4a	50,18 $\pm$ 1,5ab	61,00 $\pm$ 0,3a	79,63 $\pm$ 3,5
Solvent-kontrol	12,75 $\pm$ 0,2c	25,47 $\pm$ 0,2b	35,15 $\pm$ 0,1b	43,44 $\pm$ 2,0bc	49,79 $\pm$ 0,7abc	59,79 $\pm$ 4,2ab	78,21 $\pm$ 6,3
2.5 ng AFB <sub>1</sub>	12,26 $\pm$ 0,1cd	22,76 $\pm$ 0,8c	30,24 $\pm$ 0,9c	45,45 $\pm$ 0,8b	49,68 $\pm$ 0,3 abc	55,40 $\pm$ 0,9ab	74,12 $\pm$ 4,4
5 ng AFB <sub>1</sub>	11,46 $\pm$ 0,1d	21,64 $\pm$ 0,8cd	27,52 $\pm$ 0,8de	41,54 $\pm$ 2,1c	49,72 $\pm$ 1,8abc	57,09 $\pm$ 4,8ab	72,13 $\pm$ 6,6
7.5 ng AFB <sub>1</sub>	11,79 $\pm$ 0,5d	21,63 $\pm$ 0,9cd	26,76 $\pm$ 1,5de	41,28 $\pm$ 2,5cd	48,14 $\pm$ 0,4bcd	56,22 $\pm$ 6,8ab	71,47 $\pm$ 13,8
10 ng AFB <sub>1</sub>	11,42 $\pm$ 0,2d	20,61 $\pm$ 1,2d	29,19 $\pm$ 1,0cd	44,06 $\pm$ 0,6b	48,06 $\pm$ 0,3bcd	52,51 $\pm$ 4,3b	66,82 $\pm$ 6,7
15 ng AFB <sub>1</sub>	7,89 $\pm$ 0,2e	16,11 $\pm$ 2,6f	26,25 $\pm$ 0,1ef	39,09 $\pm$ 0,0de	48,05 $\pm$ 0,3bcd	43,56 $\pm$ 2,5c	68,71 $\pm$ 0,5
17.5 ng AFB <sub>1</sub>	8,58 $\pm$ 0,2e	18,24 $\pm$ 0,4e	24,00 $\pm$ 0,7f	37,24 $\pm$ 0,2e	47,65 $\pm$ 0,5cd	43,32 $\pm$ 0,7c	67,18 $\pm$ 2,2
20 ng AFB <sub>1</sub>	6,93 $\pm$ 0,7f	16,41 $\pm$ 1,2f	17,26 $\pm$ 5,7g	32,77 $\pm$ 3,05f	46,71 $\pm$ 0,5d		

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

Tablo 3. Kuluçkanın farklı dönemlerinde tespit edilen ortalama tibia uzunlukları (mm).

GruplarN=5	13. gün (x±Ss)	15. gün (x±Ss)	17. gün (x±Ss)	19. gün (x±Ss)	21. gün (x±Ss)	1. hafta (x±Ss)	2. hafta (x±Ss)
Kontrol	14,35±0,2 <sup>a</sup>	19,86 ± 0,5 <sup>a</sup>	23,56 ± 0,7 <sup>a</sup>	27,82±1,3 <sup>a</sup>	31,09 ± 1,3 <sup>a</sup>	36,33±1,1 <sup>a</sup>	45,00±0,0 <sup>a</sup>
Delinip-kapatılan	14,18±0,5 <sup>ab</sup>	19,58 ± 0,3 <sup>ab</sup>	23,85 ± 0,3 <sup>a</sup>	27,61 ± 0,9 <sup>a</sup>	29,45±0,6 <sup>b</sup>	35,66±0,5 <sup>ab</sup>	43,66±3,2 <sup>ab</sup>
Solvent-kontrol	13,39±0,3 <sup>abc</sup>	18,23 ± 0,3 <sup>bc</sup>	22,41±0,8 <sup>ab</sup>	27,22±1,5 <sup>a</sup>	28,35±0,7 <sup>bcd</sup>	35,00±0,0 <sup>abc</sup>	41,66±2,8 <sup>abc</sup>
2.5ng AFB <sub>1</sub>	13,34±0,3 <sup>abc</sup>	17,91 ± 0,5 <sup>cd</sup>	22,07±0,9 <sup>abc</sup>	26,35±0,1 <sup>a</sup>	29,10±0,5 <sup>bc</sup>	34,00±1,7 <sup>bc</sup>	40,00±2,0 <sup>bc</sup>
5 ng AFB <sub>1</sub>	12,40±1,3 <sup>cde</sup>	17,65 ± 0,3 <sup>cd</sup>	22,26±0,3 <sup>abc</sup>	26,78±0,6 <sup>a</sup>	29,19±0,4 <sup>bc</sup>	36,66±1,1 <sup>a</sup>	42,00±0,0 <sup>abc</sup>
7.5 ng AFB <sub>1</sub>	12,50±1,9 <sup>cd</sup>	17,09 ± 2,2 <sup>cdef</sup>	20,84±0,1 <sup>bc</sup>	26,84±0,6 <sup>a</sup>	28,13±0,5 <sup>bcd</sup>	36,00±1,0 <sup>a</sup>	39,66±1,5 <sup>bc</sup>
10 ng AFB <sub>1</sub>	12,89±0,8 <sup>bc</sup>	17,39 ± 0,4 <sup>cde</sup>	22,92±2,1 <sup>ab</sup>	26,69±0,3 <sup>a</sup>	27,73±1,5 <sup>cd</sup>	36,33±0,5 <sup>a</sup>	39,00±4,3 <sup>c</sup>
15 ng AFB <sub>1</sub>	11,98±1,1 <sup>cde</sup>	15,52 ± 1,8 <sup>f</sup>	17,53 ± 3,1 <sup>d</sup>	25,44±0,3 <sup>a</sup>	26,98±1,8 <sup>d</sup>	33,36±1,1 <sup>c</sup>	34,66±0,5 <sup>d</sup>
17.5 ng AFB <sub>1</sub>	11,43±1,3 <sup>de</sup>	16,51 ± 0,8 <sup>def</sup>	19,98 ± 0,9 <sup>c</sup>	25,42±0,3 <sup>a</sup>	27,01±0,3 <sup>d</sup>	33,00±1, <sup>c</sup>	34,66±0,5 <sup>d</sup>
20 ng AFB <sub>1</sub>	11,01± 0,4 <sup>e</sup>	15,82 ± 1,6 <sup>ef</sup>	14,73 ± 3,0 <sup>e</sup>	21,08±4,4 <sup>b</sup>	27,85±0,8 <sup>cd</sup>		

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

Tablo 4. Kuluçkanın farklı dönemlerinde ve kuluçka sonrası tespit edilen ortalama tibia ağırlıkları (g)

Gruplar n=5	13. gün (x±Ss)	15. gün (x±Ss)	17.gün (x±Ss)	19.gün (x±Ss)	21. gün (x±Ss)	1. hafta (x±Ss)	2. hafta (x±Ss)
Kontrol	0,048±0,004 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,013 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,018 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,044 <sup>a</sup>	0,45±0,069 <sup>a</sup>	0,67±0,032 <sup>a</sup>	0,91±0,066 <sup>a</sup>
Delinip-kapatılan	0,048±0,008 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,010 <sup>ab</sup>	0,35 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,38±0,035 <sup>b</sup>	0,63±0,060 <sup>a</sup>	0,90±0,04 <sup>a</sup>
Solvent-kontrol	0,046±0,008 <sup>ab</sup>	0,10 ± 0,02 <sup>bc</sup>	0,20 ± 0,028 <sup>bc</sup>	0,30 ± 0,055 <sup>b</sup>	0,33±0,084 <sup>bc</sup>	0,64±0,010 <sup>a</sup>	0,86±0,066 <sup>ab</sup>
2.5 ng AFB <sub>1</sub>	0,046±0,013 <sup>ab</sup>	0,12 ± 0,004 <sup>ab</sup>	0,18 ± 0,015 <sup>cd</sup>	0,29 ± 0,033 <sup>b</sup>	0,32±0,010 <sup>cd</sup>	0,64±0,040 <sup>a</sup>	0,82±0,106 <sup>ab</sup>
5 ng AFB <sub>1</sub>	0,040±0,001 <sup>abc</sup>	0,09± 0,007 <sup>cde</sup>	0,21± 0,007 <sup>abc</sup>	0,28 ± 0,025 <sup>b</sup>	0,32±0,015 <sup>cd</sup>	0,62±0,020 <sup>a</sup>	0,79±0,010 <sup>ab</sup>
7.5 ng AFB <sub>1</sub>	0,046±0,005 <sup>ab</sup>	0,09 ± 0,02 <sup>cd</sup>	0,18 ± 0,016 <sup>cd</sup>	0,30 ± 0,021 <sup>b</sup>	0,31±0,037 <sup>cd</sup>	0,55±0,005 <sup>b</sup>	0,80±0,083 <sup>ab</sup>
10 ng AFB <sub>1</sub>	0,036 ± 0,11 <sup>abc</sup>	0,07 ± 0,004 <sup>def</sup>	0,18 ± 0,019 <sup>cd</sup>	0,30 ± 0,021 <sup>b</sup>	0,32±0,010 <sup>cd</sup>	0,55±0,065 <sup>b</sup>	0,74±0,143 <sup>b</sup>
15 ng AFB <sub>1</sub>	0,040±0,007 <sup>abc</sup>	0,07 ± 0,02 <sup>ef</sup>	0,13 ± 0,025 <sup>e</sup>	0,26 ± 0,038 <sup>b</sup>	0,29±0,039 <sup>cd</sup>	0,50±0,010 <sup>bc</sup>	0,58±0,005 <sup>c</sup>
17.5 ng AFB <sub>1</sub>	0,034±0,011 <sup>bc</sup>	0,08 ± 0,008 <sup>def</sup>	0,16 ± 0,007 <sup>de</sup>	0,28 ± 0,031 <sup>b</sup>	0,28±0,020 <sup>cd</sup>	0,48±0,005 <sup>c</sup>	0,58±0,05 <sup>c</sup>
20 ng AFB <sub>1</sub>	0,032 ± 0,004 <sup>c</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>f</sup>	0,09 ± 0,035 <sup>f</sup>	0,21± 0,034 <sup>c</sup>	0,25±0,011 <sup>d</sup>		

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

Kuluçkanın ve kuluçkadan çıkışın farklı dönemlerinde, büyüme plağında tespit edilen hücre zonu genişlikleri Tablo 5 ve 6'da verilmiştir. Sonuçlar, AFB<sub>1</sub> verilen gruplarda rezerv zon, proliferatif zon ve hipertrofik zonu önemli derecede (P<0,05, Tablo 5,

6) daralmış olduğunu; buna karşılık tranzisyonel zonu, özellikle yüksek doz gruplarında (17.5 ng ve 20 ng/ AFB<sub>1</sub>/yumurta) daha fazla olmak üzere önemli derecede (P<0,05, Tablo 5, 6) genişlediğini ortaya koymaktadır.

Tablo 5. Kuluçkanın farklı dönemlerinde proksimal tibial büyüme plakasındaki hücre zonu genişlikleri ( $\mu\text{m}$ )

Gruplar N=5	13. gün (X $\pm$ Ss)			15. gün (X $\pm$ Ss)			17. gün (X $\pm$ Ss)			19. gün (X $\pm$ Ss)		
	Profil. zon	Tranzis. zon	Hipert. zon	Profil. zon	Tranzis. zon	Hipert. zon	Profil. zon	Tranzis. zon	Hipert. zon	Profil. zon	Tranzis. zon	Hipert. zon
Kontrol Delinip- kapatılan	720 $\pm$ 45.2 <sup>a</sup>	432 $\pm$ 34.2 <sup>b</sup>	231 $\pm$ 158.8	700 $\pm$ 61.2 <sup>a</sup>	718 $\pm$ 56.3 <sup>b</sup>	2740 $\pm$ 433.5 <sup>a</sup>	710 $\pm$ 151.6 <sup>a</sup>	640 $\pm$ 41.6 <sup>b</sup>	4100 $\pm$ 1326.6 <sup>a</sup>	750 $\pm$ 36.7 <sup>a</sup>	506 $\pm$ 6.9 <sup>b</sup>	5118 $\pm$ 214.7 <sup>a</sup>
Solvent- kontrol	676 $\pm$ 43.9 <sup>ab</sup>	514 $\pm$ 54.5 <sup>b</sup>	250 $\pm$ 282.8	720 $\pm$ 21.2 <sup>a</sup>	654 $\pm$ 11.4 <sup>b</sup>	2590 $\pm$ 260.7 <sup>abc</sup>	672 $\pm$ 158.9 <sup>a</sup>	640 $\pm$ 96.1 <sup>b</sup>	3210 $\pm$ 803.4 <sup>abc</sup>	650 $\pm$ 30.6 <sup>b</sup>	454 $\pm$ 38.4 <sup>b</sup>	5366 $\pm$ 393.4 <sup>a</sup>
2.5 ng AFB <sub>1</sub>	610 $\pm$ 14.1 <sup>bc</sup>	490 $\pm$ 26.4 <sup>b</sup>	218 $\pm$ 726.8	604 $\pm$ 74.6 <sup>b</sup>	676 $\pm$ 59.4 <sup>b</sup>	2700 $\pm$ 282.8 <sup>ab</sup>	700 $\pm$ 30.8 <sup>a</sup>	894 $\pm$ 193.6 <sup>b</sup>	2960 $\pm$ 626.6 <sup>bc</sup>	624 $\pm$ 25.0 <sup>bc</sup>	736 $\pm$ 265.9 <sup>ab</sup>	4770 $\pm$ 620.0 <sup>ab</sup>
5 ng AFB <sub>1</sub>	594 $\pm$ 61.1 <sup>bc</sup>	432 $\pm$ 112.5 <sup>b</sup>	271 $\pm$ 174.6	552 $\pm$ 49.6 <sup>bc</sup>	630 $\pm$ 105.6 <sup>b</sup>	2410 $\pm$ 320.9 <sup>abcd</sup>	550 $\pm$ 61.2 <sup>a</sup>	672 $\pm$ 52.1 <sup>b</sup>	3140 $\pm$ 630.6 <sup>abc</sup>	544 $\pm$ 132.0 <sup>ab</sup>	934 $\pm$ 540.3 <sup>a</sup>	4640 $\pm$ 559.4 <sup>ab</sup>
7.5 ng AFB <sub>1</sub>	588 $\pm$ 22.8 <sup>bc</sup>	516 $\pm$ 23.0 <sup>b</sup>	2660 $\pm$ 421.9	636 $\pm$ 21.9 <sup>ab</sup>	814 $\pm$ 13.4 <sup>b</sup>	2090 $\pm$ 516.4 <sup>bcde</sup>	652 $\pm$ 69.0 <sup>a</sup>	734 $\pm$ 42.1 <sup>b</sup>	3650 $\pm$ 278.3 <sup>ab</sup>	534 $\pm$ 20.7 <sup>de</sup>	550 $\pm$ 56.5 <sup>ab</sup>	4650 $\pm$ 705.3 <sup>ab</sup>
10 ng AFB <sub>1</sub>	554 $\pm$ 61.0 <sup>c</sup>	524 $\pm$ 40.3 <sup>b</sup>	2420 $\pm$ 428.6	490 $\pm$ 143.1 <sup>cd</sup>	548 $\pm$ 128.7 <sup>b</sup>	1830 $\pm$ 476.4 <sup>de</sup>	588 $\pm$ 154.4 <sup>a</sup>	880 $\pm$ 168.0 <sup>b</sup>	2660 $\pm$ 582.4 <sup>bcd</sup>	572 $\pm$ 19.2 <sup>cd</sup>	578 $\pm$ 90.6 <sup>b</sup>	5640 $\pm$ 260.7 <sup>a</sup>
15 ng AFB <sub>1</sub>	530 $\pm$ 66.7 <sup>c</sup>	480 $\pm$ 57.0 <sup>b</sup>	2720 $\pm$ 503.2	584 $\pm$ 48.2 <sup>b</sup>	562 $\pm$ 51.6 <sup>b</sup>	1970 $\pm$ 514.2 <sup>ode</sup>	694 $\pm$ 55.4 <sup>a</sup>	654 $\pm$ 36.4 <sup>b</sup>	3000 $\pm$ 122.4 <sup>bc</sup>	474 $\pm$ 18.1 <sup>ef</sup>	990 $\pm$ 82.1 <sup>a</sup>	5200 $\pm$ 234.5 <sup>a</sup>
17.5 ng AFB <sub>1</sub>	504 $\pm$ 78.9 <sup>c</sup>	504 $\pm$ 61.0 <sup>b</sup>	2630 $\pm$ 473.8	364 $\pm$ 58.1 <sup>a</sup>	650 $\pm$ 203.1 <sup>b</sup>	2150 $\pm$ 380.7 <sup>bcde</sup>	340 $\pm$ 115.9 <sup>b</sup>	812 $\pm$ 96.5 <sup>b</sup>	1730 $\pm$ 1013.4 <sup>d</sup>	420 $\pm$ 21.2 <sup>g</sup>	702 $\pm$ 48.1 <sup>ab</sup>	4890 $\pm$ 74.1 <sup>ab</sup>
20 ng AFB <sub>1</sub>	312 $\pm$ 158.1 <sup>d</sup>	804 $\pm$ 432 <sup>a</sup>	2170 $\pm$ 164.8	412 $\pm$ 44.3 <sup>de</sup>	638 $\pm$ 190.9 <sup>b</sup>	2240 $\pm$ 527.2 <sup>abcde</sup>	362 $\pm$ 52.6 <sup>b</sup>	926 $\pm$ 42.1 <sup>ab</sup>	2306 $\pm$ 187.5 <sup>cd</sup>	374 $\pm$ 18.1 <sup>gh</sup>	758 $\pm$ 126.7 <sup>ab</sup>	3550 $\pm$ 1748 <sup>bc</sup>
	372 $\pm$ 78.5 <sup>d</sup>	972 $\pm$ 167 <sup>a</sup>	2250 $\pm$ 435.8	368 $\pm$ 73.2 <sup>e</sup>	890 $\pm$ 167.3 <sup>a</sup>	1632 $\pm$ 576.0 <sup>a</sup>	292 $\pm$ 166.0 <sup>b</sup>	1212 $\pm$ 663.3 <sup>a</sup>	1776 $\pm$ 677.1 <sup>d</sup>	322 $\pm$ 102.3 <sup>h</sup>	876 $\pm$ 186.0 <sup>a</sup>	2780 $\pm$ 2361.5 <sup>c</sup>

a-h: Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemli iken (P<0,05); aynı harflerle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemsizdir (P>0,05).  
 Profil. zon: Proliferatif Zon, Tranzis. zon: Tranzisyonel Zon, Hipert. zon: Hipertrofik Zon

Tablo 6. Kuluçka sonrası farklı dönemlerde tibial büyüme plağında tespit edilen kondrosit zonları genişlikleri ( $\mu\text{m}$ )

Gruplar N=5	21. gün (X $\pm$ SD)			1. hafta (X $\pm$ SD)			2. hafta (X $\pm$ SD)			
	Rez. zon	Profil. zon	Tranzis. zon	Rez. zon	Profil. zon	Tranzis. zon	Rez. zone	Profil. zone	Tranzis. zone	Rez. zone
Kontrol	49 $\pm$ 5.04 <sup>a</sup>	556 $\pm$ 86.1 <sup>a</sup>	898 $\pm$ 116.7 <sup>c</sup>	49 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>	556 $\pm$ 86.1 <sup>a</sup>	898 $\pm$ 116.7 <sup>c</sup>	49 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>	556 $\pm$ 86.1 <sup>a</sup>	898 $\pm$ 116.7 <sup>c</sup>	49 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>
Delinip- kapatılan	49 $\pm$ 5.04 <sup>a</sup>	422 $\pm$ 47.1 <sup>b</sup>	886 $\pm$ 85.0 <sup>c</sup>	49 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>	422 $\pm$ 47.1 <sup>b</sup>	886 $\pm$ 85.0 <sup>c</sup>	49 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>	422 $\pm$ 47.1 <sup>b</sup>	886 $\pm$ 85.0 <sup>c</sup>	49 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>
Solvent- kontrol	40 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	428 $\pm$ 22.8 <sup>b</sup>	876 $\pm$ 96.3 <sup>c</sup>	40 $\pm$ 10.0 <sup>b</sup>	428 $\pm$ 22.8 <sup>b</sup>	876 $\pm$ 96.3 <sup>c</sup>	40 $\pm$ 10.0 <sup>b</sup>	428 $\pm$ 22.8 <sup>b</sup>	876 $\pm$ 96.3 <sup>c</sup>	40 $\pm$ 10.0 <sup>b</sup>
2.5 ng AFB <sub>1</sub>	39 $\pm$ 8.5 <sup>b</sup>	385 $\pm$ 35.7 <sup>bc</sup>	1386 $\pm$ 242.1 <sup>bc</sup>	39 $\pm$ 8.5 <sup>b</sup>	385 $\pm$ 35.7 <sup>bc</sup>	1386 $\pm$ 242.1 <sup>bc</sup>	39 $\pm$ 8.5 <sup>b</sup>	385 $\pm$ 35.7 <sup>bc</sup>	1386 $\pm$ 242.1 <sup>bc</sup>	39 $\pm$ 8.5 <sup>b</sup>
5 ng AFB <sub>1</sub>	39 $\pm$ 8.9 <sup>b</sup>	382 $\pm$ 32.7 <sup>bc</sup>	1380 $\pm$ 236.1 <sup>bc</sup>	39 $\pm$ 8.9 <sup>b</sup>	382 $\pm$ 32.7 <sup>bc</sup>	1380 $\pm$ 236.1 <sup>bc</sup>	39 $\pm$ 8.9 <sup>b</sup>	382 $\pm$ 32.7 <sup>bc</sup>	1380 $\pm$ 236.1 <sup>bc</sup>	39 $\pm$ 8.9 <sup>b</sup>
7.5 ng AFB <sub>1</sub>	34 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>	348 $\pm$ 35.6 <sup>cd</sup>	1380 $\pm$ 57.0 <sup>bc</sup>	34 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>	348 $\pm$ 35.6 <sup>cd</sup>	1380 $\pm$ 57.0 <sup>bc</sup>	34 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>	348 $\pm$ 35.6 <sup>cd</sup>	1380 $\pm$ 57.0 <sup>bc</sup>	34 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>
10 ng AFB <sub>1</sub>	34 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>	290 $\pm$ 26.4 <sup>ef</sup>	1530 $\pm$ 170.8 <sup>b</sup>	34 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>	290 $\pm$ 26.4 <sup>ef</sup>	1530 $\pm$ 170.8 <sup>b</sup>	34 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>	290 $\pm$ 26.4 <sup>ef</sup>	1530 $\pm$ 170.8 <sup>b</sup>	34 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>
15 ng AFB <sub>1</sub>	36 $\pm$ 6.5 <sup>b</sup>	340 $\pm$ 38.0 <sup>cdde</sup>	1510 $\pm$ 574.8 <sup>b</sup>	3680 $\pm$ 998.4 <sup>bc</sup>	44 $\pm$ 1.1 <sup>f</sup>	505 $\pm$ 5.0 <sup>e</sup>	847.6 $\pm$ 4.0 <sup>b</sup>	61 $\pm$ 1.09 <sup>h</sup>	523.33 $\pm$ 25.1 <sup>e</sup>	970 $\pm$ 31.2 <sup>b</sup>
17.5 ng AFB <sub>1</sub>	32 $\pm$ 2.7 <sup>bc</sup>	312 $\pm$ 21.6 <sup>del</sup>	1756 $\pm$ 908.5 <sup>ab</sup>	3340 $\pm$ 207.3 <sup>cd</sup>	40 $\pm$ 0.79	450 $\pm$ 30.0 <sup>f</sup>	1024.66 $\pm$ 25 <sup>a</sup>	59.83 $\pm$ 1.0 <sup>h</sup>	516.66 $\pm$ 15.2 <sup>e</sup>	1235.66 $\pm$ 180.5 <sup>a</sup>
20 ng AFB <sub>1</sub>	25 $\pm$ 5.0 <sup>c</sup>	276 $\pm$ 20.7 <sup>f</sup>	2200 $\pm$ 158.1 <sup>a</sup>	2310 $\pm$ 1731.4 <sup>d</sup>	Belirlenmedi	Belirlenmedi	Belirlenmedi	Belirlenmedi	Belirlenmedi	Belirlenmedi

a-h: Aynı sütunda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemli iken (P<0,05); aynı harflerle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemsizdir (P>0,05).  
 Rez. zon: Rezerv Zon, Profil. zon: Proliferatif Zon, Tranzis. zon: Tranzisyonel Zon

## Tartışma ve Sonuç

Gerek yedirme denemeleri ve gerekse de saha taramaları sonuçları, yemle alınan aflatoksinlerin önemli bir kısmının kanalı dokularına ve yumurtaya geçtiğini (Ağaçdelen ve Acet 1993, Aldemir 1992, Jacobson ve Wiseman 1974, Trucksess ve ark 1983, Sudhakar 1992, Oliveira ve ark 2000) ve geçiş ora-

nının da 1/2200-1/2500 arasında olduğunu göstermektedir (Hamilton 1982). Tarım, Orman ve Köy İşleri Bakanlığı'nın konuyla ilgili tebliği (1997) ile ülkemizde karma yemlerde bulunmasına izin verilen total aflatoksin düzeyinin 50 mg/kg (50 ppb) yem ve AFB<sub>1</sub> düzeyinin de 20 mg/kg yem (20 ppb) olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, yem hammaddeleri ile yem-



lerde yapılan tarama sonuçları, bu kanuni sınırın sıklıkla aşıldığını göstermektedir. Etçi tavukların yemlerinde yapılan tarama sonuçları (Kaya ve ark 1990, Nizamlioğlu 1996, Oğuz ve Kurtoğlu 2000), AF düzeyinin 5-100 mg/kg yem (5-100 ppb) arasında değiştiğini, çoğunlukta da 50 mg/kg'ın (50 ppb) altında olduğunu göstermektedir. Bakanlığın belirlediği sınır değeri dikkate alınarak, günde 130 gr yem tüketerek gün aşırı yumurtladığı varsayılan bir tavuğun yumurtasında bulunması muhtemel olan AFB<sub>1</sub> miktarının 2.6 ng olduğu hesaplanmıştır (Hamilton 1982, Çelik ve ark 2000a). Yumurtaya geçen aflatoksinlerin büyük çoğunluğunu AFB<sub>1</sub>'in aktif metabolitlerinin oluşturduğu dikkate alındığında, olayın ciddiyeti artmaktadır.

Bu çalışmada, AFB<sub>1</sub> verilen gruplarda rölatif civ-civ ağırlıklarında oluşan düşüşlerin de gösterdiği gibi, ortaya çıkan genel gelişme geriliğinin bir sonucu olarak, iskeletin gelişimi de aksamış ve tibianın ağırlık ve uzunluğunda önemli düşüşler meydana gelmiştir. Tibianın proksimal büyüme plağı üzerinde yapılan histolojik ölçüm sonuçları da, AFB<sub>1</sub> verilen deney gruplarında, hem kemiğin uzamasını sağlayan proliferatif zonun ve hem de hipertrofik zonun daraldığını; aksine, tranzisyonel zonun genişlediğini göstermektedir. Bu histolojik bulgular, özellikle broilerlerde oldukça sık görülen ve önemli ekonomik kayıplara neden olan tibial diskondroplazide (TD) proksimal büyüme plağında oluşan lezyonların histolojik görünümüne oldukça benzemektedir. Hargest ve ark (1985), Rennie ve ark (1993), Farquharson (1999) ile Farquharson ve Jefferies (2000) de, tibianın proksimal büyüme plağında şekillenen TD lezyonunun, tranzisyonel zonu oluşturan prehipertrofik kondrositlerin artışı ile karakterize olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar (Hargest ve ark 1985, Rennie ve ark 1993, Farquharson 1999, Farquharson ve Jefferies 2000), büyüme plağındaki bu olgunlaşmamış kondrosit birikiminin, normal kondrositlerin farklılaşma sürecinde meydana gelen bir aksamadan kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir.

AFB<sub>1</sub>'in tibianın proksimal büyüme plağı ve özellikle buradaki kondrositlerin hücre kinetiği üzerindeki etkileri hakkında yeterli bilgi bulunmamakla birlikte; kuluçkadan çıkıştan sonraki besleme döneminde yemle alınan AF'lerin, kanatlıların kemik gelişimi üzerinde önemli zararlı etkilerinin olduğu bilinmektedir (Farquharson 1999). Düşük dozlarda alınan AFB<sub>1</sub> bile kemiklerin dayanıklılığını azalttığından, etkilenen etçi piliçlerin kemik kırılma riskleri artmaktadır (Maurice ve ark 1983, Wyatt ve Jensen 1990, Farquharson 1999). Bu durum, muhtemelen AFB<sub>1</sub>'in, kemiğin organik matrisini oluşturan proteinlerin sentezini bloke etmesinden kaynaklanmaktadır. Zira, AFB<sub>1</sub>'in neden ol-

duğu karaciğer hasarı ve nükleoproteinler ve nükleik asitlerle hızla tepkimeye girerek protein sentezini bloke ettiği iyi bilinmektedir (Hsieh ve ark 1977, Neldon-Ortiz ve Qureshi 1992). Bu etkisine bağlı olarak kemik dokunun organik matris proteinlerinin ve mineralizasyonu kontrol eden enzimlerin sentezi aksayabilir. Büyüme plağının embriyonik gelişimi üzerinde gözlenen etkisi ise AFB<sub>1</sub> molekülünün, diğer etkileri yanında, plağı oluşturan kondrositlerin diferansiyasyonu üzerindeki zararlı etkilerinden kaynaklanabilir. Nitelikim, daha önce yapılan çalışmalarda, (Çelik ve ark 2000a, Sur ve Çelik 2003) orta dozda AFB<sub>1</sub> verilen yumurtalarda gelişen embriyolarda, blastodermin area pellucidasının dışı doğru fıtıklaşmasıyla karakterize olan bir anomali tespit etmişler ve bunun doğal formdaki AFB<sub>1</sub> molekülünün, embriyonik hücrelerin diferansiyasyonunu bozmasından kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yumurtada bulunan AFB<sub>1</sub>'in, embriyonik dönem ve sonraki gelişme döneminde, çoğalma ve diferansiyasyon olayları ile apoptozisin yoğun bir biçimde gerçekleştiği büyüme plağındaki kondrositlerin diferansiyasyonunu bozması kuvvetle muhtemeldir. Plağı oluşturan kondrositlerin hücre kinetikleri ve buradaki apoptozis üzerinde yapılacak olan ileri çalışmalar, konu üzerinde daha detaylı bilgilerin elde edilmesini sağlayacaktır.

Elde edilen bulgulara dayanılarak; yumurtada embriyotoksik dozların altındaki düzeylerde bulunan AFB<sub>1</sub>'in, diğer etkileri yanında tibianın büyüme plağındaki kondrositlerin diferansiyasyonlarında aksaklıklara yol açabileceği ve bunun sonucunda da kondrosit zonlarının genişliklerinin değiştiği ve bu durumun da gerek embriyonik ve gerekse de kuluçkadan çıkıştan sonraki besleme döneminde iskelet sisteminin gelişimini olumsuz yönde etkileyebileceği sonucuna varılmıştır.

### Kaynaklar

- Ağaçdelen, H.H. ve Acet, H.A. (1993) Aflatoksin B1 ve aflatoksin M1'in yumurtaya geçiş düzeyleri ve atılım sürelerinin tespiti üzerine deneysel araştırmalar, Veterinarium, 4,2, 36-43.
- Aldemir, C. (1992) Aflatoksinlerin yumurta tavuklarının dokularına dağılım düzeyleri ve atılım sürelerinin tespiti üzerine araştırma, Doktora Tezi, S.Ü.Sağlık Bil. Enst., Konya.
- Cilievici, O., Ghidus, I.C.E., Moldovan, A. (1980) The Toxic and Teratogenic effect of aflatoxin B1 on the chick Embryo Development. Morphol Embryol, 4, 309-314.
- Culling, C.F.A., Allison, R.T. and Barr, W.T. (1985) "Hard tissue" in Cellular Pathology Technique:408-430. Butterworths and Co Ltd, London.
- Çelik, I., Oğuz, H., Demet, Ö., Boydak, M., Dönmez, H.H., Sur, E. and Nizamlioğlu, F. (2000a) Embryotoxicity assay of aflatoxin produced by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, Br. Poult. Sci., 41, 401-409.
- Diener, U.L. and Davis, N.D. (1985) Effects of aflatoxin on young

- turkeys and broiler chickens. *Poult. Sci.*, 64, 1678-1684.
- Ellis, J. and Dipaolo, J.A. (1967) Aflatoxin B1 and malformations. *Arch Pathol*, 83, 53-57.
- Erenpreisa, J., Roach, H.I. (1999) Aberration of cell cycle and cell death in normal development of the chick embryo growth plate. *Mech Ageing and Dev.*, 108, 227-238.
- Farquharson, C. (1999) Tibial Dyschondroplasia in Poultry: A Review, The Workshop On Metabolic Disorders in Poultry, 60-65, October 17-21 1999, İzmir.
- Farquharson, C. and Jefferies, D. (2000) Chondrocytes and longitudinal bone growth: The development of tibial dyschondroplasia. *Poult. Sci.*, 79, 994-1004.
- Germiler, J.A. and Goldstein, S.A. (1997) Structure and function of embryonic growth plate in the absence of functioning skeletal muscle. *J. Orth. Res.*, 15, 362-370.
- Hamburger, V. and Hamilton, H.L. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo, *J. Morphol.*, 88, 49-92.
- Hamilton, P.B. (1982) Mycotoxins and farm animals, *Refush Vet*, 39(1-2), 17-45.
- Hargest, T.E., Leach, R.M. and Gay, V. (1985) Avian tibial dyschondroplasia: Ultrastructure. *AJP.*, 119, 2, 175-190.
- Haynes, J.S., Walser, M. M. and Lawler, E.M. (1985) Morphogenesis of fusarium sp-induced tibial dyschondroplasia in chickens. *Vet. Pathol.*, 22:629-636.
- Hsieh D.P.H. Wong Z.A., Wong J.J., Michas C. and Rueber B.H. (1977). *Comparative Metabolism of Aflatoxin in: Mycotoxin in Human and Animal Health*, Pathotox Publ, Inc, Pork Forest South Illinois, pp:37-50.
- Huff, W.E., Doerr, J.A., Hamilton, P.B., Hamann, D.D., Peterson, R.E. and Ciegler, A. (1980). Evaluation of bone strength during aflatoxicosis and ochratoxicosis. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 40, 1, 102-107.
- Jacobson, W.C. and Wiseman, H.G. (1974) The transmission of aflatoxin B1 into eggs, *Poult. Sci.*, 53, 1743-1745.
- Kaya, S., Yavuz, H. ve Akar, F. (1990) Bazı yağlı tohum kısıpelerinde mikotoksin kalıntıları, *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 37, 173-180.
- Kember, N.F., Kirkwood, J.K., Duignan, P.J., Godfrey, D. and Spratt, D.J. (1990) Comparative cell kinetics of avian growth plates, *Res. Vet. Sci.*, 49, 283-288.
- Leach, R.M. and Gay, C.V. (1987) Role of epiphyseal cartilage in endochondral bone formation. *J. Nutr.*, 117, 784-790.
- Leeson, S., Diaz, G. and Summers, J.D. (1995) Aflatoxins, In "Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins", Eds. by S Leeson, JDG Gonzala and JD Summers, Published by: University Books, 249-298, PO Box 1326, Guelph, Ontario, Canada.
- Letemier, C. and Nys, Y. (1992) Composition, cortical structure and mechanical properties of chicken tibiotarsi : effect of growth rate, *Br. Poult. Sci.*, 33, 925-936.
- Maurice, D.V., Bodine, A.B. and Rehrer, N.J. (1983) Metabolic effects of low aflatoxin B1 levels on broiler chicks, *Appl. Env. Microbiol.*, 45, 3, 980-984.
- Mayura, K., Abdel-Wahhab, M.A., McKenzie, K.S., Sarr, A.B., Edwards, J.F., Naguib, K. and Phillips, T.D. (1998) Prevention of maternal and developmental toxicity in rats via dietary inclusion of common aflatoxin sorbents: Potential for hidden risks, *Toxicol. Sci.*, 175-182.
- Neldon-Ortiz D.L. and Qureshi M.A. (1992) The effect of direct and microsomal activated aflatoxin B1 on Chicken peritoneal macrophages in vitro. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 31:61-76.
- Nizamioğlu, F. (1996) Mikotoksin şüphesiyle laboratuara getirilen yem ve yem hammaddelerinde aflatoxin B1, B2, G1 ve G2 araştırılması, *Veterinarium*, 7, 42-45.
- Oğuz, H. (1997) Broiler yemlerine katılan polivinilpolipirolidon (PVPP)'un ve diğer bazı adsorbanlarla karışımlarının aflatoksikozise karşı koruyucu etkinliğinin belirlenmesi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bil. Enst., Konya.
- Oğuz, H. ve Kurtoğlu, V. (2000) Effect of clinoptilolite on performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis, *Br. Poult. Sci.*, 41, 512-517.
- Oğuz, H., Kurtoğlu, V. ve Coşkun, B. (2000b) Preventive efficacy of clinoptilolite in broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) exposure. *Res. Vet. Sci.*, 69, 197-201.
- Oliveira, C.A.F., Kobashigawa, E., Reis, T.A., Mestieri, L., Albuquerque, R. and Corrêa, B. (2000) Aflatoxin B1 residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin, *Food Ad. Cont.*, 17(6), 459-462.
- Olsson, S.E. (1982). Morphology and physiology of the Growth Cartilage under Normal and Pathologic Conditions, *Bone in Clinical Orthopedics*, A study in Comparative Osteology, Chapter 3, 159-195.
- Orth, M.W. (1999) The regulation of growth plate cartilage turnover, *J. Anim. Sci.*, 77, 183-189.
- Rennie, BYJS, Whitehead, C.C. and Thorp, B.H. (1993) The effect of dietary 1,25-dihydroxycholecalciferol in preventing tibial dyschondroplasia in broiler fed on diets imbalanced in calcium and phosphorus. *Br. J. Nutrition.*, 69, 809-816.
- SPSS Base System (1997) Syntax Reference Guide, Release 8.0. Copyright by Spss Inc.
- Stevens, A. (1990) Pigments and minerals, In "The Theory and Practice of Histological Techniques", Eds. By JD Bancroft and A Stevens, 245-267.
- Stevens, A., Lowe, J. and Bancroft, J.D. (1990) Bone, In "The Theory and Practice of Histological Techniques", Eds. By JD Bancroft and A Stevens, 309-341.
- Sudhakar, B.V. (1992) The carry-over effect of aflatoxin B1 on eggs and liver of chicken, *Indian Vet. J.*, 69, 1061-1062.
- Sur, E. (2001) Yumurtaya verilen Aflatoxin B1' in tavukların lenfoid organlarının embriyonal gelişimi üzerindeki etkilerinin enzim histokimyasal yöntemlerle araştırılması, Doktora Tezi, S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Sur, E. ve Çelik, İ. (2003) Effects of aflatoxin B1 on the development of bursa of Fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken, *Br. Poult. Sci.*, 44, 4, 558-565.
- Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı (1997) Aflatoxin kontrolüne dair tebliğ, Resmi Gazete, 16 Kasım 1997 tarihli mükerrer yazı.
- Trucksess, M.W., Stoloff, L., Young, K., Wyatt, R.D. and Miller, B.L. (1983) Aflatoxicol and aflatoxins B1 and M1 in eggs and tissues of laying hens consuming Aflatoxin- contaminated feed. *Poult. Sci.*, 62, 2176-2182.
- Wyatt, C.L. and Jensen, L.S. (1990) Effect of Feeding Isoniazid and Cimetidine on Growth and Bone Development in Male Broiler Chicks, *Poult. Sci.*, 69: 1271-1280.