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

ETLİK DAMIZLIKLARDA YUMURTALARA DEMİR VE ÇİNKO NANO PARTİKÜLLERİNİN İN OVO ENJEKSİYONUNUN EMBRİYONUN METABOLİZMASINA ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jiyan TUNÇ
Danışman: Doç. Dr. Elif BABACANOĞLU ÇAKIR

VAN – 2025

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

ETLİK DAMIZLIKLARDA YUMURTALARA DEMİR VE ÇİNKO NANO PARTİKÜLLERİNİN İN OVO ENJEKSİYONUNUN EMBRİYONUN METABOLİZMASINA ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jiyan TUNÇ

Tez Savunma Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Filiz KARADAŞ (Başkan)

Doç. Dr. Elif BABACANOĞLU ÇAKIR (Danışman)

Prof. Dr. Umut Sami YAMAK (Üye)

Bu çalışma Van YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 10706 No'lu proje ile desteklenmiştir.

VAN – 2025

KABUL VE ONAY SAYFASI

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Elif BABACANOĞLU ÇAKIR danışmanlığında, Jiyan TUNÇ tarafından sunulan "Etlik Damızlıklarda Yumurtalara Demir ve Çinko Nano Partiküllerinin İn Ovo Enjeksiyonunun Embriyonun Metabolizmasına Etkisi" başlıklı bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 16 /05 /2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Filiz KARADAŞ İmza:

Üye: Prof. Dr. Umut Sami YAMAK İmza:

Üye: Doç. Dr. Elif BABACANOĞLU ÇAKIR İmza:

Üye: İmza:

Üye: İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun …. /.... /…... tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza

……

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

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

İmza

Jiyan TUNÇ

ÖZET

ETLİK DAMIZLIKLARDA YUMURTALARA DEMİR VE ÇİNKO NANO PARTİKÜLLERİNİN İN OVO ENJEKSİYONUNUN EMBRİYONUN METABOLİZMASINA ETKİSİ

TUNÇ, Jiyan
Yüksek Lisans Tezi, Zootekni Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Elif BABACANOĞLU ÇAKIR
Temmuz 2025, 155 sayfa

Bu çalışmada farklı embriyonik keselere in ovo (İO) enjeksiyon yöntemi ile L-arjinin kaynaklı demir (Fe) ve çinko (Zn) mineralleri ile bu iki mineralin kombinasyonuna ait nano partiküllerin enjeksiyonunun embriyo/civciv gelişimi, karaciğer dokusunda transferrin reseptör (TFRC) ve metallothionein (MT) genlerin mRNA gen ekspresyon ve glikojen düzeyleri, kemik gelişimi ve mineralizasyonu, vücut bileşimi, kalıntı sarı kese bileşimi ve kan serumu Fe ve Zn düzeyleri üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Deneme materyalini ROSS 308 genotipine ait 1200 adet kuluçkalık yumurtalarda gelişen embriyolara enjeksiyon yapılmayan grup (K) ve kuluçkanın 14.5'uncu gününde sarı keseye ve 17.5'uncu gününde amniyon keseye 80 µg düzeyinde organik nano Fe (Fe_1, Fe_2) ve Zn (Zn_1, Zn_2) mineralleri ile bu iki mineralin kombinasyonuna ($FeZn_1$, $FeZn_2$) ait gruplar deneme desenini oluşturmuştur. Embriyonik yaşın 16 ve 19'uncu günlerinde embriyo gelişimi etkilenmezken, Fe_1 grubunda göğüs kası ağırlığı (P=0.06) ve Zn_2 grubunda karaciğer ve kalp ağırlıkları (P=0.01) artmıştır. Çıkışta civciv gelişimi, kemik gelişimi ve bileşimi ile kemik mineralizasyonu üzerine nano organik mineral enjeksiyonunun etkisi önemsizken, sağ tibia çapı K grubuna göre Fe_1 grubunda önemli düzeyde daha yüksek, Fe_2 grubunda ise daha düşük saptanmıştır (P=0.02). Çıkışta K grubuna göre Zn_1 grubunda tüm vücut KM içeriği daha düşük ve HK içeriği daha yüksek (P=0.03), sarı kese HY içeriği Fe_2 grubunda daha düşük (P=0.04), sarı kese Fe düzeyi Fe_1 grubunda daha düşük (P=0.04) ve serum Fe düzeyi Fe_1 ve Fe_2 gruplarında daha yüksek (P=0.06) saptanmuştır. Tüm Zn enjekte edilen gruplarda karaciğer MT mRNA gen ekspresyonu ve Fe enjekte edilen gruplarda ise karaciğer TFRC mRNA gen ekspresyon düzeyi artmıştır (P<0.01). Günlük yaştaki etlik civcivlerin karaciğer glikojen düzeyi nano minarel enjeksiyon gruplarında K grubuna göre önemli düzeyde artmıştır (P<0.01).

Anahtar kelimeler: Embryo, Etlik civciv, Fe, İn ovo enjeksiyon, Mineral metabolizması, MT, Nano partikül, Organik mineral, TFRC, Zn

ABSTRACT

THE EFFECT OF IN OVO INJECTION NANO PARTICULUS IRON AND ZINC INTO EGGS OF BROILER BREEDERS ON EMBRYO METABOLISM

TUNÇ, Jiyan
M.Sc. Thesis, Department of Animal Science
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Elif BABACANOĞLU ÇAKIR
July 2025, 155 pages

The aim of this study was to investigate the effects of in ovo (IO) injection of L-arginine-derived iron (Fe) and zinc (Zn) minerals and nanoparticles of the combination of these two minerals into different embryonic sacs on embryo/chick development, mRNA gene expression and glycogen levels of transferrin receptor (TFRC) and metallothionein (MT) genes in liver tissue, bone development and mineralization, body composition, residual yolk sac composition and blood serum Fe and Zn levels. The experimental material consisted of the experimental design consisting of the group in which embryos developing in 1200 hatching eggs of the ROSS 308 genotype were not injected (C) and the groups in which 80 µg of organic nano Fe (Fe_1, Fe_2) and Zn (Zn_1, Zn_2) minerals were injected into the yolk sac on the 14.5th day of incubation and into the amniotic sac on the 17.5th day of incubation, and the combination of these two minerals ($FeZn_1$, $FeZn_2$). While embryo development was not affected on days 16 and 19 of embryonic age, breast muscle weight increased in the Fe_1 group (P=0.06) and liver and heart weights increased in the Zn_2 group (P=0.01). While the effect of nano organic mineral injection on chick development, bone development and composition and bone mineralization at hatching was insignificant, the right tibia diameter was significantly higher in the Fe_1 group and lower in the Fe_2 group compared to the C group (P=0.02). At hatching, whole body DM content was lower and HK content was higher in the Zn_1 group compared to the C group (P=0.03), yolk sac HY content was lower in the Fe_2 group (P=0.04), yolk sac Fe level was lower in the Fe_1 group (P=0.04) and serum Fe level was higher in the Fe_1 and Fe_2 groups (P=0.06). Liver MT mRNA gene expression increased in all Zn injected groups and liver TFRC mRNA gene expression increased in Fe injected groups (P<0.01). Liver glycogen level of day-old broiler chickens increased significantly in nano mineral injection groups compared to C group (P<0.01).

Keywords: Broiler breeders egg, Broiler chicks, Embriyo mineral metabolism, Fe, In ovo injection, Nano particulus, Organic nano particulus, Zn

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında, her türlü ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Elif BABACANOĞLU ÇAKIR'a çok teşekkür ederim. Ayrıca denemede kullanılan nano partiküllerin sentez ve karaterizasyon aşamalarının tamamlanması için her türlü desteği sunan Sayın Prof. Dr. Mehmet GÜLCAN'a ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yaşar KARATAŞ'a, ELİSA analizi için yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Ahmet Ufuk KÖMÜROĞLU'na çok teşekkür ederim.

Ayrıca tez savunma jürisinde yer alan Sayın Prof. Dr. Filiz KARADAŞ ve Prof. Dr. Umut Sami YAMAK'a bu tezin son halinin verilmesinde sunmuş oldukları değerli katkı ve önerilerinden dolayı teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca bana cesaret veren değerli ailem ve süreç boyunca beni özleyip, bekleyen sevgili yeğenlerim Sırac Talha KORKMAZ ve Hatice Kübra KORKMAZ'a çok teşekkür ederim.

Sevgileri, ilgileri ve destekleriyle yanımda olan kıymetli arkadaşlarım Gülüstan ÖZTUNÇ ve Maşallah ÖZTUNÇ, süreçte her zaman yanımda olan Seyitnur ARVASİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Analiz aşamalarında yardımlarıyla yanımda olan değerli arkadaşlarım İbrahim IŞIK ve Adike BİNGÖL ve Zootekni Bölümü öğrencilerine çok teşekkür ederim.

Bu tez projesine finansal destek sağlayan Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (BAP) teşekkür ederim.

2025

Jiyan TUNÇ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i
ABSTRACT iii
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vii
ÇİZELGELER LİSTESİ xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR xxi
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ 7
2.1 Nanoteknoloji 7
2.1.1 Nanoteknoloji Uygulama Alanları 7
2.1.1.1 Çevre ve Enerji 7
2.1.1.2 Tıp ve Sağlık 8
2.1.1.3 Biyoteknoloji 8
2.1.1.4 Savunma Sanayi 8
2.1.1.5 Tarım 8
2.1.1.6 Hayvan Yetiştirme ve Besleme 8
2.1.1.7 Kanatlı Hayvan Yetiştirmede Nanoteknoloji 9
2.1.2 Nano Malzeme Çeşitleri 9
2.1.2.1 Organik Nanopartiküller 9
2.1.2.2 Metal ve Metal Oksit İçeren İnorganik Nano Malzemeler 9
2.1.2.3 Karbon Bazlı 10
2.1.3 Nano Partiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu 10
2.2 İn Ovo Enjeksiyon Yöntemi 10
2.3 Mineral Maddeler 11
2.3.1 Yumurtadaki Mineraller 11
2.3.2 Yumurta Sarısı Mineralleri 13
2.3.3 Yumurta Albümini Mineralleri 14
2.3.4 Yumurta Kabuğunun Yapısı ve Kabuk Mineralleri 14
2.3.5 Yumurta Kabuk Zarı ve Kabuk Zarı Mineralleri 15
2.3.6 Mineral Madde Formları 15
2.3.7 Mineraller Arası Etkileşimler 16
2.4 Embriyonun Mineral Metabolizması 17
2.5 Demir (Fe) 18
2.5.1 Demir ve Gen İlişkisi 19
2.5.1.1 Demir Metabolizmasında Görevli Genler 19

2.5.1.2 Demir Metabolizmasıyla İlişkili Hepatik Genler 20
2.5.1.2.1 Hepatik Demir Genleri ve İşlevleri 20
2.5.1.2.2 Demir ve TFRC İlişkisi 20
2.5.2 Demir Bileşikleri Formül ve Sembolleri 21
2.5.2.1 İnorganik Fe Bileşikleri 21
2.5.2.1.1 Oksit ve Hidroksitler 21
2.5.2.1.2 Tuz Bileşenleri 21
2.5.2.2 Organik Fe Bileşikleri 22
2.5.3 Demirin Biyolojik Önemi ve Etkileri 22
2.5.3.1 Büyüme ve Gelişme Üzerindeki Önemi ve Etkileri 22
2.5.3.1.1 Embriyo Gelişimi Üzerindeki Etkileri ve Önemi 23
2.5.3.2 Metabolizma Üzerindeki Önemi ve Etkileri 23
2.5.3.3 Demir (Fe) Enzimler Üzerindeki Önemi ve Etkileri 23
2.5.3.4 Demir (Fe) Diğer Önemli Etkileri 23
2.6 Etlik Piliçlerde Fe Uygulamaları 24
2.6.1 Rasyonda Fe Uygulamaları 24
2.6.1.1 Etlik Piliç Rasyonlarında Fe Uygulamları 24
2.6.1.2 Diğer Kanatlı Türlerinde Rasyon Fe Uygulamaları 25
2.6.1.3 Etlik Piliçlerde İn Ovo Yöntem Fe Uygulamaları 25
2.6.1.4 Diğer Kanatlı Türlerinde İn Ovo Yöntem ve Uygulamaları 26
2.6.1.5 Kanatlı Hayvanlarda Diğer Fe Uygulamaları 27
2.7 Çinko (Zn) 27
2.7.1 Çinko ve Gen İlişkisi 28
2.7.1.1 Embriyo Metabolizmasıyla İlişkili Hepatik Genler 28
2.7.1.1.1 Hepatik Zn Genleri ve İşlevleri 28
2.7.1.1.2 Çinko ve Metallotionein (MT) Gen İlişkisi 29
2.7.2 Çinko Bileşikleri, Formül ve Sembolleri 29
2.7.2.1 İnorganik Zn Bileşikleri 29
2.7.2.2 Organik Zn Bileşikleri 30
2.7.3 Çinkonun Biyolojik Önemi ve Etkileri 30
2.7.4 Çinko Enzimleri ve Görevleri 30
2.7.5 Kanatlı Embriyosu Üzerinde Zn Mineralinin Etkileri 30
2.7.6 Etlik Piliçlerde Zn Uygulamaları 31
2.7.6.1 Etlik Piliç Rasyonlarında Zn Uygulamaları 31
2.7.6.2 Diğer Kanatlı Türlerinde Rasyon Zn Uygulamları 32
2.7.6.3 İn Ovo Yöntem Zn Uygulamaları 33
2.7.6.4 Diğer Kanatlı Türlerinde İOE Zn Uygulamaları 34
2.7.6.5 Kanatlı Hayvanlarda Diğer Zn Uygulamaları 35
2.8 L-Arjinin 35
2.9 Organik Minerallerin Kimyasal Sentezi 36

3. MATERAL VE YÖNTEM 37
3.1 Deneme Materyalleri 37
3.1.1 Yumurta Materyalleri 37
3.1.2 Yumurta Bileşimi ve Mineral Madde Düzeyleri 37
3.2 Embriyo ve Civciv Materyali 38
3.2.1 Kuluçka Makinesi 38
3.2.2 Deneme Boyunca Kullanılan Cihazlar 40
3.2.3 Kimyasal Materyaller 40
3.2.3.1 Nano Partikül Mineral Hazırlama Aşaması ve Kullanılan Kimyasallar 40
3.2.3.1.1 L-Arjinin 40
3.2.3.1.2 Nano Partikül Hazırlama Aşaması 41
3.3 Yöntem 43
3.3.1 Deneme Deseni 43
3.3.1.1 Deneme Deseni Grupları 45
3.3.2 Ölçülen Özellikler 46
3.3.2.1 Yumurta Kalite Özellikleri 46
3.3.2.2 Şekil İndeksi 46
3.3.2.3 Kabuk Geçirgenliği 47
3.3.2.4 Yumurta Por Sayısı 47
3.3.2.5 Embriyo, Sarı Kese ve Organ Ağırlıkları 48
3.3.2.6 Kuluçka Sonuçları 49
3.3.2.7 Rektal Sıcaklık Ölçümü 49
3.3.2.8 Tibia ve Femur Kemiklerinin Ölçümleri 49
3.3.2.9 Kan Örneklerinin Alınması 50
3.3.2.10 Tüm Vücut Bileşenlerine Ait Analizler 51
3.3.2.10.1 Kuru Madde Analizi 51
3.3.2.10.2 Ham Kül Analizi 52
3.3.2.10.3 Ham Yağ Analizi 52
3.3.2.11 Mineral Analizi 53
3.3.2.12 Glikojen Analizi ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi ve Ekstraksiyon Yöntemi 54
3.3.2.12.1 Ekstraksiyon 54
3.3.2.12.2 Karaciğer Glikojen Analizi 54
3.3.2.12.3 ELISA Kit Prosedürü Aşamaları 55
3.3.3 İn Ovo Yöntemi 58
3.4 Demir (Fe) ve Çinko (Zn) Minerallerinin Nano Partiküllerin Malzeme Karakterizasyonlarında Kullanılan Materyaller 58
3.5 SEM (Scanning Electron Microscope) Analizleri 59
3.6 Scanning Electron Microscope (SEM) Analizi 60

3.6.1 Organik nano Fe SEM Analizleri 61
3.6.2 Organik nano Zn SEM Analizleri 62
3.6.3 Organik nano Fe+Zn SEM Analizleri 63
3.7 UV-vis (Ultraviyole ve Görünür Bölge Spektroskopisi) Analizi 64
3.8 FT-IR (Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi) Analizi 67
3.9 Gen Ekspresyon Analizi Çalışması 69
3.9.1 RNA İzolasyonu 69
3.9.2 Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit (cDNA) Eldesi 70
3.9.3 Gen Ekspresyon Analizi 71
3.10 İstatistik Analiz 74
4. BULGULAR 75
4.1 Yumurta Ağırlık, Embriyo Uzunluğu, Embriyo Vücut Kitle İndeksi (VKİ) ve Embriyo Organ Ağırlıkları 75
4.1.1 Kuluçkanın 16. Gününe Ait Veriler 75
4.1.2 Kuluçkanın 19. Gününe Ait Veriler 79
4.1.3 Çıkış Gününe (21. Gün) Ait Veriler 83
4.2 Günlük Yaştaki Civcivlerin Tüm Vücut, Kalıntı Sarı Kese ve Kemik Bileşimi 88
4.2.1 Tüm Vücut Bileşimi 88
4.2.2 Kalıntı Sarı Kese Bileşimi 90
4.2.3 Tibia Kemiklerinin Bileşimi 92
4.3 Günlük Yaştaki Civcivlerin Tibia ve Femur Kemiklerinin Gelişimi 93
4.3.1 Tibia ve Femur Kemiklerinin Sağ ve Sol Kemik Ağırlık Ölçümleri 93
4.3.2 Tibia ve Femur Kemiklerinin Sağ ve Sol Uzunluk Ölçümleri 94
4.3.3 Tibia ve Femur Kemiklerinin Ayrı Ayrı Sağ ve Sol Çap Ölçümleri 95
4.4 Günlük Yaştaki Civcivlerin Sarı Kese Kalıntı, Plazma Serum ve Tibia Kemiklerinin Mineral Düzeyleri 97
4.4.1 Kalıntı Sarı Kese Fe ve Zn Mineral Düzeyleri 97
4.4.2 Plazma serum Fe ve Zn Mineral Düzeyleri 98
4.4.3 Tibia Kemiklerinin Ca ve P Mineral Düzeyleri 99
4.5 Günlük Yaştaki Civcivlerin Karaciğer Dokusunda Glikojen Düzeyleri 100
4.6 Gen Ekspresyon Analiz Sonuçları 101
4.7 Kuluçka Sonuçları 109
5. TARTIŞMA 111
5.1 Embriyo ve Civciv Gelişimi 111
5.2 Kuluçka Sonuçları 112
5.3 Organ Gelişimi 114
5.4 Tüm Vücut, Sarı Kese ve Kemik Bileşimi 118
5.5 Kemik Gelişimi 123

5.6 Sarı Kese, Kemik ve Plazma Mineral Düzeyleri 124
5.7 Karaciğer Glikojen Düzeyi 126
5.8 MT ve TFRC Gen Ekspresyonu 128
6. SONUÇ 135
KAYNAKLAR 137
ÖZ GEÇMİŞ 155

ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Yumurtada ak ve sarıdaki mineraller (Burley ve Vahedra, 1989) 12
Çizelge 2.2 Yumurta sarısı mineral madde düzeyleri (Angel, 2007) 13
Çizelge 2.3 Yumurta albümini mineral madde düzeyleri (Angel, 2007) 14
Çizelge 2.4 Yumurta kabuğu mineral madde düzeyleri (Yair ve Uni, 2011)..... 15
Çizelge 2.5 Mineral Sinerjizmi (Watts, 1990)..... 17
Çizelge 3.1 Kuluçkalanacak yumurtaların bileşimi ve mineral madde düzeyi 37
Çizelge 3.2 Kuluçka döenmi süresice kuluçkahaneye ait oransal nem, sıcaklık ve basınç değerlerine ait ortalamalar……..……38
Çizelge 3.3 Kuluçka süresince kuluçka makinesinin oransal nem, sıcaklık ve basıncının ortalama değerleri……..…..39
Çizelge 3.4 İn ovo enjeksiyonu doz ve solüsyonları……..….45
Çizelge 3.5 Gruplarda tekerrür durumları……...……45
Çizelge 3.6 Yumurta kalite özellikleri sonuçları…….48
Çizelge 3.7 Çalışmada kullanılan primeler ve özellikleri……..….71
Çizelge 4.1 Organik nano Fe ve Zn partiküllerinin in ovo enjeksiyonunun kuluçkanın 16. gününde yumurta ve embriyo ağırlığı, embriyo uzunluğu (cm), embriyo vücut kitle indeksi (g/cm^2) ve embriyo organ ağırlıklarına ait ortalama değerler (g) ve standart hatalar 77
Çizelge 4.2 Organik nano Fe ve Zn partiküllerinin in ovo enjeksiyonunun kuluçkanın 16. gününde embriyo ağırlığı, embriyo uzunluğu ve organların oransal (%) ağırlıklarına ait ortalama değerler ve standart hataları 78
Çizelge 4.3 Organik nano Fe ve Zn partiküllerinin in ovo enjeksiyonunun kuluçkanın 19. gününde yumurta ve embriyo ağırlığı, embriyo uzunluğu (cm), embriyo vücut kitle indeksi (g/cm^2) ve embriyo organ ağırlıklarına ait ortalama değerler (g) ve standart hatalar 80
Çizelge 4.4 Organik nano Fe ve Zn partiküllerinin in ovo enjeksiyonunun kuluçkanın 19. gününde embriyo ağırlığı, embriyo uzunluğu ve organların oransal (%) ağırlıklarına ait ortalama değerler ve standart hataları 82

Çizelge 4.5 Organik nano Fe ve Zn partiküllerinin in ovo enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin civciv ağırlığı, civciv uzunluğu (cm), civciv vücut kitle indeksine (g/cm^2) ait ortalama değerler (g) ve standart hataları 84
Çizelge 4.6 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin kalıntı sarı kese ve civciv organ ağırlıklarına ait ortalama değerler (g) ve standart hataları 85
Çizelge 4.7 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerde organların oransal (%) ağırlıklarına ait ortalama değerler ve standart hataları..... 87
Çizelge 4.8 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin vücut bileşiminde kuru madde, ham yağ ve ham kül içeriğine ait ortalama değerleri (%) ve standart hatalar..... 89
Çizelge 4.9 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin sarı kese bileşiminde kuru madde, ham yağ ve ham kül içeriğine ait ortalama değerler (%) ve standart hatalar..... 91
Çizelge 4.10 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin tibia kemik bileşiminde kuru madde ve ham kül düzeyine ait ortalama değerler (%) ve standart hatalar 92
Çizelge 4.11 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin sağ tibia, sağ femur ve sol tibia, sol femur kemik ağırlıklarına (mg) ait ortalama değerler ve standart hatalar..... 93
Çizelge 4.12 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin sağ tibia, sağ femur ve sol tibia, sol femur kemiklerinde uzunluk ölçümlerine (mm) ait ortalama değerleri ve standart hatalar 94
Çizelge 4.13 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin sağ tibia, sağ femur ve sol tibia, sol femur kemiklerinde çap ölçümlerine (mm) ait ortalama değerleri ve standart hatalar 96

Çizelge 4.14 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin kalıntı sarı kesesinde Fe (ppm) ve Zn (ppm) mineral düzeylerine ait ortalama değerler ve standart hatalar 97
Çizelge 4.15 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin plazma serumunda Fe (ppm) ve Zn (ppm) düzeylerine ait ortalama değerler ve standart hatalar 98
Çizelge 4.16 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin tibia kemiklerinde Ca (ppm) ve P (ppm) mineral düzeylerine ait ortalama değerler ve standart hatalar 99
Çizelge 4.17 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun etlik civcivlerin döllü yumurta, çıkış gücü ve kuluçka randımanına (%) ait ortalama değerler ve standart hatalar……..….109
Çizelge 4.18 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun etlik embriyoların erken ölüm, geç ölüm, orta ölüm, kabuk altı ölüm ve toplam ölüm (%) ait ortalama değerler ve standart hatalar……..110

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 Mineraller arasında gerçekleşen antagonizma ve sinerjizm ilişkisine ait mineral ağının gösterimi (Watts, 1990). 17
Şekil 2.2 Ferrik oksit (Fe_2O_3) sembolü 21
Şekil 2.3 Ferröz klorür ($FeCl_2$) sembolü 21
Şekil 2.4 Hemin (Fe^{3+}-hem) 22
Şekil 2.5 Çinko sülfat bileşiğinin kimyasal yapısı……..…29
Şekil 2.6 Çinko metiyonin kimyasal yapısı (National Medicine Of Library, 2025)..…30
Şekil 2.7 L-Arjinin kimyasal yapısı…….35
Şekil 3.1 İron (II) sulfate heptahydrate çözdürme aşaması 41
Şekil 3.2 L-Arjinin eklendikten sonra Nano Fe için reflux işleminin gerçekleştirilmesi41
Şekil 3.3 Nano Zn için reflux işlemi 42
Şekil 3.4 Nano Fe+Zn sentez aşaması 43
Şekil 3.5 Nano Fe, Zn, Fe+Zn solüsyonları ve saf su 43
Şekil 3.6 Tibia ve femur ölçümleri 50
Şekil 3.7 Ölçümü yapılan kemiklerin saklama işlemi 50
Şekil 3.8 Stop solüsyon öncesinde gerçekleştirilen işlemlerin ardından plaka renk değişimi 56
Şekil 3.9 Stop solüsyon eklendikten sonra plakada meydana gelen renk değişimi..... 56
Şekil 3.10 ELISA cihazı okuma bölmesi 57
Şekil 3.11 ELISA okuma cihazı 57
Şekil 3.12 Heidolph buharlaştırma cihazı 58
Şekil 3.13 Kurutma işlemi sonrası nano Fe, Zn ve Fe+Zn minerallerine ait görüntü 59
Şekil 3.14 Kaplama ünitesi 59
Şekil 3.15 SEM (Scanning Electron Microscope) analiz bölümü 60
Şekil 3.16 L-Arjinin farklı ölçeklerde SEM görüntüleri 61
Şekil 3.17 L-Arjinin yüzeyinde Fe nano partiküllerine ait farklı ölçeklerde SEM görüntüleri 62
Şekil 3.18 L-Arjinin yüzeyinde Zn nano partiküllerine ait farklı ölçeklerde SEM görüntüleri 63

Şekil 3.19 L-Arjinin yüzeyinde Fe+Zn nano partiküllerine ait farklı ölçeklerde SEM görüntüleri 64
Şekil 3.20 UV-vis analizi 65
Şekil 3.21 Organik nano Fe mineralinin UV-Vis spektrumu 66
Şekil 3.22 Organik nano Zn mineralinin UV-Vis spektrumu 66
Şekil 3.23 Organik nano Fe+Zn mineralinin UV-Vis spektrumu 67
Şekil 3.24 FT-IR analizi 67
Şekil 3.25 Organik nano Fe Mineralinin FT-IR Spektrumu 68
Şekil 3.26 Organik nano Zn Mineralinin FT-IR Analiz Spektrumu 68
Şekil 3.27 Organik nano Zn Mineralinin FT-IR Analiz Spektrumu 69
Şekil 3.28 Doku parçalama aşamasına ait görüntüler 70
Şekil 3.29 Doku parçalama aşamasına ait görüntüler 70
Şekil 3.30 cDNA aşamasında örneklerin hazırlanma sürecine ait görüntüler 71
Şekil 3.31 Real-Time PCR protokol aşamaları 72
Şekil 3.32 Real-Time PCR protokol aşamaları 72
Şekil 3.33 Real-Time PCR aşamasında örneklerin hazırlanması ve yüklemesine ait görüntüle 73
Şekil 3.34 Referans gen stabilite testi sonucu 73
Şekil 4.1 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin karaciğer glikojen konsantrasyonu düzeyine ait ortalama değerler ve standart hatalar 100
Şekil 4.2 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin karaciğer glikojen konsantrasyonu düzeyi ve cinsiyet arasındaki interaksiyon etkisin ait ortalama değerler ve standart hatalar 101
Şekil 4.3 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin karaciğer dokusunda saptanan MT ve TFRC genleri için referans gen olarak kullanılan β-aktin genine ait Real-Time PCR görüntüsü 102
Şekil 4.4 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin karaciğer dokusunda saptanan MT genine ait Real-Time PCR görüntüsü 103

Şekil 4.5 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin karaciğer dokusunda saptanan TFRC genine ait Real-Time PCR görüntüsü 104
Şekil 4.6 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin karaciğer dokusunda MT mRNA gen ekspresyon düzeyine ait ortalama değerler ve standart hatalar 105
Şekil 4.7 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin karaciğer dokusunda TFRC mRNA gen ekspresyon düzeyine ait ortalama değerler ve standart hatalar 106
Şekil 4.8 Hiyerarşik kümeleme (heatmap) grafiği..... 107
Şekil 4.9 Hedef gen bazlı heatmap (ısı haritası) grafiği 108

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamalarıyla aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
ALP	Alkalen fosvataz
$C_{10}H_{20}N_2O_4S_2Zn$	Çinko metiyonin
$C_6H_{14}N_4O_2$	L-Arjinin
$C_6H_9FeO_6$	Demir asetat
Ca	Kalsiyum
$CaCO_3$	Kalsiyum karbonat
Cd	Kadmiyum
Cm	Santimetre
Co	Kobalt
CP	Seruloplazmin
Cr	Krom
Cu	Bakır
CVD	Kimyasal buhar biriktirme
DMT1	İki değerlikli metal taşıyıcı 1
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fe	Demir
Fe $(C_5H_5)_2$	Ferrosen
$Fe(NO_3)_3$	Demir nitrat
$Fe(OH)_2$	Demir (II) hidroksit
$Fe(OH)_3$	Demir (III) oksit hidroksit
Fe_2O_3	Demir (III) oksit
Fe^{3+}-hem	Hemin
Fe_3O_4	Demir (II,III) oksit
$FeCl_2$	Ferröz klorür
$FeCl_2$	Ferröz klorür

Simgeler	Açıklama
$FeCl_3$	Ferrik klorür
FeH_2O_2	Demir hidroksit
FeO	Ferröz oksit
$FeS \cdot Fe_2S_3$	Demir sülfür
$FeSO_4$	Demir sülfat
$FeSO_4$	Ferröz sülfat
FPN1	Ferroportin
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HAMP	Hepsidin
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
Hemoksijenaz	HMOX
Hg	Gümüş
HIF	Hipoksi-indüklenebilir faktör
HNO_3	Nitrik asit
I	İyot
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
IL2	İnterlökin
IO	In ovo
IOE	In ovo enjeksiyon
IU/KG	Kilogram başına uluslararası birim
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
Mg	Magnezyum.
Mg	Miligram
Ml	Mililitre
Mn	Mangan
MnSOD	Mangan süperoksit dismutaz
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MT	Metallothionein
Ni	Nikel
P	Fosfor

Simgeler	Açıklama
Pb	Kurşun
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
Se	Selenyum
SEM	Scanning Electron Microscope
SOD	Süperoksit dismutaz
SOD1	Süperoksit dismutaz
Sr	Stronsiyum
T3	Triyodotironin
TAC	Toplam antioksidan kapasite
TF	Transferin
TfR1	Transferin reseptörü 1
TFRC	Transferin reseptörü
TiO_2	Titanyum dioksit
TLR	Toll benzeri reseptör
UV-vis	Ultraviyole ve görünür bölge spektroskopisi
VKİ	Vücut kitle indeksi
XPS	X-Işını Fotoelektron Spektrometresi
Zn	Çinko
Zn_2SiO_4	Çinko silikat
$Zn_3(PO_4)_2$	Çinko fosfat
$ZnCl_2$	Çinko klorür
$ZnCl_2$	Çinko klorür
$ZnCO_3$	Çinko karbonat
ZnO	Çinko oksit
ZnO	Çinko oksit
ZnS	Çinko sülfür
$ZnSO_4$	Çinko sülfat
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
^oC	Santigrat derece

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji yüzey işlevselliği ve boyutları farklı olan nano form boyutları 1-100 nm aralığındaki parçacıkları ifade eden teknolojiye dayalı bir bilim dalıdır (McNeil, 2005). Dünyada önemli bir kullanım alanına sahip olan nanoteknoloji yapılan pek çok çalışma sonucu ile önemini ortaya koymaktadır. Nanoteknolojiden ilk olarak 1970 yılında söz edilmiş olup, günümüzde nanoteknolojinin gelişmesi ile birlikte nano partiküller sağlık, kimya, biyoloji ve tarım alanlarında kullanılmakta olup, hayvancılık alanında nano partikül kullanımı da giderek artmaktadır (Basak vd., 2021). Başta mineral maddeler olmak üzere diğer biyo-aktif maddelerin nano partikül şeklinde hayvanlar üzerindeki uygulamalarına ait sonuçlar incelendiğinde nanoteknolojinin önemi daha fazla ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda minerallerin nano partikül şeklinde uygulanmasının hayvan besleme alanındaki kullanımı ele alındığında nano partikül minerallerin biyolojik değerliliğinin daha fazla arttığı ve toksik etkilerinin azaldğı yönünde sonuçlar bildirilmektedir (Nechitailo vd., 2025).

Kanatlı hayvan biliminde biyo-aktif maddelerin nano partikül şeklinde kullanımının yaygınlaşması ve bu kullanımın in ovo enjeksiyon yöntemi ile birlikte uygulanması dikkat çekmektedir. Özellikle yumurtadaki maternal kökenli maddeler içerisinde yer alan mineral maddelerin bazı araştırmalarda nano partikül şeklinde kullanımlarına ait aşağıda birkaç örnek verilmiştir. Nano kalsiyum karbonat ($CaCO_3$) (Matuszewski vd., 2021), nano demir (Fe) (Saki vd., 2014), nano çinko (Zn) ve nano bakır (Cu) (Joshua vd., 2016; Hassan vd., 2020), nano çinko oksit (ZnO) (Jose vd., 2018) partiküllerinin yer aldığı uygulamalar embriyo gelişim döneminde embriyonun fizyolojisi ve metabolizması ile ilişkili pek çok özellik açısından sonuçlanan nano minerallere dair çalışmaları oluşturmaktadır.

Biyo-aktif maddeler içerisinde yumurtadaki mineral maddelerin nano form olarak uygulamalarda yer almaları bazı spesifik minerallerin embriyo gelişimi, ile birlikte birçok fizyolojik ve metabolik olaylar üzerinde önemli etkileri olduğunu ortaya koymaktadır. Bu mineral maddeler içerisinde özellikle Fe ve Zn'nin embriyonun büyüme ve gelişmesini etkileyen birçok metabolik olayı nasıl aktive ettiği ve embriyonun farklı gelişim dönemlerinde ihtiyaç duyduğu zamanlarda bu mineralleri ne düzeyde kullandığı incelenmesi gereken konular arasında göze çarpmaktadır.

Biyo-aktif maddeler içerisinde yumurtadaki mineral maddelerin nano form olarak uygulamalarda yer almaları bazı spesifik minerallerin embriyo gelişimi, ile birlikte birçok fizyolojik ve metabolik olaylar üzerinde önemli etkileri olduğunu ortaya koymaktadır. Bu mineral maddeler içerisinde özellikle Fe ve Zn'nin embriyonun büyüme ve gelişmesini

etkileyen birçok metabolik olayı nasıl aktive ettiği ve embriyonun farklı gelişim dönemlerinde ihtiyaç duyduğu zamanlarda bu mineralleri ne düzeyde kullandığı incelenmesi gereken konular arasında göze çarpmaktadır.

Maternal kökenli minerallerin embriyo tarafından kullanımlarını arttırmanın en etkili yolu maternal beslemeye kıyasla in ovo enjeksiyon yöntemidir. İn ovo enjeksiyon yöntemi, embriyo gelişiminin farklı dönemlerinde uygulama, besleme ve aşılama gibi birçok amaç için kullanılan enjeksiyona dayalı biyoteknolojik bir uygulama olarak tanımlanmaktadır (Peebles, 2018; Babacanoğlu ve Cellak, 2019). Rasyon ilavesi olarak kullanılan mineral maddelerin maternal etkileri yetersiz olduğundan ve doz kaynaklı etkilerinden dolayı alternatif bir yöntem olması, in ovo yöntemin maternal beslemeye göre daha hızlı ve daha etkin bir uygulama olması, embriyonun geç gelişim döneminde etkin mineral madde kullanımı sağlaması ve in ovo biyo-aktif maddelerin enjeksiyonu embriyo gelişimi ile ilişkili olan fizyolojik özellikler üzerinde önemli etkilerin bulunması bu yöntemi daha etkin kılmaktadır.

Embriyo yumurtada bulunan mineralleri farklı embriyonik gelişim dönemlerinde ihtiyaç duyduğu zamanlarda kullanmaktadır (Richards, 1997; Babacanoğlu, 2010; Babacanoğlu ve Yalçın, 2014). Temelde mineral maddeler damızlık tarafından yumurtaya aktarılmaktadır, ancak bu aktarım çeşitli nedenlerden dolayı yetersiz kalabilmektedir. Bu nedenlerden biri embriyo gelişimi sırasında kuluçkanın ikinci periyoduna kadar embriyonun mineral madde kullanımının maksimum düzeyde olmasıdır. Kuluçkanın bu periyoduna kadar anneden yumurtaya aktarılan mineral maddelerin düzeyi embriyonun oluşumu ve gelişimi için yeterli olmaktadır (Richards, 1997; Yair ve Uni, 2011). Ancak, kuluçkanın ikinci döneminden çıkışa kadar yumurtanın mineral madde düzeyi önemli ölçüde gerilemektedir (Babacanoğlu, 2010; Yair ve Uni, 2011). Embriyonun mineral madde metabolizması, ekstra embriyonik zarlar, dokular ve embriyonun aerobik metabolizması ile embriyonun gelişimi ile ilişkili olarak embriyonun artan oksijen (O_2) talebi gibi değişimlerden etkilenir. Bu etkilenme kuluçkadaki çevresel değişimler (sıcaklık, oksijen, hipoksiya vd.) ve özellikle kuluçkanın geç aşamasında sarı kese aracılığıyla yumurtadan embriyoya iz minerallerin mobilizasyonu ile şekillenir. Kuluçkanın son aşamasında hipoksia etkisiyle kandaki hemoglobin düzeyindeki artıştan dolayı kanda Fe düzeyinin artması buna verilecek bir örnektir (Richard vd., 1991).

Genel anlamda iz minerallerin embriyo hücrelerinde ve embriyonik zarlarda bulunan metal içeriğine sahip enzimlerin ve proteinlerin katalitik veya yapısal faktörleri olarak işlevleri olduğu kabul edilmektedir. Bu nedenle mineral eksikliğinin embriyo gelişimini olumsuz etkilemesi, organlar ve sistemler üzerinde gelişim geriliğine hatta embriyonik ölümlere yol açması gibi ciddi sonuçlar ortaya çıkarmaktadır. Embriyonik gelişimin desteklenmesi için

yumurtadaki besin rezervlerini yumurta sarısı ve albümini oluşturmaktadır (Richards ve Packard, 1996). Kabuktan yumurta içerisine salınımı gerçekleşen minerallerin embriyo tarafından kullanımını da söz konusudur (Yair ve Uni., 2011). Bu besin maddeleri içerisinde yer alan mineraller diğer besin maddelerinde olduğu gibi maternal kökenlidir (Richards, 1997; Schaafsma vd., 2000; Yair ve Uni, 2011).

Oksidatif enerji metabolizmasında görev alan Fe, temelde O_2 taşıma proteinleri olarak bilinen miyoglobin, spesifik redoks enzimleri ve hemoglobinin önemli bir bileşenidir (Yair ve Uni, 2011). Yumurta sarısında bulunan Fe'in bağıl biyolojik değerinin %20-32 olduğu, yumurta sarısındaki Fe yumurta albümininde bulunan Fe ile karşılaştırıldığında biyolojik değerinin düşük olduğu bildirilmiştir (Samaraweera vd., 2011). Hindi yumurtası incelendiğinde yumurta sarısında Fe 1.017 µg/g düzeyinde olduğu, albüminde ise bu düzey 53 µg/g'dır (Richards, 1997). Demir mineralinin en yüksek düzeyi yumurta sarısı granüllerinde %84.6 oranında, çözünür yumurta sarısında %2.6 oranında, albüminde ise %9.3'tür. Hindi yumurtalarının sarısı incelendiğinde Fe fosfitinde 100 µg/g düzeyinde, vitellogenin de 10 µg/g ve lipovitellinde ise yaklaşık 15 µg/g düzeyinde olduğu bildirilmiştir (Richards, 1997). Yüksek düzeyde Fe alımı etlik piliçlerde hücresel redoks dengesinin bozulmasıyla oksidatif stresin etkisi ile büyüme performansı üzerinde düşüşe ve antioksidan aktivitenin azalmasına neden olmaktadır (Han vd., 2022).

Bağışıklık, üreme ve büyüme sistemleri için önemli bir iz element olan çinkonun (Jose vd. 2018), yeterli düzeyi; büyüme, üreme, et kalitesi, bağışıklık ve biyolojik fonksiyonların işleyişi için de oldukça önem taşımaktadır (Salim vd., 2012). Çinkonun bağışıklıkta ki rolü heterofil ve T lenfositlerin işleyişindeki rolüdür (Kidd vd., 1996). Salmonella enfeksiyonu sırasında bağırsak absorbsiyonu etkilendiğinden (Bortoluzzi vd., 2019) Zn'nin kandaki düzeyinin azalmasından dolayı bu minerale olan ihtiyaç artmaktadır (Hill, 1989). Yumurtanın mineral düzeyleri incelendiğinde Zn düzeyi sarı kesede 571 µg, albüminde ise 5 µg'dır. Çinko mineralinin yine en yüksek düzeyi sarı granüllerinde %88.8, çözünür yumurta sarısında %3.0 oranında, albüminde ise %6.9 oranında bulunmaktadır (Richards, 1997). Hindi yumurta sarılarında Zn fosfitinde yaklaşık 20 µg/g düzeyinde, vitellogenin de 5 µg/g, lipovitellinde ise yaklaşık 8 µg/g düzeyinde bulunmaktadır (Richards, 1997). Yumurta tavuğu rasyonlarına ilave edilen yüksek düzey Zn ve Fe mineralleri yumurtadaki mineral düzeylerini arttırmadığı gibi, aksine yumurta veriminin durmasına sebep olmaktadır (Elvehjem vd., 1929; Richards, 1997).

Araştırmalarda kullanılan mineral madde formları genel olarak nano, inorganik, organik veya sülfat bileşikleri şeklindedir (Ulger ve Fidan, 2021). Bu formların etkileri, verildikleri düzey ve çözdürüldükleri solüsyonlara bağlı olarak değişebilmektedir. Rasyonda mineral

bakımından yüksek dozlarda inorganik ve organik formlarda kullanılan iz minerallerin (Zn, Cu, Mn, Fe), etlik piliçlerin performansı üzerinde önemli bir etkilerinin olmadığı, buna karşılık mineral düzeyi eksik rasyonların yem tüketimini olumsuz etkilediği ve hayvan gelişimi üzerinde ciddi olumsuzluklar oluşturduğu bildirilerek, optimal düzeyde mineral düzeyine sahip rasyon ile besleme yapılması gerektiği ifade edilmiştir (Nollet vd., 2008).

Embriyonun dokularında bulunan mineral maddeler inorganik ve organik formdadır. Sözü edilen inorganik element formu canlı dokular yakıldıktan sonra küllerinde oksit, sülfat ve karbonatlar olarak bulunma durumudur. Organik mineral maddeler ise çözünme durumunda olan herhangi bir metal tuzunun amino asitlerle kompleks kurması ile ilişkili olarak ilgili mineralin organik formu ortaya çıkmaktadır. Ortaya çıkan mineral 1 mol metal ile 1-3 mol amino asit ile reaksiyonu sonucunda organik formunu almaktadır. Bu formun şelat miktarının ise 800 Dalton olması gerekmektedir (Vieira, 2008). Organik Zn ve inorganik $ZnSO_4$ formu ile bunların artan düzeylerini içeren yemin etlik piliçlerde tüketimine dair bir çalışmada, tibia içeriğinde ölçülen Zn düzeyinin inorganik sülfat formuna göre organik Zn formun %100 biyo-yararlanım gösterdiği bildirilmektedir (Star vd., 2012).

Karaciğerin gelişen embriyonun mineral metabolismasının homeostatik dengesi ve minerallerin depolanmasında en önemli organ olduğu ve embriyo gelişimi için gerekli olan birçok metabolik aktiviteyi bünyesinde gerçekleştirdiği bilinmektedir (Richard vd., 1991). Örneğin, karaciğer kanatlı embriyosunda glikoneogenezis aracılığı ile glikoz üreten tek dokudur (Richards, 1997). Karaciğerde bulunan Cu, Zn ve Fe spesifik antioksidan enzimlerin ko-faktörü olduğu yani bu enzimlerin aktive edilmesinde Cu, Zn ve Fe minerallerinin görev aldığı bildirilmektedir (Wilson vd., 1992). Metabolik olayları kontrol eden en önemli doku olan karaciğerin Zn düzeyi ile embriyonun O_2 tüketimi arasında ilişki olması, embriyonun O_2 taşıma kapasitesinden sorumlu hemoglobin sentezinin karaciğerdeki Fe ihtiyacına bağlı olması bu dokunun önemini ortaya koymaktadır. Ayrıca, metabolik olaylarda fonksiyonel olan Zn'nin aktive ettiği metallothionein (MT) geni (Baltacı vd., 2018) ve hücre içi Fe mineralinin taşınması ve düzenlenmesi ile ilişki olarak Fe metabolizasından sorumlu transferin reseptör (TFRC) genlerinin (Bogdan vd., 2016) fonksiyonel etkilerini gösterdikleri doku karaciğerdir.

Embriyonun mineral metabolizmasını, yumurtada bulunan mineral maddelerin sarı keseden embriyoya transferi ve geç dönemde amniyon keseden oral olarak bu minerallerin embriyo tarafından kullanımını kapsamaktadır. Embriyonun mineral kullanımının çeşitli fizyolojik nedenlerden dolayı gerilemesi ve kuluçkanın son döneminde yumurtada bulunan düşük mineral düzeylerinden kaynaklı olarak bu kullanımın yetersiz kalması söz konusu olabilmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı kuluçkanın ikinci yarısından sonra embriyonun yaşı

ile giderek mineral düzeylerinin azalması embriyonun iz elementleri kullanımına bir işarettir. Ancak, farklı embriyo gelişim dönemleri boyunca embriyonun yumurtanın özellikle sarı kese ve albümindeki mineral maddeleri kullanması ile birlikte daha sonra oluşan keselerde bu mineral maddeleri embriyonun nasıl kullandığına ilişkin konunun araştırılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, Fe ve Zn minerallerinin organik nano formlarının yüksek metabolik aktiviteye sahip etlik damızlıklara ait embriyonun Fe ve Zn metabolizması ile ilişkili genlerin ve embriyo/civciv gelişimi ile ilişkili fizyolojik tepkilerin araştırılması bu çalışmanın konusunu oluşturmuştur.

Bu çalışmada, embriyonun farklı fizyolojik gelişim dönemleri dikkate alınarak farklı embriyonik yaşlarda embriyonik keselere in ovo yöntem aracılığı ile enjekte edilen organik nano Fe ve Zn mineral partiküllerinin çıkışta günlük yaştaki etlik civcivlerin karaciğer mineral metabolizması, embriyo/civciv gelişimi, karaciğer dokusunda TFRC ve MT genlerin mRNA gen ekspresyon düzeyleri, karaciğer glikojen düzeyi, kemik gelişimi ve mineralizasyonu, civcivlerin vücut bileşimi ile birlikte kalıntı sarı kese bileşimi ve kan serumunda mineral düzeyi üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1 Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, metrenin milyarda biri ölçeğindeki maddelerin atomik ve moleküler düzeyde değiştirilmesi ile yeni malzemelerin, cihazların ve çeşitli sistemlerin geliştirilmesine katkı sağlayan disiplinler arası bir bilim dalı olarak tanımlanmaktadır (Tüylek, 2019). Nanoteknoloji 1-100 nm aralığındaki yüzey işlevselliği ve boyutları farklı olan parçacıkları ifade etmektedir (McNeil, 2005). Nanoteknoloji tanımı ilk olarak 1970 yılının sonlarına doğru ortaya çıkmış olsada (Mongillo, 2007) nano malzemelerin kullanımı antik döneme dayanmaktadır (Yakar, 2018). Nanoteknoloji biliminin babası olarak kabul edilen Richard Feynman 1959 yılında ilk defa nano ölçekte ölçümlerin ve üretimin temellerini attığı bildirilmektedir (Yakar, 2018). Nanoteknolojinin temellerinin atılmasının ardından yine tarihte ilk defa Drexler, 1986 tarafından "Nanoteknoloji" terimi ortaya çıkmıştır. Nano ölçekte üretilen malzemelerin yalnızca partikül boyutları değil, enerji absorbsiyonu, kimyasal olarak reaktif olma durumu ve biyolojik özellikleri açısından farklı yapısal özellikleri sergileme yeteneğine sahip yeni bir malzeme oluşudur (Tüylek, 2021).

Nano partikül boyutunda üretilen malzemelerin dayanıklılık, hafif ve daha az malzeme kullanılarak üretilebilmesinin yanında çevre, tıp, bilgisayar, biyoteknolojik ve savunma sanayi alanlarında da yaygın şekilde kullanılmaktadır (Gelişiyor, 2012).

2.1.1 Nanoteknoloji Uygulama Alanları

2.1.1.1 Çevre ve Enerji

Nanoteknoloji, çevre dostu ulaşım sistemleri ya da temiz enerji kaynaklarının kullanımını sağlamaktadır (Özdoğan vd., 2006). Örneğin fosil yakıtlar dışında daha çevre dostu enerji üretimi için hidrojen üretimi ve depolama uygulamalarında nanoteknoloji biliminden faydalanılmaktadır (Karataş vd., 2020).

2.1.1.2 Tıp ve Sağlık

Tıp ve sağlık alanında nanoteknoloji ile yapay reseptörler, DNA, gen terapisi, doku mühendisliğinin gelişimi, ilaç taşıma sistemlerinin gelişimi sağlanmaktadır (Emerich ve Thanos, 2003).

2.1.1.3 Biyoteknoloji

Metal ve yarı iletken nanopartiküllerin de içinde bulunduğu nano ölçekli materyallerin kullanımı ile DNA bağlantılı nanopartiküllerin kullanımını inceleyerek nanoteknoloji ve biyoteknoloji bilimleri arasında köprü kurulmaktadır (Yang vd., 2014).

2.1.1.4 Savunma Sanayi

Nanopartiküllerin geniş yüzey alanı ve diğer özelliklerinin avantajları sayesinde yaygın kullanımı olan polimer kompozitlere alternatif olarak polimer nanokompozitlerin gaz, petrol ve savunma sanayide kullanımları ele alınmaktadır (Ngo, 2025).

2.1.1.5 Tarım

Sürdürülebilir tarıma katkı sağlamak amacıyla içeriğinde Fe, Zn, ZnO ve MgO gibi nanopartikül içerikli nanobiyo gübrelerin kullanımının incelenmesi ile nanoteknolojinin tarımdaki yeri araştırılmaktadır (Chattaraj vd., 2025).

2.1.1.6 Hayvan Yetiştirme ve Besleme

Hayvan yetiştirme ve besleme alanında nanoteknolojinin gelişimi ile hayvanların fizyolojik durumlarını algılayan sensörler, nanopartiküller düzeyde besin alımı, nanotüp veya nanopartikül ilaç kullanımı gibi çeşitli konularda katkı sağlamaktadır (Den Hartog ve Sijtsma, 2013).

Nanoteknolojinin kapsadığı uygulamaların ve alanların detaylı olarak incelenemeyecek kadar geniş olduğu vurgulanmaktadır (Emerich ve Thanos, 2003), ancak yukarıda kısaca alanlar ve bu alanlardaki uygulamalardan bahsedilmektedir.

2.1.1.7 Kanatlı Hayvan Yetiştirmede Nanoteknoloji

Kanatlı hayvanlarda nano partikül kullanımı sindirim sistemindeki emilimlerinin kolay olması ve önemli biyolojik sonuçlar ortaya koymaları nedeniyle önemli bir yere sahiptir (Nechitailo vd., 2025).

Kanatlı hayvanların büyüme ve gelişimine katkı sağladığı, yüksek biyoyararlanım sağladığı, düşük toksisite özellikleri ve kanatlı hayvan sağlığı üzerinde önemli etkileri ile nano partiküllerin önemini göstermektedir (Nechitailo vd., 2025).

2.1.2 Nano Malzeme Çeşitleri

Kimyasal özellik, boyut ve morfolojik özelliklerine göre nanopartiküller gruplara ayrılmaktadır (Salem vd., 2022).

Nano partiküller diğer partiküllerden farklı olarak nano skalada fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler bakımından benzersiz özellikler taşıdığı bildirilmektdir. Nano partiküller organik, inorganik, karbon bazlı, metal bazlı, metal oksit bazlı, karbon nano tüpler, karbon siyahı, karbon nano tüpler, grafen ve fullerenler olarak sınıflandırılmaktadır.

2.1.2.1 Organik Nanopartiküller

Metal ve metal oksit nano partiküllerin sentezlenmesinde kullanılan yüzey aktif madde özelliklerindeki amino asitler (lizin, histidin, arjinin) nano partiküllerin boyut ve şekillerinin elde edilmesine yardımcı olduğu bildirilmektedir (Kulandaisamy ve Rayappan, 2018). Kullanılan bu amino asitlerin nano partikül minerallerin organik formda sentezlenmesine katkı sağladığı bildirilmektedir (Vieira, 2008).

Ferritin, protein bazlı nanopartikül olup kanser teşhis ve tedavi yöntemleri gibi biyomedikal uygulamalarda yer almaktadır (Sevieri, 2024).

2.1.2.2 Metal ve Metal Oksit İçeren İnorganik Nano Malzemeler

Nano gümüş (Ag), nano altın (Au), nano bakır (Cu) biyomedikal ve elektronik uygulamalarında kullanılır (Zhang vd., 2022). Çinko oksit (ZnO), demir oksit (Fe_2O_3) ve titanyum dioksit (TiO_2) metal oksitlerin hayvancılıkta nano partiküllerin kullanımı bulunmaktadır (Zhang vd., 2022).

2.1.2.3 Karbon Bazlı

Karbon bazlı (tamamen karbon kaynaklı), fullerenler, karbon nano tüpler, karbon siyahı, grafenler ve karbon nanofiber nano malzemeleri karbon bazlı nano malzeme sınıfında yer almaktadır (Ealia ve Saravanakumar, 2017).

2.1.3 Nano Partiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Nanopartiküllerin sentezi ise sol-gel, Spining (organik polimer eğirmesi), kimyasal buhar biriktirme (CVD), Piroliz, biyosentez, yukarıdan aşağı metodu (mekanik frezleme, nanolitografi, lazer ablasyon, püskürtme, termal ayrışma) olarak sınıflandırılmaktadır (Ealia ve Saravanakumar, 2017). Karakterizasyonda kolaylık, düşük maliyetli nanopartikül üretimi, düşük toksisite ve çevre dostu nanopartiküllerin üretimi açısından önemli bir yaklaşım olan yeşil sentez yöntemi bitki ekstraktlarının kullanıldığı ilgi çekici bir yöntem olmaktadır (Gour ve Jain, 2019).

Nano partiküller sentezlendikten sonra yüzey alanları, şekilleri, mikro yapısal özellikleri ve faz yapıları göz önüne alınarak taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile parçacık yüzeyinin taranması ve geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile nano partiküllerin morfolojisinin belirlenmesi (Ateş, 2018), ultraviyole-görünür Spektroskopi (Uv-vis) nano partiküller tarafından emilen ve saçılan ışığın ölçümünde (Dağlıoğlu, 2018), fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR), nanopartiküllerin yüzeylerinin kimyasal yapısı ile ilgili bilgi veren X-Işını Fotoelektron Spektrometresi (XPS) testi (Yakut vd., 2022) olan karakterizasyon testlerinden geçirilmelidir (Rajendran vd., 2013). Nano partiküllerin sentezi ise aşağıdan yukarı kategorisi içinde organik polimer eğirmesi (Spining), sol-jel, kimyasal buhar biriktirme (CVD), piroliz, biyosentez yöntemi kullanılarak, yukarıdan aşağı kategorisinde mekanik frezleme, nanolitografi, lazer ablasyonu, termal ayrışma, püskürtme metotları kullanılarak nano partikül sentezi gerçekleştirilmektedir (Ealia ve Saravanakumar, 2017). Bu yöntemlerin dışında nano partiküllerin yeşil sentezi de farklı bir nano partikül sentezleme yaklaşımıdır.

2.2 İn Ovo Enjeksiyon Yöntemi

İn ovo enjeksiyon yöntemi, embriyo gelişiminin farklı dönemlerinde uygulama, besleme ve aşılama gibi birçok amaç için kullanılan enjeksiyona dayalı biyoteknolojik bir yöntem olarak tanımlanmaktadır (Peebles, 2018; Babacanoğlu ve Cellak, 2019). Kanatlı

embriyosunun gelişimi dikkate alınarak belirli embriyonik yaşlarda farklı embriyonik sitelere besin maddelerinin veya farklı biyo-aktif maddelerin enjekte edilmesi ile embriyonun gelişimi, metabolizması, fizyolojisi ve genetik araştırmalar için maternal etkileri daha kısa sürede ortaya çıkarabilecek bir yöntemdir (Babacanoğlu ve Cellak, 2019). İn ovo yöntem geç embriyonik yaşta amino asit, mineral ve vitamin gibi besin maddelerin enjeksiyonu ile erken besleme (in ovo besleme) çalışmalarını kapsar (Peebles, 2018).

2.3 Mineral Maddeler

Mineral maddeler, canlı organizmada metabolizma ile ilişkili biyokimyasal reaksiyonları başlatan ve devam ettiren, sinir uyarılarının iletimini sağlayan, kasların kasılmasını ve hücre içi/ arası geçirgenliği sağlayan birçok fizyolojik olayda görev alan bileşenlerdir (Bhagwat vd., 2021). Yağ miktarı hariç bir kg canlı ağırlıkta 50 mg düzeyinden daha yüksek düzeyde bulunan mineral maddeler makro olarak, 50 mg düzeyinden daha az bir düzeyde tespit edilen mineral maddeler de iz mineral maddeler olarak sınıflandırılmaktadır (Hira, 2012). Ca, P, Mg, Mg mineralleri makro (Al-Obaidi vd., 2012), Fe, Zn, Mn, Cu, Ag, Cr mineralleri ise iz mineraller (Hassan vd., 2020) arasında yer almaktadır.

İz mineraller, stoplazmada, kanda ve hücrede bulunan bazı atomlar, iyon veya moleküllere bağlanır (Pappas vd., 2011). Genel anlamda iz minerallerin embriyo hücreleri ve embriyonik zarlarda bulunan metal içeriğine sahip enzimlerin kofaktörü olarak ve proteinlerde ise katalitik veya yapısal faktörlerde işlevleri olduğu kabul edilmektedir. İz minerallerde ortaya çıkan eksiklik embriyo gelişiminin olumsuz etkilenmesinin yanında organlar ve sistemler üzerinde gelişim geriliğine hatta embriyonik ölümlere yol açacak kadar ciddi durumlara neden olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalar, yüksek düzeylerde iz mineraller ile besleme uygulamaları sonucunda akut toksik etkilerin raporlandığı bildirilmektedir (Richards, 1997).

2.3.1 Yumurtadaki Mineraller

Embriyonik gelişimin desteklenmesi için yumurtadaki besin rezervlerini yumurta sarısı, akı ve kabuğu oluşturmaktadır (Richards ve Packard, 1996). Bu besin maddelerinden söz konusu olan mineraller kabukta kalsiyum, magnezyum, albümende potasyum ve sodyum, sarıda ise Cu, Fe, Mn, Zn ve P'nin büyük bir kısmı bulunmaktadır (Richards, 1997; Schaafsma vd., 2000; Yair ve Uni, 2011).

Maternal kökenli mineral maddeler yani başka bir değişle yumurtada bulunan mineral maddeler: sarıda P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn mineralleri (Nisianakis vd., 2009; Santos vd., 2022), albüminde Zn, Fe, Mn, Cu, Cr, Ni, K, Na, Ca, Mg, P mineralleri (Nisianakis vd., 2009; Kiczorowska vd., 2015) ve kabukta Ca, Mg, Fe, P, Mn mineralleri (Yair ve Uni, 2011) ile kabuk zarında Cu mineralidir (Baumgartner vd., 1978; Vieria, 2007).

Yumurta besin maddesi bakımından incelendiğinde albümin %60'ını, yumurta sarısı %30'unu kabuğun ise yumurtanın %10'luk kısmını oluşturduğu bildirilmektedir (Naber, 1979). Yumurtanın mineral içeriği incelendiğinde albüminde K ve Na minerallerinin yüksek düzeyde bulunduğu (Trziszka vd., 2021), Cu, Mn, Zn ve Fe gibi iz minerallerin düzeylerinin düşük olduğu, kabuğun Ca, Mg ve Sr bakımından ana kaynak olduğu ve buna karşılık P, Mn, Zn, Fe, minerallerinin ise düşük düzeylerde olduğu bildirilmektedir (Halgrain vd., 2022; Besharati vd., 2023). Ayrıca bazı mineral maddelerin yumurtanın belli kısımlarında yer almaktadır. Örneğin yumurtanın mineral düzeyi incelendiğinde Fe ve Zn düzeyi sarı granüllerinde en yüksek düzeyde olduğu bildirilmektedir (Richards, 1997).

Yumurta minerallerin çok azı inorganik bileşik ve iyon halindedir kalan kısmının çoğu konjuge (bazın proton alması H^+) halde bulunduğu bildirilmektedir (Romanoff ve Romanoff, 1949). Mineral yoğunluğunun çoğu yumurta sarısında depolanmakta ve hatta P'nin %61 kadarı burada bulunan fosfolipidlerin yapısında bulunmaktadır (Sugino vd., 1997). Albümin ise K ve Na minerallerinin önemli bir kısmını içermektedir. Kabuk incelendiğinde ise Ca konsantrasyonunun yüksek olduğu görülmektedir ve bununla beraber kabukta ve kabuk zarında Cu, Mn, Zn ve Fe mineralleri de yer almaktadır (Mas ve Arola, 1985; Burley ve Vadehra, 1989).

Çizelge 2.1 Yumurtada ak ve sarıdaki mineraller (Burley ve Vahedra, 1989)

Mineraller (mg)	**Bütün yumurta**	**Yumurta akı**	**Yumurta sarısı**
Ca	29.2	3.8	25.2
Cl	96.0	66.1	29.9
Cu	0.033	0.009	0.024
I	0.026	0.001	0.024
Fe	1.8	0.053	1.02
Mg	6.33	4.15	2.15
Mn	0.021	0.002	0.019
P	111	8	102
K	74	57	17
Na	71	63	9
S	90	62	28
Zn	0.72	0.05	0.66

2.3.2 Yumurta Sarısı Mineralleri

Kanatlı hayvanlarda mineraller, ana tarafından yumurta sarısına aktarılan minerallerin tamamını kapsar ve maternal kökenli minerallerin büyük bir kısmı yumurta sarısında yer alır (Richards, 1997).

Yumurta sarısı, Cu, Mn, Fe, Zn ve P mineralleri bakımından zengin bir içeriğe sahiptir (Richards ve Packard, 1996). Kalsiyum, K, Na, stronsiyum (Sr) minerallerinin embriyonik yaşın ilerlemesi ile sarı kesede bulunduğu düzeyden daha yüksek bir düzeye ulaşması ile bu minerallerin yumurtanın diğer bölümlerinden karşılanarak embriyoya ulaştığı bildirilmektedir (Hopcroft vd., 2019).

Kuluçka boyunca kazlarda sarı kesede incelenen mineral konsantrasyonu sonuçlarına göre Zn, Fe, Cu mineral düzeylerinin kuluçkanın 9.5. gününe kadar yüksek olduğu ancak ilerleyen süreçte kademeli bir azalma görüldüğünü, Ca mineral düzeyinin ise başlangıçta düşük olduğunu fakat kuluçkanın sonlarına doğru artış gösterdiği bildirilmektedir (Besharati vd., 2023). Sarı kesede artan Ca ve diğer mineral düzeylerinin aslında kabuktan mobilize edilerek gerçekleştiği ve bunun embriyonun mineral metabolizmasındaki işleyişini gösterdiği bildirilmektedir (Besharati vd., 2023).

Çizelge 2.2 Yumurta sarısı mineral madde düzeyleri (Angel, 2007)

Mineraler	**Miktar**
P (mg)	111.6
Ca (mg)	26.8
K (mg)	20.1
Na (mg)	12.1
Mg (mg)	2.6
Fe (µg)	1.017
Zn (µg)	571
Cu (µg)	37
I (µg)	32
Mn (µg)	10
Se (µg)	9
Cr (µg)	5
Ni (µg)	0.8
Co (µg)	0.16

2.3.3 Yumurta Albümini Mineralleri

Minerallerin yumurta sarısına göre daha az bir kısmı albüminde bulunmaktadır (Hopcroft vd., 2019). Yapısal olarak dört katmandan oluşan albümin yüksek miktarda su (Marion vd., 1964), protein ve daha düşük miktarda mineral ve lipit içermektedir (Romanoff ve Romanoff, 1949). Albümin mineralleri, P, Fe, Cu, Zn (Nisbet vd., 1981) ve Cl, Mg, Na, S, K olarak sıralanmaktadır (Cook, 1977).

Çizelge 2.3 Yumurta albümini mineral madde düzeyleri (Angel, 2007)

Mineraler	**Miktar**
P (mg)	5.2
Ca (mg)	2.4
K (mg)	49.3
Na (mg)	57.1
Mg (mg)	3.7
Fe (µg)	53
Zn (µg)	5
Cu (µg)	10
I (µg)	2
Mn (µg)	0.05
Se (µg)	2
Cr (µg)	1
Ni (µg)	0.02
Co (µg)	0.01

2.3.4 Yumurta Kabuğunun Yapısı ve Kabuk Mineralleri

Yumurta kabuğu, protein liflerinin oluşturduğu matris ve 1/50 oranında kalsiyum kristal sütunları olarak bilinen iki ana bileşenden oluşur (Romanoff ve Romanoff, 1949).

Kabuğun %97'sinin inorganik olarak $CaCO_3$ kristalinden meydana geldiği ve sentezinin kabuk kalitesini etkilediği bildirilmektedir. Kalsiyum ve karbonat iyonlarının oluşturduğu kabuğun Ca kandan pasif ve aktif halde sağlanmaktadır. Mineraller kabukta %24.11 Ca, %0.23 ve 0.04 P ve çok düşük miktarlarda kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), gümüş (Hg) ve alüminyum (Al) olarak dağılım gösterdiği bildirilmektedir (Altan, 2015). Yumurta kabuğunun yumurta sarısına göre mineral katkısının embriyo gelişimi sırasında daha az olduğu bildirmektedir (Yair ve Uni, 2011).

Çizelge 2.4 Yumurta kabuğu mineral madde düzeyleri (Yair ve Uni, 2011)

Mineral	**Miktar**
Ca (mg)	2.746
P (mg)	10.09
Fe (µg)	57.92
Zn (µg)	15.81
Mn (µg)	0.94
Cu (µg)	0

2.3.5 Yumurta Kabuk Zarı ve Kabuk Zarı Mineralleri

Kabuk zarlarının yapısında maddeler inorganik, organik ve su olarak bulunmaktadır ve bu maddeler sırasıyla %10, %70 ve %20 oranlarındadır. Kabuk zarında, Na, Mg, Ca, K, P, Mn, Fe, Cu, Zn, ve Al minerallerini bulunduğu bildirilmektedir (Altan, 2015).

2.3.6 Mineral Madde Formları

Dokularda bulunan mineral madde içeriği inorganik ve organik olarak bulunmaktadır. Söz edilen inorganik element formu canlı dokuların yakıldıktan sonra küllerinde oksit, sülfat ve karbonatlar olarak bulunma durumudur. Organik mineral maddeler ise çözünme durumunda olan herhangi bir metal tuzu aminoasitlerle kompleks kurmakta ve böylece mineralin organik formu ortaya çıkmaktadır (Vieira, 2008).

Araştırmalarda kullanılan mineral formları genel olarak nano, inorganik, nano inorganik, organik veya sülfat bileşikleri olarak kullanılmaktadır. Bu formların etkileri, verildikleri düzey ve çözdürüldükleri solüsyonlara bağlı olarak değişebilmektedir. Çalışmalar incelendiğinde genel olarak formlar ve düzeyler karşılaştırılmaktadır. Ancak minerallerin çözdürüldüğü solüsyonların karşılaştırılmasına ilişkin çalışma bulunmamaktadır. Çinko formlarının kanatlılar üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışma, organik Zn ve inorganik $ZnSO_4$ formunu ve artan düzeylerini standart bir yem aracılığı ile kullanmaktadır. Bu çalışmanın sonuç raporlarına göre organik tibia içeriğinde tespit edilen Zn kaynağının inorganik sülfat kaynağına göre %100 biyoyararlanım ile sonuçlandığı bildirilmektedir (Star vd., 2012). Emilimi tam olarak gerçekleşmemiş inorganik iz minerallerin canlı vücudundan atılımının

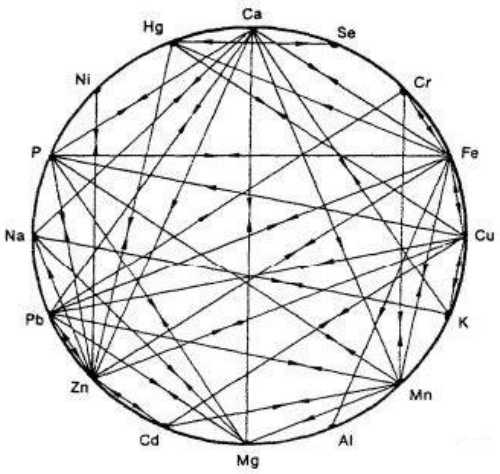
çevre kirliliği ile sonuçlandığı (Mwangi vd., 2017), buna karşılık organik minerallerin ise daha yüksek biyoyararlanıma sahip olduğu bildirilmektedir (Bao vd., 2007; Bao vd., 2009).

Etlik damızlık rasyonuna ilave edilen inorganik ve organik minerallerin etkinliğini inceleyen bir çalışma konusu, inorganik minerallerin rasyondan tamamen çıkartılarak bunun yerine organik minerallerin rasyona ilave edilerek kullanılmaktadır. İnorganik minerallerin fazla kullanılması nedeniyle antagonizma gibi çeşitli nedenlerden dolayı minerallerden yararlanılmadan dışkı ile atıldığı belirtilmektedir. Serum toplam protein düzeyi, albümin ve glikoz içerikleri organik mineral kullanılan grupların inorganik mineral kullanılan gruptan daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Karaciğer enzim aktivitesi incelendiğinde organik mineral beslemesi yapılan grubun GSH-Px (glutathione peroxidase) ve T-SOD (total superoxide) aktivitesini artırdığı, bununla beraber MDA (malondialdehyde) seviyelerinde bir azalma meydana geldiği bildirilmektedir. Karaciğer ve serum antioksidan durumunun ise benzer olduğu bildirilmektedir (Wang vd., 2019).

2.3.7 Mineraller Arası Etkileşimler

Mineral ilişkileri incelendiğinde öncelikle antagonizm ve sinerjizm durumları ele alınmaktadır. Mineral antagonizması, herhangi bir mineralin düzeyindeki artışın antagonisti olan mineralin azalması ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Mineral sinerjizmi ise herhangi bir mineral düzeyindeki artışın bu mineralin sinerjisti olan mineralinde atması ile sonuçlandığı belirtilmektedir (Watts, 1990). Mineraller üzerine yapılan pek çok çalışmada yalnızca tek mineralin kullanımından kaynaklı mineraller arası etkileşimler ile ortaya çıkabilecek dezavantajları savunmaktadır. Bu dezavantajlar Zn, Cu ve Fe arasındaki antagonizma nedeniyle bir mineralde meydana gelen artış diğer mineralin azalmasına neden olur ve anemi ya da biriken diğer mineralin toksisitesi ile sonuçlanmaktadır (Nollet vd., 2007; Jegede vd., 2011).

Minerallerin düzeyleri ve canlı üzerindeki etkileri genel anlamda mineral absorbsiyonu ile alakalı olabilmektedir. Mineral absorbsiyonu, mineraller arasındaki ilişkiden kaynaklı antagonizma nedeniyle etkilenebilmektedir. Bu nedenle enjeksiyonu yapılacak mineral maddelerin öncelikle diğer mineraller ile ilişkilerine dair detaylı bilginin bilinmesi ve verilecek mineral düzeyinin belirlenmesi oldukça önemli olmaktadır. Aşağıda mineraller arasında gerçekleşen antagonizma ve sinerjizm ilişkisine ait mineral ağı ve mineral sinerjizm çizelgesi ile bu önem bildirilmektedir.



Şekil 2.1 Mineraller arasında gerçekleşen antagonizma ve sinerjizm ilişkisine ait mineral ağının gösterimi (Watts, 1990)

Çizelge 2.5 Mineral sinerjizmi (Watts, 1990)

Mineraller	**Sinerjistler**
Ca	Mg-P-Cu-Na-K
Mg	Ca-K-Zn-Mn-P-Cr
Na	K-Co-Ca-Fe-Cu-P
K	Na-Mg-Mn-Zn-P-Fe
Cu	Fe-Co-Ca-Na
Zn	K-Mg-Mn-Cr-P
P	Ca-Mg-Na-K-Zn-Fe
Fe	Cu-Mn-K-Na-Cr-P
Cr	Mg-Zn-K
Mn	K-Zn-Mg-Fe-P

2.4 Embriyonun Mineral Metabolizması

Embriyonun mineral madde metabolizması, ekstra embriyonik zarlar, dokular ve embriyonun aerobik metabolizması ile embriyonun gelişim hızı ile ilişkilidir. Bu ilişkiler embriyonun artan O_2 talebi gibi değişimlerden etkilenir ve bu etkilenme kuluçkadaki çevresel değişimler (sıcaklık, oksijen, hipoksiya vd.) ve özellikle kuluçkanın geç aşamasına bağlı olarak sarı kese aracılığıyla yumurtadan embriyoya iz minerallerin mobilizasyonu ile şekillenir (Richard vd., 1991). Kuluçkanın son aşamasında hipoksia etkisiyle kandaki hemoglobin düzeyindeki artıştan dolayı kanda Fe düzeyinin artması buna verilecek bir örnektir.

Besin maddelerinin emilimi, depo edilmesi ve metabolizması kanatlı hayvan türlerinde genetik yapıya göre değişir (Lillie vd., 1951). Sınırda olan mineral madde ve diğer besin madde

eksiklikleri, sürüdeki her hayvanı aynı oranda etkilemeyebilir, bu durum kuluçka sonunda yüksek embriyonik ölümler ile sonuçlanabilir (Lillie vd., 1951).

Besin maddelerindeki eksiklik veya fazlalık olarak düşünülen dengesizliklerin embriyo gelişiminde olumsuzluklar ve yumurta üretiminde kesinti olarak ortaya çıkabilmektedir. Bu durumun ilerlemesi sonucunda embriyo gelişimi üzerindeki olumsuz etkiler daha erken ve şiddetli bir şekilde ortaya çıkar (Wilson, 1997). Özellikle kuluçkanın yarısından sonra etlik embriyolarda yüksek rakım kaynaklı (1720 m-hipoksiya) hipoksik şartlar altında O_2 ilavesinin embriyonin fizyolojik sistemlerinde olumlu sonuçlar ortaya çıkardığı bildirilmektedir (Babacanoğlu, 2018). Çevresel koşulların yanıtından ziyade mineral maddellerin aktivasyonu ile mineral maddelere embriyonun metabolik yanıtının daha etkili olabileceği düşünülmektedir. Karaciğerde bulunan Cu, Zn ve Fe'nin spesifik antioksidan enzimlerin kofaktörü olduğu yani bu enzimlerin aktive edilmesinde Cu, Zn ve Fe minerallerinin görev aldığı bildirilmektedir (Wilson vd., 1992). Karaciğer dokusunun gelişen embriyonun iz mineral metabolizmasının embriyonun homeostatik dengesini kurduğu, bu minerallerin depolanmasında en önemli organ olduğu ve embriyo gelişimi için gerekli birçok metabolik aktiviteyi de bünyesinde gerçekleştirdiği bilinmektedir. Örneğin, karaciğer kanatlı embriyosunda glikoneogenezis aracılığı ile glikoz üreten tek dokudur (Richards, 1997).

Embriyonun kemik gelişimine ilişkin mineral metabolizması embriyonik gelişimin yaklaşık 10. gününe kadar sarı kesenin Ca (kalsiyum) kaynaklarının kullanılması (Richards and Packard, 1996) daha sonraki dönemde 14. güne kadar korioallantoik membranın gelişimi gerçekleşir (Gabrielli vd., 2004) ve ihtiyaç duyulan Ca mineralinin kabuktan mobilizasyonu başlamaktadır ve bu Ca mobilizasyon sürecinin yoğunluğu özellikle (Delezene ve Fourneau, 1915) tarafından yapılan çalışmada bildirilene göre 17. ve 21. günler arasında olduğu bildirilmektedir (Buckner vd., 1925).

2.5 Demir (Fe)

Kısaltmasını Latince "Ferrum" kelimesinin ilk iki harfinden alan demir (Fe) elementi periyodik tablonun geçiş metalleri arasında yer almaktadır (Van Cleave ve Crans, 2019). Atom numarası 26 olan Fe (Vladimir, 2024), ağır metaller sınıfındadır (Teschke, 2024). Demirin değerliği -2'den +6'ya kadar ulaşmaktadır ve biyolojik olarak oksijenasyon reaksiyonlarında en çok +2, +3, +4 ve +5 olarak bulunur (Frey ve Reed, 2012). Demir oksit (Fe_2O_3), demir sülfür ($FeS{\cdot}Fe_2S_3$), demir hidroksit (FeH_2O_2), demir asetat ($C_6H_9FeO_6$), demir nitrat ($Fe(NO_3)_3$) ve demir sülfat ($FeSO_4$) demir elementinin bileşikleridir (Sidgwick, 1950).

Pigment üretiminde Fe_2O_3 (Lemos vd., 2024) bileşiği, endüstriyel atık su arıtmada ferröz klorür ($FeCl_2$) (Vo, 2025) bileşiği ve demir eksikliği ve anemisinde demir sülfat ($FeSO_4$) (Pantopoulos, 2024) bileşiğinin kullanımları ile Fe elementinin çeşitli alanlardaki kullanımlarına örnektir.

Fizyolojik olarak biyokimyasal pek çok süreçte görev alan Fe, oksijen taşınması, mitokondrial redoks süreçleri, eksikliği durumunda kalp, karaciğer ve diğer organların işlevlerinde problemlere neden olmaktadır (Zhen vd., 2024). Demir taşıma proteinleri alyuvarda bulunan hemoglobin (Aisen, 2024) ve kas hücrelerinde bulunan miyoglobindir (Wallace ve Trabal, 2024). Mitokondrial elektron taşınması, miyelin ve kolajenin biyosentezlerinde görev almaktadır (Zeidan ve Han, 2021). Canlı organizma için metabolik ve fizyolojik süreçlerde oldukça önemli olan Fe eksikliği ve fazlalığı gibi dengesizlikleri vücuttaki sistemlerin düzgün çalışmasını engellemektedir (Zeidan vd., 2024).

Hemosiderin ve ferritin formunda depolanan Fe mineralinin miyoglobin ve bazı enzimlerde düşük miktarda bulunduğu bildirilmektedir (Fairbanks ve Beutler, 1995). Demirin ferrik ve ferröz formları arasında elektron alışverişi ile kolayca dönüşüm sağlanmaktadır (Andrews, 2000). Demir depolanması ise ferrik demirin hemosiderin ya da ferritin aracılığıyla depo edilmektedir (Conway ve Henderson, 2022). Hücre içi demirin Fe_2 ve protoporfirin IX hem formundaki proteinden kaynaklı olduğu hem olmayan demirin ise hipoksi hassasiyeti olan hipoksi-indüklenebilir faktör (HIF) faktörü yoluyla O_2'nin algılanmasında en önemli merkez olduğu bildirilmektedir (Papanikolaou ve Pantopoulos, 2005).

2.5.1 Demir ve Gen İlişkisi

2.5.1.1 Demir Metabolizmasında Görevli Genler

Demir mineralinin düzenlenmesi, taşınması, metabolizması ve emilimi ile ilgili çok sayıda gen bulunmaktadır (Silva ve Faustino, 2015). Bu genler;

- Demir emiliminde görevli iki değerlikli metal taşıyıcı 1 (DMT1) geni (Núñez, 2010),
- Demir taşınmasında görevli genler, transferin reseptörü (TFRC), transferin (TF), transferin reseptörü 1 (TfR1), transferin reseptörü 2 (TfR2) genleridir (Lambert, 2012),
- Hücre içinde ferritine demir taşınmasında görevli poli(rC) bağlayıcı protein 1 (PCBP1) ve poli(rC) bağlayıcı protein 2 (PCBP2) genleri (Yanatori vd., 2020),
- Hücreden demir çıkışında görevli (SLC40A1) geni (Nemeth ve Ganz, 2021),
- Karaciğer Fe dolaşımında görevli Hepsidin (HAMP) geni (Ronis vd., 2011),

- Demir oksidasyonunda görevli seruloplazmin (CP) geni (Yonar vd., 2010), demir salınımında görevli Hemoksijenaz 1 ve 2 (2HMOX1 ve HMOX2) (Liu vd., 2023), mitokondriyal demir taşınmasında görevli mitoferrin 1 ve 2 (SLC25A37 ve SLC25A28) genleri (Gao vd., 2024), Mitokondriyal demir-kükürt taşınmasında görevli (ABCB7) geni (Pearson vd., 2020) demir metabolizmasında görevli gen grubunu oluşturmaktadır.

2.5.1.2 Demir Metabolizmasıyla İlişkili Hepatik Genler

2.5.1.2.1 Hepatik Demir Genleri ve İşlevleri

Karaciğer, Fe minerali depolamanın ana merkezi olarak canlı bünyesinde Fe taşınmasının düzenlenmesi, transferin ve seruloplazmin metabolizmasında protein sentezinin gerçekleşmesini sağlamaktadır (Anderson ve Frazer, 2005). Demir metabolizmasında hepatik genler aşağıda sıralanmaktadır;

- Karaciğer demir konsantrasyonu ve ertiropoetik demir ihtiyacından sorumlu Hepsidin (HAMP) geni (Ganz, 2011),
- Hepsidin geni sinyalinde TfR1ile etkileşim sağlayan HFE geni (Fillebeen vd., 2019),
- Hücre içi düşük Fe seviyesi durumunda hücreye Fe alımında görevli (TfR1) geni, karaciğer hepsidin regülasyonunda görevli (TfR2) geni (Chua vd., 2007) ve hepatik transferin reseptör (TFRC) geni (Bennett vd., 2024) önemli hepatik genlerdir.

2.5.1.2.2 Demir ve TFRC İlişkisi

Hücre içi demir alımında görev alan reseptörü kodlayan transferin reseptör (TFRC) geni, demir mineralinin hücre içine alınmasına yardımcı olmaktadır (Yang vd., 2022). Transferin reseptörü gibi demir metabolizmasında görevli olan genler yüksek rakım koşullarında bu genin ekspresyonunda artış gözlemlenmektedir (Zhou vd., 2023). Bu da yüksek rakım kaynaklı hipoksi koşullarında O_2 taşıma kapasitelerindeki artış ihtiyacı ile sonuçlanır ve hemoglobin sentezi için ekstra demirin gerektiğini ifade etmektedir (Karaca vd., 2023). Transferin reseptörü, demir alımı, taşınımı ve demir homeostazının düzenlenmesiyle demir metabolizmasında önemli yere sahip bir gendir (Bogdan vd., 2016).

Trensferin reseptörleri, TFRC tarafından kodlanan plazma glikoproteini olarak bilinen TF bağlayarak demir sağlayan bir hücre zarı glikoproteini olduğu bildirilmektedir. Hemoglobin sentezinin ana kaynağı olarak bilinen TF sahip olduğu iki spesifik bölge sayesinde Fe^{+3}

iyonlarını bağlayan serum proteini olarak görev almaktadır. Ayrıca demir alımı sisteminde görev alan iki alt transferrin reseptörü bulunmaktadır bunlar; transferrin reseptörü 1 (TfR1) ve transferrin reseptörü 2 (TfR2). Bunlardan TfR 1'in hemen her hücrenin yüzeyinde bulunan homodimetrik tip 2 transmembran glikoproteini olduğu bildirilmektedir. TfR2 ele alındığında ise genel olarak karaciğerde bulunduğu bildirilmektedir (Shen vd., 2018).

2.5.2 Demir Bileşikleri Formül ve Sembolleri

2.5.2.1 İnorganik Fe Bileşikleri

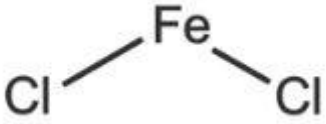
2.5.2.1.1 Oksit ve Hidroksitler

Ferröz oksit (FeO) (Lau vd., 2016), yaygın bir demir oksit olan hematit (Fe_2O_3) (Iordanova vd., 2005), Demir (II, III) oksit (Fe_3O_4) (Song vd., 2025), demir (II) hidroksit ($Fe(OH)_2$) (Liv vd., 2024; Xu vd., 2025), ve demir (III) oksit hidroksit ($Fe(OH)_3$) (Xu vd., 2024; Huang vd., 2025) bileşikleri oksit ve hidroksit grubu bileşiklerini oluşturmaktadır.

Şekil 2.2 Ferrik oksit (Fe_2O_3) sembolü

2.5.2.1.2 Tuz Bileşenleri

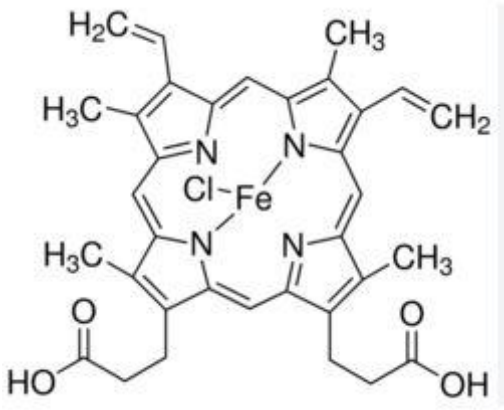
Ferröz klorür ($FeCl_2$) (Yahia vd., 2017), Ferrik klorür ($FeCl_3$) (Musić vd., 2003), $FeSO_4$ (Ferröz sülfat) (Yuan, 2018) bileşikleri Fe mineralinin tuz bileşikleridir.



Şekil 2.3 Ferröz klorür ($FeCl_2$) sembolü

2.5.2.2 Organik Fe Bileşikleri

Hemin (Fe^{3+}-hem) ve Ferrosen Fe $(C_5H_5)_2$



Şekil 2.4 Hemin (Fe^{3+}-hem)

2.5.3 Demirin Biyolojik Önemi ve Etkileri

Demir mineralinin kimyasal formu ve besin maddeler ile birlikte kullanımı metabolizmadaki yerini ve biyoyararlanımını ortaya çıkartmaktadır (Wienk vd., 1999). Biyolojik sistemlerin temel bileşeni olan Fe, O_2 taşınması, hücrelerin çoğalması için oldukça önemlidir (Lynch vd., 2018).

2.5.3.1 Büyüme ve Gelişme Üzerindeki Önemi ve Etkileri

Büyüme ve gelişimin normal seyri açısından Fe minerali oldukça önemlidir ve eksikliğinde embriyo organlarında gelişimin olumsuz etkilenerek malformasyonlara neden olur, ileri düzeyde Fe eksikliğiyle de embriyonun ölümüne neden olduğu bildirilmektedir (Tako ve Glahn, 2011). Demir eksikliği DNA sentezi ve ribonükleotid redüktaz aktivitesini azalttığı, ancak Fe eksikliğinin ortadan kaldırılması ribonükleotid redüktaz aktivitesinin düzenlendiği ve böylece hücre bölünmesinde artış meydana geldiği bildirilmektedir (Furukawa vd., 1992).

2.5.3.1.1 Embriyo Gelişimi Üzerindeki Etkileri ve Önemi

Demirin O_2 taşımasındaki görevi hemoglobin düzeyindeki artışla açıklanabilir. Bu doğrultuda daha önce yapılan bir çalışmada İO organik Fe enjeksiyonunun hemoglobin düzeyinde artışa neden olarak Fe mineralinin embriyo metabolizmasında O_2 taşıma sürecine katkı sağladığı saptanmıştır. Yine aynı çalışma sonuçlarına göre embriyonun lipit metabolizmasındaki farklı etkileri ile Fe mineralinin embriyo gelişimi üzerindeki etkileri bildirilmektedir (Abd El-Azeem ve Abdel Rahman, 2022).

2.5.3.2 Metabolizma Üzerindeki Önemi ve Etkileri

Oksijenin taşınması ve depolanmasında görevli hemoglobin (Anderson ve Frazer, 2005) ve miyoglobin proteinlerinin kofaktörü olarak Fe temel mineral görevindedir (Robach vd., 2007). Transferin aracılığıyla Fe^{+3} iyonlarının dokulara taşınması (Rostami vd., 2025).

2.5.3.3 Demir (Fe) Enzimler Üzerindeki Önemi ve Etkileri

Enzimlerde önemli bir ko-faktör görevindeki Fe (Perálvarez-Marín vd., 2021), H_2O_2 parçalanmasında hücresel detoksifikasyon ile katalaz ve peroksidaz enzimleri (Ghosh vd., 2008), triptofan dioksijenaz (Millett vd., 2012), melanin üretiminde görevli tirozinaz (Hedges vd., 2020) ve DNA sentezinde görevli ribonükleotid redüktaz enzimi (Furukawa vd., 1992) Fe enzimleri içerisinde yer almaktadır.

2.5.3.4 Demir (Fe) Diğer Önemli Etkileri

Demir, kanatlı hayvanlarda protein metabolizması üzerindeki önemli etkileriyle beraber bağışıklık sistemi ve antioksidan sistem üzerinde çeşitli önemli etkilere sahiptir (Zhang vd., 2020). Nörotransmitterler aracılığıyla sinir sisteminde sinyal mekanizmasını destekler, steroid hormonlarının sentezinde ve enfeksiyon varlığında bağışıklık savunma sisteminde önemli yere sahiptir (Waqas vd., 2024).

2.6 Etlik Piliçlerde Fe Uygulamaları

2.6.1 Rasyonda Fe Uygulamaları

2.6.1.1 Etlik Piliç Rasyonlarında Fe Uygulamları

Etlik piliç rasyonlarına takviye olarak kullanılan Fe mineralinin Mn metabolizması ve rasyondaki Fe mineralinin ince bağırsakta Mn taşıyıcı ekspresyonu üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yapılan çalışmada, çıkış sonrası ilk 7 gün Fe ve Mn bulunmayan rasyonlarla beslendikten sonra rasgele sekilen 8 günlük yaştaki 900 erkek hayvan seçilerek rasyon programı ayarlanmıştır. Daha sonra 0, 80 ve 160 mg/kg miktarında Fe, 0 ve 100 mg/kg miktarında Mn eklenen temel rasyonlar ile 35 günlük bir besleme programı uygulanmıştır. Sonuçlara göre 21. günde 0 ve 160 mg düzeyinde Fe takviyesi canlı ağırlıkta artış saptanmış, ancak 80 Fe takviyesinden canlı ağırlık artışının etkilenmediği bildirilmektedir. Canlı ağırlık ölçümü 42 yaşta tekrar incelendiğinde 160 mg düzeyinde Fe uygulanan grubun diğer Fe uygulanan gruplara göre canlı ağırlığı azalttığı bildirilmiştir. Genel olarak 160 mg düzeyinde kullanılan Fe grubu 0 ve 80 mg Fe kullanılan gruplar ile karşılaştırıldığında düşük canlı ağırlık artışı ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Serum ve kalpte ölçülen Mn konsantrasyonları 160 mg düzeyinde uygulanan Fe grubunda MnSOD aktivitesi sonuçları doğrultusunda azaldığı bildirilmektedir. Ayrıca rasyonda bulunan Mn miktarından bağımsız olarak artan Fe düzeyinin tibia kemiklerinde ölçülen Mn konsantrasyonlarını azalttığı bildirilmiştir. Ek olarak karaciğer Mn konsantrasyonu, rasyonda Mn takviyesi olan grupta Fe miktarının artmasıyla azaldığı bildirilmektedir. Bağırsaklarda emilen Mn için DMT1 ve FPN1 proteinlerinin kodlanmasında görev alan genlerin ekspresyonu Fe düzeyinden etkilendiği bildirilmiştir. Bu etki ile Mn emiliminin üzerindeki etkinin ortaya çıktığı bildirilmiştir (Bai vd., 2020).

Bu çalışmada, etlik piliç raasyonlarına ilave edilen Fe-LG (lizin ve glutamik asit) formunda yüksek düzey organik Fe'nin büyüme performansı, organ indeksi, serum biyokimyasal özellikler, Fe taşıyıcı mRNA ekspresyonu ve antioksidan üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Rasyona ilave edilen 80 mg/kg Fe büyüme performansına katkı sağladığı fakat 800 mg/kg düzeyinde Fe'nin başlangıçta olumsuz etkiler ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Ayrıca bu düzey ile kalp, dalak, böbrek ve karaciğer organlarının indekslerinin azaldığı bildirilmektedir. Serum biyokimyasal parametrelere göre rasyonda yüksek Fe ilavesinin karaciğer ve böbrek hasarı ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Yine 800 mg düzeyinde rasyon Fe ilavesi ile antioksidan aktivitede azalma ve yüksek karaciğer konsantrasyonları nedeniyle

oksidatif stresin saptandığı bildirilmektedir. Dozları 400 ve 800 mg olarak belirlenmiş gruplardaki hayvanlardan alınan duodenum örneklerinin DMT1 ve FPN1 proteinlerinin regülasyonunda düşüş saptanmıştır. Böylece araştırmacı 800 mg gibi yüksek düzeyde Fe alımının piliçler üzerinde zararlı etkilerinin olabileceğinş ifade etmektedir (Han vd., 2022).

2.6.1.2 Diğer Kanatlı Türlerinde Rasyon Fe Uygulamaları

Yumurtacı tavuk rasyonlarında kullanılan ticari düzeyde inorganik, üçte bir oranında kullanılan ticari inorganik mineral ve organik minerallerin (Fe, Cu, Mn, Zn), üretim performansı, yumurta kalitesi, yumurta sarısı, tibia kemikleri, geç yumurtlama dönemindeki dışkıda iz mineral dağılımını incelemek adına bir çalışma yapılmıştır. Çalışma sonunda, temel rasyona ek verilen inorganik minerallerin yumurta ağırlığı, albümin yüksekliği, kabuk mukavemeti, yumurta sarısında ölçülen Fe miktarını, toplam protein ve kanda alkalin fosfataz aktivitesinde azalma ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Bunlara ek olarak yumurta kaybı ve tüketilen yemin elde edilen yumurtaya oranının arttığı bildirilmiştir. Ayrıca inorganik ve organik mineral içerikli rasyonların, yumurta kalitesi ve yumurta sarısı ve kanda mineral tutma oranını açısından fark gözlemlenmediği bildirilmektedir. Tibia ve dokularda tespit edilen Fe ve Mn mineral konsantrasyonları gruplar arasında ticari inorganik ve organik mineral kullanımının üçte bir oranında kullanılan ticari düzeydeki inorganik mineral grubuna göre önemli ölçüde değiştiği ifade edilmiştir. Yine ticari düzeydeki inorganik mineral grubu ile organik mineral grubunda üçte bir oranında kullanılan ticari inorganik mineral grubuna göre dışkı ile atılan mineral düzeyinin düşük olduğu bildirilmektedir (Qiu vd., 2020).

2.6.1.3 Etlik Piliçlerde İn Ovo Yöntem Fe Uygulamaları

Demir sülfat ($FeSO_4$) kuluçkanın 14. gününde sarı kese ve amniyon keseye enjekte edilen çalışmada büyütmenin 28. gününde canlı ağırlığın %8 oranında arttığı, büyüme ve gelişmeden sorumlu cGH gen ekspresyonunda 7. ve 18. günlerde artış ile sonuçlandığı bildirilmektedir (Goel vd., 2013).

Etlik piliç yumurtalarına in ovo yöntem ile $FeSO_4$ kaynağı kuluçkanın 7. gününde sarı kese üzerinde gelişen amniyon sıvısına 100 µg düzeyinde enjekte edilmiştir. Bu çalışmada büyüme performansı için 0-6. haftalarda yem tüketimi, canlı ağırlık ölçümleri alınmış, karaciğer ve dalak dokularında IGF-1, TGF-β, IL-2 mRNA düzeyleri saptanmış, karaciğerde antioksidan aktivitelerin belirlenmesi için süperoksit dismutaz (SOD), ve glutatyon peroksidaz (GPx)

aktiviteleri tespit edilmiştir. Çalışmanın önemli sonuçları incelendiğinde $FeSO_4$ tek başına in ovo yöntem ile kullanılması önemli etkilere neden olmadığı ancak Fe+Cu olarak kullanımının bağışıklık, antioksidan ve büyüme performansına önemli olumlu etkiler sağladığı bildirilmektedir (Goel vd., 2013).

Etlik piliç yumurtalarına kuluçkanın 7. günü 100 µg Fe-metiyonin şelat ve 50 µg Fe nanopartiküllerin amniyon sıvısına enjekte edilmiştir, ayrıca kuluçka dönemi sonrasında Fe nano folik asit ile desteklenerek yem takviyesi olarak kullanıldığı bildirilmektedir. Çalışmada performans ölçümleri, hemoglobin, toplam Fe bağlama kapasitesi ve serum demirin ölçüldüğü kan analizleri, karaciğer oksidatif stres aktivitesi ve bağışıklık durumu için serum IgG ve IgA seviyelerinin tespiti gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak in ovo yöntem ile uygulanan Fe formlarından nano Fe uygulamasının canlı ağırlığı artırdığı ve biyoyararlanımı iyileştirdiği bildirilmektedir (El-Gogary ve El-Said, 2019).

Nano partikül Fe, Fe alimet şelat ve Fe nano alimet şelat formlarının farklı düzeylerde kuluçkanın 10. gününde sarı kese enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Uygulama sonrası kuluçka performansı, karaciğer demir içeriğinin belirlenmesi ve kanda hemoglobin ölçümleri ile biyokimyasal analizler, karkas özellikleri tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre; karaciğer ağırlığında artış 25 ppm nano Fe grubunda, karaciğer ve serum Fe içeriği yine 25 ppm nano Fe, 100 ppm Fe-Nano-alimet şelat ve 150 ppm Fe-alimet şelat gruplarında en yüksek düzeyde saptanmıştır. Hemoglobin düzeyinin en yüksek değeri yine 25 ppm nano Fe, 100 ppm Fe-Nano-alimet şelat ve 150 ppm Fe-alimet şelat gruplarında saptandığı bildirilmektedir. Kuluçka parametreleri incelendiğinde 50 ppm Fe nano şelat formu %96.88 oranında çıkış gücü, %0.3 ölüm oranı ve %72.73 oranında sağlıklı civciv ile sonuçlandığı bildirilmektedir (Saki vd., 2014).

2.6.1.4 Diğer Kanatlı Türlerinde İn Ovo Yöntem ve Uygulamaları

Sudany ördek yumurtalarına kuluçka öncesi Fe mineralinin inorganik, organik ve nano formu enjekte edilerek kuluçka randımanı, büyüme performansı ve kan parametreleri incelenerek bir çalışma yapıldığı ifade edilmektedir. Enjeksiyon için diğer çalışmalardan farklı olarak kuluçka öncesi tercih edilmiştir ancak enjeksiyonun yapıldığı yumurta bölümü belirtilmemiştir. Enjeksiyon bölgesi için yalnızca yumurtanın geniş ucundan enjeksiyon yapıldı gibi bir ifade kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, demir formlarının kuluçka randımanını etkilemediği, en yüksek hemoglobin düzeyinin 10 µg düzeyinde enjekte edilen organik Fe grubunda olduğu bildirilmektedir. Yine aynı grupta antioksidan kapasitenin Toplam

antioksidan kapasite (TAC) en yüksek olduğu, bütün Fe gruplarında kontrolden anlamlı düzeyde önemli olarak IGF-1 ve T3 yüksek bulunmuş, lipit metabolizması üzerinde Fe mineral formlarının önemli etkilerinin saptandığı bildirilmektedir. Lipit metabolizmasında Fe grupları Yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) düzeyinde artış meydana getirmiş, ancak LDL ve trigliseritleri düşürdüğü bildirilmektedir. Büyüme performansını farklı haftalarda farklı formlardaki Fe mineral gruplarında iyileşme gözlemlendiği bildirilmektedir **(**Abd El-Azeem ve Abdel Rahman, 2022).

2.6.1.5 Kanatlı Hayvanlarda Diğer Fe Uygulamaları

Etlik piliçlerde farklı organik Fe (Fe metiyonin ve Fe proteinat) kaynaklarının ve $FeSO_4$ kaynağının çözelti halinde intravenöz olarak enjekte edilerek dokuların Fe konsantrasyonları ile Fe içeren enzimlerin aktivitelerin ve proteinlerin gen ifadeleri üzerindeki etkilerin saptanması ve Fe mineralinin metabolik kullanımlarının incelenmesini amaçlayan bir çalışma yapılmış, sonuç olarak böbrek ve karaciğer Fe konsantrasyonları, karaciğer Cox mRNA gen ekspresyon düzeyleri ile dalakta FTH1 protein mRNA gen ekspresyon düzeylerinin etlik piliçlere farklı organik Fe kaynaklarının intravenöz enjeksiyonunun yöntem ile kullanımının önemli etkileri bulunduğunu bildirmektedir. Farklı organik Fe kaynaklarının $FeSO_4$ formuna göre önemli etkilere sahip olduğu bildirilmektedir (Lu vd., 2022).

2.7 Çinko (Zn)

Geçiş metalleri arasında yer alan ve atom numarası 30 olan Zn (Barak ve Helmke, 1993) yalnızca Zn^{+2} değerlik durumundadır (Krężel ve Maret, 2016).

Yapısında Zn olan bileşikler çinko karbonat ($ZnCO_3$), çinko fosfat ($Zn_3(PO_4)_2$), çinko sülfat ($ZnSO_4$), çinko klorür ($ZnCl_2$), çinko oksit (ZnO), çinko sülfür (ZnS) ve çinko silikat (Zn_2SiO_4) olarak sıralanmaktadır (Barak ve Helmke, 1993). Hava ile reaksiyonu sonucu Zn, ZnO bileşiğini oluşturmaktadır (Chen, 2004).

Çinko klorür ($ZnCl_2$) dezenfektan üretiminde, çinko oksit (ZnO) UV koruması sağlama amacıyla güneş kremlerinde, çinko sülfür (ZnS) floresan özelliğinden kaynaklı ekran teknolojisinde kullanılmaktadır (Greenwood ve Earnshaw, 2012).

Canlı organizmadaki Zn görevleri yüzlerce enzimin yapısında katılmasının yanı sıra DNA metilasyonu ile metallotionein proteinlerinin gen ifadelerine katılma (Oteiza, 2012), kaspaz aktivasyonu ve hücre sağkalımı ile programlı hücre ölümü (apoptozis) süreçlerinde

görevlidir (Chimienti vd., 2001). Kardiyovasküler sistemdeki görevleri ile LDL oksidasyonunun baskılanması sağlanmaktadır (Choi vd., 2018). Alkalen fosfataz enzim aktivasyonu ile kemik mineralizasyonunda artış sağlamaktadır (Seo vd., 2010). Spermatogenezdeki rolü ile üreme sağlığında önemli bir yere sahiptir (Talebi vd., 2013).

2.7.1 Çinko ve Gen İlişkisi

Çinko ilişkili genler oldukça fazladır bu genler;

- Zn alımında görevli SLC39A1 (ZIP1) (Wang vd., 2014),
- Zn atılımında SLC30A3 (ZnT3) geni (Palmiter vd., 2004),
- İnterlökin (IL2) (Prasad, 2008) ve nörolojik fonksiyonlarda (Jafari vd., 2021) görevli Zn genleri,
- Antioksidan sistemde oksidatif stres ilişkili gen süperoksit dismutaz (SOD1) (Fukai, 2009),
- Bağlayıcı protein Zn genlerinin bulunduğu metallothionein (MT) gen ailesi (MT1A, MT2A, MT3) (Baltacı vd., 2018),
- DNA onarımı (PARP1) (Zhou vd., 2019) ve sinyal iletiminde görevli (PRKCA) (Meng vd., 2019) Zn genleri olarak sıralanmaktadır.

2.7.1.1 Embriyo Metabolizmasıyla İlişkili Hepatik Genler

2.7.1.1.1 Hepatik Zn Genleri ve İşlevleri

- Metallotionein genleri, ağır metal toksisitesinde savunma proteini görevinde (Chakraborty vd., 1987),
- Maternal ve adaptif bağışıklık tepkilerinin başlatılmasında görevli toll benzeri reseptör (TLR) (TLR4 ve TLR5) genleri (Nawab vd., 2019),
- Çinko homeostazında Zn^{2+} taşıyıcısı olarak görev yapan Zn taşıyıcı olan ZIP (SLC39A) ve ZnT (SLC30A) genleri (Huang ve Tepaamorndech, 2013) hepatik Zn genleri içerisinde yer almaktadır.

2.7.1.1.2 Çinko ve Metallotionein (MT) Gen İlişkisi

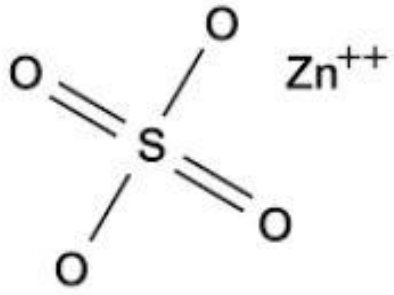
Canlı bünyesinde çinko mineralinin taşınmasında görevli proteinleri kodlayan çeşitli genler vardır ancak Zn hücre içerisinde alımı, taşınması ve bağlanması gibi görevlerde önemli ve düzenleyici bir rolünü üstlenen genlerin MT (Metallotionein) gen ailesinden olduğu bildirilmektedir (Vašák, 2017).

Metallotioninler yapısındaki yüksek metal içeriği ve farklı biyoinorganik yapıları nedeniyle matalloprotein olarak adlandırıldıkları bilinmektedir. Yapılan çeşitli araştırmaların ışığında MT'nin yapısının ki değerliğe sahip ağır metal iyonlarına karşı yüksek düzeyde bağlanma ilgisi olan bir protein olduğu ifade edilmektedir. MT genlerinin sınıflandırılmasına gelindiğinde ise farklı işlevlere sahip izoformları bulunduğu bildirilmektedir. Bu izorformlar MT-1, MT-2, MT-3 ve MT-4 izorformlarıdır ve Mr 6000 protein ailesi olduğu bildirilmektedir (Thirumoorthy vd., 2007). Demir ve bakır gibi ağır metallerin toksik düzeyleri serbest radikallerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Metallotiyonin ve Zn serbest radikallerin zararlı etkilerinin önüne geçerek oksidatif hasarın önlenmesine yardımcı olmaktadır (Formigari vd., 2007). Metallotiyonin Zn bağlama proteininin kanatlı hayvanlardaki izoformu böbrek, bağırsak mukozası, pankreas ve karaciğerde bulunduğu bildirilmektedir (Şahin vd., 2009). Dokularda MT konsantrasyonu incelendiğinde en yüksek düzeyinin karaciğer, pankreas, böbrek ve bağırsakta bulunduğu bildirilmektedir (Cousins, 1985; Viarengo vd.,1999).

2.7.2 Çinko Bileşikleri, Formül ve Sembolleri

2.7.2.1 İnorganik Zn Bileşikleri

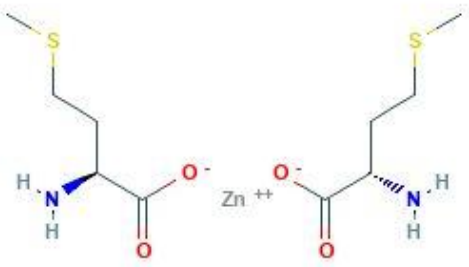
Çinko Sülfat ($ZnSO_4$), Çinko oksit (ZnO)



Şekil 2.5 Çinko sülfat bileşiğinin kimyasal yapısı

2.7.2.2 Organik Zn Bileşikleri

Çinko metiyonin ($C_{10}H_{20}N_2O_4S_2Zn$)



Şekil 2.6 Çinko metiyonin kimyasal yapısı (National Medicine Of Library, 2025)

2.7.3 Çinkonun Biyolojik Önemi ve Etkileri

Enzimatik reaksiyon süreçlerinde kofaktör olarak görev yapmasının (Vallee ve Auld, 1990) yanı sıra Zn, sitokin üretimi için T hücrelerinin aktivasyonunda da önemli görevleri bulunmaktadır (Rink ve Kirchner, 2000).

2.7.4 Çinko Enzimleri ve Görevleri

Peptid bağı hidrolizi ile protein sindiriminde görevli olan Karboksipeptidaz A (CPA) enzimi (Wang vd., 2009), oksidatif stres etkilerinin azaltılmasında Cu/Zn süperoksit dismutaz enzimi (Liu vd., 2002), DNA ve RNA polimeraz olarak nükleik asit sentezi (Aoki ve Kimura, (2004) Zn mineralinin enzimlerdeki ilişkisini açıklamaktadır.

2.7.5 Kanatlı Embriyosu Üzerinde Zn Mineralinin Etkileri

Embriyonik dönemde büyüme, gelişme ve metabolizma üzerinde Zn mineralinin önemli etkileri bulunmaktadır. Embriyo gelişimi sırasında hücre bölünmesi için gerekli DNA ve RNA sentez enzimleri için Zn minerali önemli bir kofaktör görevindedir (Gao vd., 2021). Embriyo kemik gelişimi için alkalen fosvataz (ALP) aktivitesi için Zn minerali elzemdir (Santos vd., 2023).

Çinko eksikliği durumumda malformasyonlar (Blamberg vd., 1960), antioksidan sisteminin bozulması ile karaciğer oksidatif strese neden olduğu (Gao vd., 2021) ve embriyonik ölümlerin gerçekleştiği bildirilmektedir (Blamberg vd., 1960).

2.7.6 Etlik Piliçlerde Zn Uygulamaları

2.7.6.1 Etlik Piliç Rasyonlarında Zn Uygulamaları

Sıcaklık stresi altında 28 gün büyütmeye alınan etlik piliçlerde, sıcaklık stresi nedeni ile oksidatif stres ve inflamasyon altındaki etlik piliçlerde sistemik Zn homeostazisindeki değişiklikler ve düzenleyici mekanizmanın araştırılması konusu incelenmiştir. Sıcaklık stresinden dolayı Zn metabolizmasının düzenlenmesinde Zn taşıyıcılarının ve metalotiyonein proteinlerinin rolünün yenilikçi bir konu olduğunu bildirilmektedir. Sonuç olarak sıcaklık stresi altında Zn miktarının serum, tibia, karaciğer ve jejunumda artış sağladığı ayrıca yeniden dağıtıldığının gözlemlendiği bildirilmiştir. Sıcaklık stresi ile karaciğer ve jejunumda Zn metabolizmasının değiştiği belirtilmiştir. Genel anlamda bu çalışma, sıcaklık stresi nedeniyle Zn homeostazisinin yeniden düzenlendiği, Zn taşıyıcıları ve metalotiyonein proteininin karaciğer ve jejunumdaki rolünün belirlendiğini doğruladığı bildirilmiştir (Xiao vd., 2022).

Kanatlı rasyonlarına ilave edilen yüksek miktarda Zn ve Fe minerallerinin yumurtadaki miktarlarını önemli ölçüde artırmadığı bildirilmektedir. Zn ve Fe minerallerinin yumurta dağılımının önemli bir miktarı yumurta sarısı granüllerinde bulunmaktadır. Böylelikle yumurta sarısının gerekli iz minerallerin birikimini meydana getiren en önemli yapı olduğu anlaşılmaktadır (Richards, 1997).

Bir diğer çalışmada 25 ppm düzeyinde organik Zn yem takviyesinin büyüme ve deri kalınlığına etkisinin olmadığı tespit edilirken but etinde ölçülen Zn miktarında artış tespit edilmektedir (Salim vd., 2012).

Abd El-Hack vd. (2024) çalışmasında farklı düzeylerde organik nano Zn kaynağının 7, 21 ve 38 günlük yaştaki etlik piliçlerde karaciğer ağırlığında kontrole göre önemli bir etki meydana getirdiği, nano Zn takviyesinin düşük kan kolesterol, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve abdominal yağ oranlarında düşüş meydana getirdiği ve bağışıklığın desteklendiği bildirilmektedir.

2.7.6.2 Diğer Kanatlı Türlerinde Rasyon Zn Uygulamları

Japon bıldırcın rasyonlarında çinkonun farklı formlarının (nano, organik ve inorganik) kullanıldığı bir uygulama ile çinkonun üreme özellikleri ve kuluçka randımanı üzerindeki etkilerinin incelendiği bildirilmektedir. Bıldırcınlar dört ana ve dört alt gruba ayrılmış. Araştırmada uygulamalar 1-35 ve 36-60 günlük süreleri kapsamaktadır. Temel rasyona karşılık kontrol grubu hariç diğer gruplarda çinko takviyesi yapılmış, çinko oksit, nano çinko oksit ve çinko metiyonin muamele gruplarının temel rasyonlarına ilave edilmiştir. Yukarıda verilen periyotlara göre çinko takviyesi ilk periyot için 20 mg/kg ve 50 mg/kg olarak ayarlanmış ve böylece deney için rasyon planı sağlanmıştır. Bu deneyin sonuçları incelendiğinde testislerde histolojik değişikliklerin görüldüğü, çinko metiyonin olan organik çinko grubunda testosteron konsantrasyonlarının, kloakal bez boyut indeksinin, çıkış gücü ve erken dönem ölüm oranının kontrole göre önemli olduğu bildirilmektedir. Yine aynı grup baz alındığında çıkış ağırlıkları konrol grubuna göre önemli derecede yüksek olduğu bildirilmiştir (Khoobbakht vd., 2018).

Erkek bıldırcın rasyonlarına ilave edilen nano çinkonun 50 mg/kg düzeyi canlı ağırlık artışının önemli olduğu bildirilmektedir. İncelenen serum parametrelerinde ise kolesterol, kalsiyum, fosfor ve toplam protein düzeylerinde nano Zn düzeylerinin etkisinin olmadığı belirtilmektedir. Diğer sonuçlara göre erkek bıldırcınların rasyonlarına ilave edilen nano Zn serum glikoz düzeyinin arttığı ve serum glikoz düzeyinin ise önemli düzeyde azaldığı bildirilmektedir (Sevim ve Olgun, 2021).

Damızlık bıldırcın rasyonlarında kullanılan inorganik ZnO yerine nano ZnO ilave edilerek yumurta özellikleri, kuluçka parametreleri, sperm kalitesi ve karaciğer üzerindeki etkilerinin incelenmesine yönelik yapılan bir çalışmada, bulgular incelendiğinde rasyonda uygulanan Zn mineralinin nano formu yumurtada yalnızca sarı renginde önemli bir etkinin tespit edildiği bildirilmektedir. Sperm bozukluk morfolojisi bakımından da önemli bir sonuç elde edilmediği bildirilmektedir. Nano ZnO uygulanan grupta yandan çıkım oranında düşüş, yüksek döllülük oranı ve erken embriyonik ölümlerde artışın meydana geldiği çalışma sonuçlarınca bildirilmektedir. Karaciğer dokularının incelenmesi sonucunda nano ZnO kullanılan grupta karaciğer dokularında hepatositlerde yağ vakuollerinin yoğun olduğunu ve karaciğerde yüksek düzeyde yağlanma ile sonuçlandığı bildirilmektedir. Genel çalışma sonuçlarına göre olumsuz etkileri ve maliyeti nedeniyle rasyona ilave edilen nano ZnO bileşiğinin uygun olmadığı bildirilmektedir (Tatlı vd., 2019).

Bitki ekstraktları kullanılarak elde edilen nano partikül Zn ve diğer farklı Zn kaynaklarının bıldırcınlarda canlı ağırlık, yem tüketimi, kan parametreleri, yemden yararlanma

oranı, yumurta ağırlığı ve bazı yumurta kalite özellikleri üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışma yapılmaktadır. Çalışmada, rasyona organik Zn, inorganik Zn ve bitki ekstraktları kullanılarak elde edilen nano Zn kaynakları 3 ve 6 mg/kg düzeylerinde kullanılmaktadır. Çalışma sonuçları incelendiğinde canlı ağırlık bakımından gruplar arası önemli farkların olmadığı bildirilmektedir. Ancak canlı ağırlık artışı incelendiğinde en yüksek değerlerin bitki ekstraktı kullanılarak elde edilen nano partikül Zn mineralinin 3 ve 6 mg/kg düzeylerinde tespit edildiği bildirilmektedir. Yumurta verimine ait sonuçlarda ise Zn takviyelerinin tamamında verimin arttığı ve en düşük yumurta veriminin kontrol grubunda tespit edildiği bildirilmektedir ve yine en yüksek yumurta verimi nano Zn grubunun her iki düzeyinde tespit edildiği bildirilmektedir. Yem tüketimi, FCR ve yemden yararlanma oranı incelendiğinde yine en yüksek değerlerin bitki ekstraktlarından elde edilen nano partikül Zn gruplarında olduğu bildirilmektedir. Çalışma sonuçlarına göre nano Zn herhangi bir toksik etkiyle sonuçlanmadığı bildirilmektedir (Ülger ve Mahmood, 2023).

Bir diğer araştırmada ise rasyonda Zn kaynaklarının ve düzeylerinin antioksidan sistem ve yağ metabolizması üzerindeki etkisi incelenmektedir. Araştırmada MT mRNA gen düzeyi sonuçları incelendiğinde mRNA ekspresyonuna etkisinin uyluk ve göğüs kasında olmadığı ancak karaciğer üzerindeki etkisinin önemli olduğu bildirilmektedir (Liu vd., 2015).

2.7.6.3 İn Ovo Yöntem Zn Uygulamaları

Etlik piliç yumurtalarına kuluçkanın 18. gününde $ZnSO_4$, çinko metiyonin, nano Zn oksit mineral formlarının iki ayrı deney olarak farklı düzeylerde amniyon keseye enjekte edilmesiyle kuluçka randımanı, bağışıklık tepkisi ve MUC2 gen ekspresyon düzeyinin saptanması amaçlanmıştır. Uygulama sonucunda ilk deneyde nano Zn ve Zn metiyonin gruplarında çıkış gerçekleşmediği, Çinko sülfat grubunda %26, kontrol ve sham kontrol gruplarında %90 çıkış gücü saptandığı bildirilmektedir. İkinci deneyde ise kontrol grubu %92, düşük düzeyde uygulanan nano Zn %82 dolayında çıkış, çinko metiyoninde ise daha düşük çıkış gerçekleştiği bildirilmektedir. İncelenen bağışıklık tepkilerinde hümoral ve hücresel bağışıklık tepkilerinin gruplar arasında önemli farklar olmadığı, aynı şekilde MUC2 gen ekspresyon düzeyinin hafif regülasyonu ile anlamsız olduğu bildirilmektedir (Jose vd., 2018).

Nano form Zn mineralinin 20, 40, 60, 80 µg olarak farklı düzeylerde kuluçkanın 18. gününde amniyon keseye enjekte edilerek kuluçka randımanı, büyüme performansı ve karkas özellikleri üzerindeki etkilerinin incelendiği bildirilmektedir. Çalışma sonucunda nano Zn enjeksiyonunun çıkış gücünü etkilemediği, civciv ağırlıklarının benzer olduğu bildirilmektedir.

Canlı ağırlık artışının 40 µg düzeyde enjekte edilen nano Zn grubunda olduğu, incelenen karkas özelliklerinden kesim verimi özelliğinin en yüksek değeri 80 µg nano Zn grubunda saptandığı bildirilmektedir (Joshua vd., 2016).

İn ovo enjeksiyonunda en uygun embriyonik yaş ve Zn dozunu belirlemek için yapılan bir çalışmada kuluçkanın 3, 6, ve 9. günlerinde 50, 100, 150, 200 ve 250 µg düzeyleri uygulanmaktadır. Ayrıca 9 ve 10. günlerinde 50 ve 100 µg Zn sülfat sarı keseye enjekte edilmektedir. Sonuç olarak enjeksiyon için belirlenen en uygun embriyonik yaş kuluçkanın 9. günü olmaktadır. Yüksek seviyelerde (150-200 µg) Zn enjeksiyonu embriyo üzerinde toksik etkilere neden olduğu bildirilmektedir. Diğer sonuçlar ise tibia Zn birikimindeki artış ve karaciğer MT mRNA 50, 150, 200 µg düzeylerinde artış göstermektedir. Bu çalışmada Zn enjeksiyonunun embriyo gelişimi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmektedir (Sun vd., 2018).

İnorganik Zn sülfat 18. günde amniyon keseye enjekte edilmektedir. 42. günde duodenum gelişimi, 7. günde ise jejenum ve kalp gelişimini artırmaktadır. Tibia morfometri ölçüm farkları anlamlı olarak tespit edilmektedir. Canlı ağırlıkta meydana gelen farkın ise önemsiz olduğu bildirilmektedir (Sahr vd., 2020).

Kuluçkanın 18. gününde hava kesesine enjekte edilen 60 mg inorganik Zn enjeksiyonunun 1-21. günler arasında canlı ağırlık üzerinde önemli bir etkinin olmadığı fakat 35. günde canlı ağırlık düzeyinin önemli olduğu tespit edilmektedir. Kanda IgG düzeyindeki farkın önemli olduğu bildirilmektedir (Kim ve Kang, 2022).

Zn sülfat tuzu 500 µg düzeyinde 14. günde sarı kese ve amniyon kese uygulaması yapılmaktadır. Kuluçka randımanında %9-12 oranında düşüş, somatotropin gen ekspresyonunda 18. günde artış meydana geldiği, IGF-I gen ekspresyonunda 18. günde ve IGF-I gen ekspresyonunda 20. günde arış gözlemlenmektedir. Bursa ağırlığının 20. günde arttığı ve timüs ağırlığında da artış gözlemlendiği ve IL-6 gen ekspresyonunda düşüş meydana geldiği bildirilmektedir (Goel vd., 2016).

2.7.6.4 Diğer Kanatlı Türlerinde İOE Zn Uygulamaları

Kuluçkanın 14. gününde bıldırcınlara amniyon kese yoluyla farklı düzeylerde (20 ve 40 µg) 0.2 ml Zn-glisin enjekte edilmektedir. Kuluçka sonrası performans parametreleri ve dokulardaki Zn konsantrasyonuna ilişkin sonuçlar incelenmektedir. Deney sonrası elde edilen sonuçlara göre yetiştirme periyodunda canlı ağırlık, canlı ağırlık artışı, yem tüketimi, yemden yararlanma oranı ve ölüm oranına Zn-glisin içeriğinin etkisinin olmadığı fakat çıkışta ölçülen

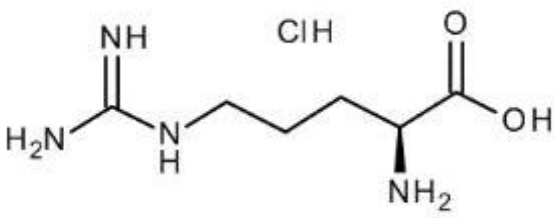
canlı ağırlığa etkisinin olduğu hatta bu etkinin en yüksek düzeyinin 20 µg düzeyi olduğu bildirilmektedir. Yetiştirme sonu ölçümleri incelendiğinde karkas randımanı, kalp, pankreas ve karaciğer oranlarına da etkisinin olmadığı bildirilmektedir. İncelenen serum mineral konsantrasyonlarında Ca, Zn ve P mineralleri bakımından etkisinin olmadığı ancak Mg düzeyinin önemli olduğu bildirilmektedir. Yetiştirme periyodu sonuna kadar incelenen karaciğer mineral konsatrasyonu sonuçlarına göre verilen Zn-glisin karaciğerde Zn, Ca ve Mn düzeylerine etkisinin önemli olduğu bildirilmektedir. Kemik mineral konsantrasyonu incelendiğinde Zn-glisin enjeksiyonu bıldırcın kemiklerinde Ca düzeyine etkisi önemli olarak tespit edilmekte fakat diğer minerallere etkisinin önemsiz olduğu bildirilmektedir (Abdulqader ve Olgun, 2018).

2.7.6.5 Kanatlı Hayvanlarda Diğer Zn Uygulamaları

Farklı Zn kaynaklarının İntravenöz olarak kullanıldığı bir çalışmada MT gen ekspresyonunun pankreasta incelenmesi gerçekleştirilmektedir. Sonuçlar ise Zn kaynaklarının kullanıldığı gruplarda 6. ve 12. günde pankreasta mRNA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunduğu bildirilmektedir. MT gen ekspresyonunun genel olarak önemli ölçüde yukarı düzenlendiği bildirilmektedir bu da verilen çinko kaynaklarının biyoyararlanımı ile ilişkilendirildiği bildirilmektedir (Shen vd., 2013).

2.8 L-Arjinin

L-Arjinin ($C_6H_{14}N_4O_2$), protein sentezinde önemli bir ham madde görevinde olmanın yanı sıra poliaminlerin, nitrik oksit ve kreatin gibi maddelerin sentezinde ve metabolik olaylar, antioksidan mekanizma gibi süreçlerde de önemli rolü bulunmaktadır (Liu vd., 2024).



Şekil 2.7 L-Arjinin kimyasal yapısı

2.9 Organik Minerallerin Kimyasal Sentezi

Organik mineral formu 1 mol metal atomu ile 1-3 mol amino asit reaksiyonu sonucu organik formunu almaktadır ve şelat miktarı 800 Dalton olması gerektiği bildirilmektedir (Vieira, 2008).

3. MATERAL VE YÖNTEM

3.1 Deneme Materyalleri

3.1.1 Yumurta Materyalleri

Bu çalışmanın deneme aşaması Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan kuluçka ünitesinde 21 günlük kuluçka süre ile tamamlanmıştır. Çalışma, in ovo enjeksiyon (İOE) uygulamasından 1.5 gün sonra (kuluçkanın 16. ve 19. günlerinde) aynı saatte ve kuluçka süresi tamamlandıktan sonra çıkış yapan civcivler kuruduktan sonra 3 saat sonra tüm ölçümler yapılmıştır. Çalışma materyali olarak yedi gün depolanmış kuluçkalık yumurtalar en küçük yumurta ağırlığı 50.62 ve en büyük yumurta ağırlığı 79.19 olmak üzere ortalama yumurta ağırlığı 64.70 gr olan ROSS PM 308 genotipine ait 43 haftalık yaştaki ticari bir etlik damızlık firmasından temin edilmiştir. Toplam 1222 adet kuluçkalık yumurta deneme materyali olarak kullanılmıştır.

3.1.2 Yumurta Bileşimi ve Mineral Madde Düzeyleri

Kuluçka öncesi 5 adet yumurta örneğinde besin madde (kuru madde, su, ham yağ ve ham kül) içeriği belirlendi. Daha sonra yumurtanın sarı, ak ve kabuk örneklerinde mineral madde analizi yapılarak mineral madde düzeyleri saptanmıştır. Yumurta ham besin madde % ile yumurtanın sarı, ak ve kabuk mineral madde düzeylerinin ortalaması Çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Kuluçkalanacak yumurtaların bileşimi ve mineral madde düzeyi

Besin Madde Bileşimi	**Sarı**	**Ak**	**Kabuk**
Kuru Madde, %	52.81	15.45	84.75
HK, %	3.53	5.48	94.26
HY, %	57.92	-	-
Ca, ppm	1867.85	1157.69	58332.2
Fe, ppm	86.97	50.07	22.19
Mg, ppm	298.43	705.3	1117.37

Çizelge 3.1 Kuluçkalanacak yumurtaların bileşimi ve mineral madde düzeyi (devam)

Besin Madde Bileşimi	Sarı	Ak	Kabuk
Mn, ppm	4.81	4.93	2.60
P, ppm	8473.9	6791.7	1693.8
Zn, ppm	74.60	19.14	9.45

3.2 Embriyo ve Civciv Materyali

Ticari bir firmadan temin edilen 1200 adet kuluçkalık yumurtanın kuluçkalanmasından sonra gelişimi devam edem embriyo ve bu yumurtalardan çıkan civcivler materyal olarak kabul edilmiştir.

3.2.1 Kuluçka Makinesi

Kuluçka makinesi olarak, 1280 kapasiteye sahip kombine kuluçka makinesi (Çimuka T1280 C, Ankara, Türkiye) kullanılmıştır. Kuluçka süresince makinenin sıcaklık, nem, barometrik basınç düzeyleri PCE-THB 40 cihazı ile kayıt altına alınmıştır. Kuluçka boyunca kuluçka makinasının bulunduğu ortam ve makine içi ortamına ait ölçüm değerleri (PCE-THB 40, Almanya) cihazı ile 1. günden 21. güne kadar dakikada bir ölçüm kaydeden cihazla kayıtlar elde edilmiştir. Çizelgelerde günlük ortalama değerler sunulmuştur.

Kuluçkahane ortamına ait basınç, oransal nem, sıcaklık değerlerinin günlük ortalaması çizelge 3.2.'de verilmiştir. Kuluçka makinesine ait aynı ölçümlerin ortalama değerleri Çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Kuluçka dönemi süresince kuluçkahaneye ait oransal nem, sıcaklık ve basınç değerlerine ait ortalamalar

	Sıcaklık	Oransal nem	Basınç
Embriyonik yaş (Gün)	ºC	%	mmhg
1-8	19.55092	67.97771	624.1167
9	19.90600	64.87000	623.9680
10	19.19583	71.08542	624.2653
11	20.02083	68.94514	624.9750
12	20.53403	67.11042	626.4271

Çizelge 3.2 Kuluçka dönemi süresince kuluçkahaneye ait oransal nem, sıcaklık ve basınç değerlerine ait ortalamalar (devam)

	Sıcaklık	**Oransal nem**	**Basınç**
13	20.73056	70.02708	626.1910
14	20.55625	71.32569	624.3722
15	20.54236	76.35347	622.0181
16	20.65764	77.90139	618.4729
17	20.10964	79.67711	616.2169
18	18.99121	71.30989	625.4901
19	19.80278	71.57361	624.5569
20	19.71667	67.99444	618.4354
21	20.23924	70.90253	618.8013

Çizelge 3.3 Kuluçka süresince kuluçka makinasının oransal nem, sıcaklık ve basıncının ortalama değerleri

	Sıcaklık	**Oransal nem**	**Basınç**
Embriyonik yaş (Gün)	ºC	%	mmhg
1	34.78543	58.61012	568.1149
2	37.23162	56.99598	624.5973
3	37.87208	57.43222	626.301
4	37.91514	57.24500	625.9472
5	37.40889	57.73111	624.1492
6	37.08100	59.67783	620.6335
7	37.07889	59.54125	618.1857
8	37.09954	59.05069	615.8805
9	36.49483	58.03276	615.0310
10-14	36.84914	58.27979	619.7314
15	37.20345	58.52682	624.4318
16	37.23014	58.70069	625.1193
17	36.91444	57.12903	624.1753
18	37.47069	58.15958	618.1967
19	38.64737	58.61235	618.4351
20	37.87167	56.81903	619.8021
21	30.21571	56.59651	623.2494

3.2.2 Deneme Boyunca Kullanılan Cihazlar

Deneme süresince ağırlık ölçümleri için Mitutoyo marka 0.01mg hassasiyetli ve AND marka 0.0001 g hassasiyetli terazi kullanılmıştır. Yumurta kalite özellikleri ölçümleri için Mitutoyo marka 0.01mm hassasiyetli üç ayaklı mikrometre ölçüm aleti kullanılmıştır. Yumurta kalite özellikleri ve kemik ölçümleri için Mitutoyo marka 0.01mm hassasiyetli sürgülü dijital kumpas kullanılmıştır. Mitutoyo marka mikrometre, termometre (Ebro TFI 250, 85055 Ingolstadt, Almanya) cihazı, PCE-PHD1 marka PH metre, PCE-THB 40 nem, basınç ve sıcaklık ölçer cihazı, 0.001mm/0.0001'lik Mitutoyo marka elektronik dijital mikrometre ve ölçeği 0.1 mm olan sabit bir cetvel kullanılmıştır.

Ayrıca Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FI–TR), Taramalı elektron mikroskobu (SEM), Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi (ELISA), Indüktif Eşleşmiş Plazma Atomik Emisyon Spektroskopisi (ICP-OES), Atomik Absorbsiyon Spektroskopisi (AAS), Heidolph buharlaştırma cihazı, Ultraviyole-Görünür Spektroskopi (UV-Vis), Real Time PCR cihazları kullanılmıştır.

3.2.3 Kimyasal Materyaller

3.2.3.1 Nano Partikül Mineral Hazırlama Aşaması ve Kullanılan Kimyasallar

a. İron (II) sulfate heptahydrate

Denemede kullanılan demir (Fe) nano partiküllerinin hazırlanması aşamasında Merck marka İron (II) sulfate heptahydrate ürünü saf suda çözdürülerek kullanılmıştır.

b. Zinc Sulfate heptahydrate

Denemede kullanılan çinko (Zn) nano partiküllerinin hazırlanması aşamasında Merck marka Zinc Sulfate heptahydrate ürünü saf suda çözdürülerek kullanılmıştır.

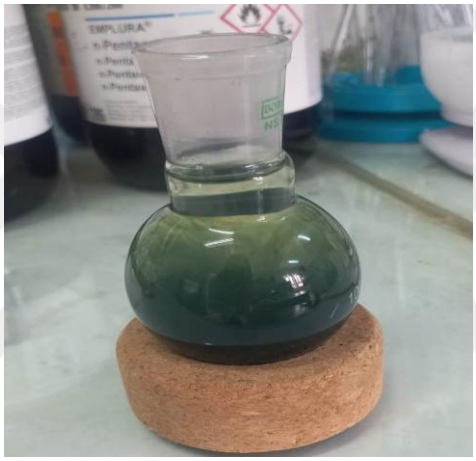
c. Sodium borohydride (Merck KGaA, Almanya).

3.2.3.1.1 L-Arjinin

L- Arjinin HCl, Haitian Amino Acid firmasından (Shijiazhuang Haitian Amino Acid Co., LTD. Çin) temin edilmiştir. Toz formundaki L- Arjinin saf suda çözdürülerek kullanılmıştır.

3.2.3.1.2 Nano Partikül Hazırlama Aşaması

Fe L-Arjinin nanokatalizörü, metal tuzu ve L-Arjinin su ortamında emdirme-indirgeme yöntemi kullanılarak sentezlendi ve bu protokolde indirgeyici ajan olarak sodyum borhidrür (NaBH4) kullanıldı. Bu sentez protokolüne göre, 2.5 mmol L-arjinin 50 mL su ortamına alınmış ve üzerine 0.25 mmol $FeSO_4$ x H_2O tuzu çözeltisine eklenmiştir. Ardından yaklaşık bir saat boyunca 100 ˚C'de kaynatıldıktan sonra üzerine 1.25 mmol NABH4 eklendi. NaBH4 ilavesinden sonra karışım 2 saat 90 ºC'de karıştırıldıktan sonra çözelti başlangıçta olduğundan farklı bir renk değişimi oluşuncaya kadar beklenmiştir. Bu değişim, metal nanopartiküllerin oluşumunun bir işareti olarak yorumlanmıştır (Sunatkari vd., 2015).



Şekil 3.1 İron (II) sulfate heptahydrate çözdürme aşaması

Şekil 3.2 L-Arjinin eklendikten sonra Nano Fe için reflux işleminin gerçekleştirilmesi

Zn L-Arjinin nanokatalizörü, metal tuzu ve L-Arjinin su ortamında emdirme-indirgeme yöntemi kullanılarak sentezlendi ve bu protokolde indirgeyici ajan olarak sodyum borhidrür (NaBH4) kullanıldı. Bu sentez protokolüne göre, 2,5 mmol Larginin 50 mL su ortamına alınmış ve üzerine 0,25 mmol $ZnSO_4$ x H_2O tuzu çözeltisine eklenerek yaklaşık bir saat boyunca 100 ºC'de kaynatıldıktan sonra üzerine 1.25 mmol NaBH4 eklendi. NaBH4 ilavesinden sonra karışım 2 saat 90 ºC'de karıştırıldıktan sonra çözelti başlangıçta olduğundan farklı bir renk değişimi oluşuncaya kadar beklenmiştir. Bu değişim, metal nanopartiküllerin oluşumunun bir işareti olarak yorumlanmıştır.

Şekil 3.3 Nano Zn için reflux işlemi

Fe+Zn L-Arjinin nanokatalizörü, metal tuzu ve L-Arjinin su ortamında emdirme-indirgeme yöntemi kullanılarak sentezlendi ve bu protokolde indirgeyici ajan olarak sodyum borhidrür (NaBH4) kullanıldı. Bu sentez protokolüne göre, 2,5 mmol Larginin 50 mL su ortamına alınmış ve üzerine 0,25 mmol $ZnSO_4$ x H_2O ve Fe SO_4 x H_2O tuzu çözeltisine eklenmiştir. Ardından yaklaşık bir saat boyunca 100 C'de kaynatıldıktan sonra üzerine 1.25 mmol NaBH4 eklendi. NaBH4 ilavesinden sonra karışım 2 saat 90 ºC'de karıştırıldıktan sonra çözelti başlangıçta olduğundan farklı bir renk değişimi oluşuncaya kadar beklenmiştir. Bu değişim, metal nanopartiküllerin oluşumunun bir işareti olarak yorumlanmıştır.

Şekil 3.4 Nano Fe+Zn sentez aşaması

Şekil 3.5 Nano Fe, Zn, Fe+Zn solüsyonları ve saf su

3.3 Yöntem

3.3.1 Deneme Deseni

Toplam 1222 adet kuluçkalık yumurtanın 1200 adedi deneme desenini oluşturan gruplarda kullanılmıştır, geriye kalan 22 adet kuluçkalık yumurtada ise deneme gruplarının kuluçkaya girişinden bir gün önce 7 adedinde ve kuluçkaya girişinden 1 saat önce 5 adet yumurtanın iç ve dış kalite özellikleri saptanmıştır. Kalan 10 adet yumurtadan 5'i desikatöre alınarak kabuk gözenekliliği hesaplaması için kullanılmış, diğer 5 yumurta ise besin madde içeriğinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Kuluçkaya girişten önce gruplar her biri farklı

kodlama olarak rastgele seçilen yumurtalar numaralandırılarak yumurta ağırlık ölçümleri saptandı.

Kuluçkadan önce yumurtanın dış kalite özellikleri; (yumurta ağırlığı, şekil indeksi, hava boşluğu çapı, kabuk yüzey alanı, kabuk yoğunluğu, birim yüzey alanı başına kabuk ağırlığı, kabuk ağırlığı, oransal kabuk ağırlığı, kabuk geçirgenliği, kabuk por sayısı ve por çapı, kabuk kalınlığı) ve iç kalite özellikleri; ak ve sarıya ait kalite özellikleri (ak ağırlığı, sarı indeksi, ak indeksi, sarı yüksekliği, sarı çapı, sarı rengi, sarı ağırlığı, sarı ve ak pH'sı, koyu ak yüksekliği, koyu ak uzunluğu ve genişliği) ölçülmüştür (Reddy vd., 1981). Tüm kalite özellikleri saptandıktan sonra kabuk, ak ve sarıda toplam iz mineral düzeyleri; kuru madde (KM) düzeyleri saptandıktan sonra sarıda ham yağ (HY) düzeyleri belirlenmiştir. Ak ve sarıda Fe, Zn, Mn, Ca, P düzeyleri, kabukta ise Ca, Mg, Fe, P, Mn mineral düzeyleri ölçülmüştür.

Deneme deseni aşağıdaki gibi 9 grup olacak şekilde ve gruplara ait minerallerin doz ve verilen solüsyon miktarı Çizelge 3.4' te verilmiştir. Tüm enjeksiyon grupları olan saf su, nano partikül Fe ve Zn minerallerinin kullanıldığı gruplar ve Fe+Zn minerallerinin birlikte kullanıldığı kombine gruba in ovo enjeksiyonu (IOE) yöntemi ile sarı keseye (Saki vd., 2014) kuluçkanın 14,5. gününde ve amniyon keseye kuluçkanın 17,5. gününde enjekte edilmiştir. Ayrıca nano partikül formdaki minerallere ek olarak aynı embriyonik yaşlar için enjeksiyon yapılmayan kontrol grubu (K) ve minerallerin verildiği saf su enjeksiyon grupları da deneme deseninde yer almaktadır. Kontrol grubu dışındaki bütün enjeksiyon gruplarının ilgili enjeksiyon noktasından aynı uygulama sitesine enjeksiyon gerçekleştirilmiştir.

İncelenen litaratür sonuçları ve seçilen embriyonik yaşlardaki fizyolojik olgular dikkate alınarak enjeksiyon uygulanan embriyonik yaşlar belirlenmiştir. Kuluçkanın 14,5. günü kuluçka döneminin başlangıcından orta safhasına doğru sarı kesede bulunan mineral maddelerin miktarındaki azalmadan dolayı embriyo için yeterli mineral madde miktarının sağlanamadığı belirtildiğinden (Yair ve Uni, 2011), bu çalışmada enjeksiyon günü 14.5 gün olarak tercih edilmiştir Kuluçkanın 17. gününde ise sarı kese embriyo tarafından abdomene doğu çekilmektedir. Bu nedenle embriyo gelişiminin son aşaması için enjeksiyonun amniyon keseye uygulanması daha uygun olduğu bildirildiğinden (Abdulqader vd., 2017), ve bununla beraber embriyonik yaşın 17. gününde embriyo ilk defa oral yol ile amniyon kese aracılığıyla beslenmeye başladığından (Uni ve Ferket, 2003) dolayı ikinci enjeksiyon yaşı 17.5. gün olarak seçilmiştir.

Enjekte edilen nano mineral düzeyleri; demir için 80 µg (Goel vd., 2013; Bakyaraj vd., 2012) çalışmalarına göre belirlenmiştir. Çinko için belirlenen 80 µg doz düzeyi (Jose vd., 2018; Joshua vd., 2016) çalışmalarına göre belirlenmiştir ve 0.5 ml saf su içerisinde kombine

enjeksiyon grubu yani Fe 80 µg + Zn 80 µg (Bakyaraj vd., 2012) çalışmasına göre belirlenmiştir.

Verilen solüsyonun düzeyleri; aşağıda kodları verilerek oluşturulan gruplar: kuluçkanın 14,5. gününde S_1 grubuna sarı keseye 0.5 ml saf su; S_2 grubuna amniyon keseye 17,5. günde 0.5 ml saf su,

Fe_1 grubuna sarı keseye 14,5. gününde 0.5 ml saf suda 80 µg nano Fe minerali, Fe_2 grubuna amniyon keseye 17,5. günde 0.5 ml saf suda 80 µg nano Fe minerali,

Zn_1 grubuna sarı keseye 14,5. günde 0.5 ml saf suda 80 µg nano Zn minerali, Zn_2 grubuna amniyon keseye 17,5. günde 0.5 ml saf suda 80 µg nano Zn minerali,

$FeZn_1$ grubuna amniyon keseye 14,5. günde 0.5 ml saf suda 80 µg nano Fe+Zn minerali, $FeZn_2$ grubuna 17,5. günde 0.5 ml saf suda 80 µg nano Fe+Zn minerali amniyon keseye enjekte edilmiştir.

Çizelge 3.4 İn ovo enjeksiyonu doz ve solüsyonlar

Enjeksiyon Günleri	**Kontrol (K)**	**Saf Su** (S_1/S_2)	**Fe** (Fe_1/ Fe_2)	**Zn** (Zn_1/ Zn_2)	**Fe+Zn** ($FeZn_1$/ $FeZn_2$)
14,5. gün (sarı kese)	Enjeksiyonsuz	0.5 ml saf su	80 µg Fe/0.5 ml saf su	80 µg Zn/0.5 ml saf su	80µg Fe+80 µg Zn /0.5 ml saf su
17.5. gün (amniyon kese)	Enjeksiyonsuz	0.5 ml saf su	80 µg Fe/0.5 ml saf su	80 µg Zn/0.5 ml saf su	80µg Fe+80 µg Zn /0.5 ml saf su

3.3.1.1 Deneme Deseni Grupları

Çizelge 3.5 Gruplarda tekerrür durumları

Gruplar	**İçerik**	**Tekerrür sayısı**	**Tekerrürde yumurta sayısı**	**Toplam yumurta sayısı**
1	Kontrol	8	17	136
2	S1	8	15	120
3	S2	8	16	128
4	Fe_1	8	17	136

Çizelge 3.5 Gruplarda tekerrür durumları (devam)

Gruplar	İçerik	Tekerrür sayısı	Tekerrürde yumurta sayısı	Toplam yumurta sayısı
5	Fe_2	8	17	136
6	Zn_1	8	17	136
7	Zn_2	8	17	136
8	$FeZn_1$	8	17	136
9	$FeZn_2$	8	17	136

3.3.2 Ölçülen Özellikler

3.3.2.1 Yumurta Kalite Özellikleri

Denemede kullanılan ROSS 308 PM genotipine ait 17 yumurtanın 7 adedi kuluçkadan bir gün önce, 5 adedinde ise kuluçkadan 1 saat önce yumurta kalite özellikleri için kullanılmıştır. Kalan yumurtalardan 5 adet desikatöre alınarak 5 gün boyunca ağırlık Mitutoyo marka 0.01mg hassasiyetli terazi ile sıcaklık, basınç değerleri PCE-THB 40 nem, basınç ve sıcaklık ölçer cihazı ile ölçülerek kayıt altına alınmıştır.

3.3.2.2 Şekil İndeksi

Yumurtalar ağırlık ölçümleri 0.01 mg hassasiyetli terazi kullanılarak tek tek numaralandırıldıktan sonra kayıt altına alınarak 0.01 mm hassasiyetli Mitutoyo marka kumpas ile yumurta genişlik (mm) ve yumurta uzunluğu (mm) ölçümleri alınmıştır. Yumurta şekil indeksinin hesaplanması aşağıdaki formül yapılmıştır (Mueller vd., 1960).

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

Yumurtalarda daha sonra hava boşluğu eni ve uzunluğu 0.01 mm hassasiyetli kumpas yardımı ile ölçülmüştür. Ardından iç kalite özelliklerinin saptanması amacıyla yumurtalar kırılarak düz bir zeminde sarı ve ak yükseklikleri üçayaklı mikrometre, ak eni ve uzunluğu, sarı

çapı dijital kumpas kullanılarak ölçülmüştür. Ardından yumurta sarısı ve akına ait pH ölçümleri pH metre kullanılarak kayıt altına alınmıştır.

$$\text{Kabuk yüzey alanı } (cm^2) = 4.67 * W^{2/3} \quad (3.2)$$

Desikatöre alınan yumurtalarda ve kalite özellikleri için kullanılan diğer yumurtalarda kabuk ıslak ağırlığı tartılarak kabukların bir kısmı mineral analizi için kullanılmış diğer kısmı zarlarından ayrılarak boyama yapıldıktan sonra kalınlığı 0,001mm/0,0001 hassasiyetli elektronik dijital mikrometre ile ölçülerek ortalama kalınlıklar hesaplanarak kayıt altına alınmıştır.

3.3.2.3 Kabuk Geçirgenliği

Desikatöre alınan 5 yumurtada günlük ortalama yumurta su kaybı (günde mg kaybedilen su miktarı, nispi yumurta kabuğu iletkenliği (mg / gün) ve por sayısı, kabuk geçirgenliği (mg/ gün / torr) ölçümleri kayıt altına alınmıştır (Peebles ve McDaniel, 2004).

Yumurtalar desikatöre alınmadan önce ağırlıkları kaydedilmiştir. Daha sonra 24,0 °C'de 624,2 mm Hg'lık bir basınçta desikatör ortamında yumurtanın mg cinsinden kaybettiği su miktarı 5 gün boyunca her gün aynı saatte 0.0001 g hassasiyetli terazide ölçüldükten sonra günlük ortalama su kaybı iç ve dış ortam arasındaki su buharı basınç değişimine (torr) bölünmüştür. Daha sonra ortalama günlük yumurta ağırlık kaybı hesaplanmıştır. Beş gün boyunca desikatör ortamına ait sıcaklık, barometrik basınç, ortalama günlük yumurta ağırlığı kayıt altına alınmıştır. Bu ortam sıcaklığı, barometrik basınç ve günlük yumurta su kaybı değerleri kullanılarak kabuk geçirgenliği hesaplanmıştır.

3.3.2.4 Yumurta Por Sayısı

Yumurtalarda por sayısı ve por çaplarının ölçülmesi için yumurtalar uç kısmından delindikten sonra içerisi boşaltılarak zarlarından ayrılan kabuklar 8 saat boyunca 50 °C'de kurutmaya alınmıştır. Daha sonra 1 L hacimde %70 etanol içerisinde 0.5 g %89 oranında metilen mavisi kristalleri çözdürülerek boya çözeltisi hazırlanarak kurutulan kabukların içerisine dökülerek kurumaya bırakılmıştır (Peebles ve Mcruden, 2004). Kabuklarda por sayısı için hazırlanan 5 bölmeli her bölmesi 0.25 cm^2 alan olacak şekilde bir kâğıt parçası yapılarak bu alanda kabuğun küt, ekvator ve sivri bölümlerine ait por sayıları kayıt altına alınmıştır

(Babacanoğlu vd., 2018). Por çapları kabuğun küt, ekvator ve sivri uçlarından 5 ayrı bölümde bulunan porlar 40x büyütmeye sahip trinokuler başlıklı Nikon SMZ745T marka sterio mikroskop görüntülerinin 1080 p çözünürlükte XCAM Family kamerası ile monitöre aktarılarak por çaplarının ölçümleri Leica ICC50 HD software programı kullanılarak kayıt altına alınmıştır. Kabukların her bölümüne ait 5 ölçümün ortalaması hesaplanarak kaydedilmiştir.

Kalite özelliklerinde kullanılan yumurtalarda sarı, ak ve kabukta kuru madde, ham kül, Fe, Zn, Mn, Mg, Ca, P mineralleri tespit edilmiştir. Ayrıca sarıda ham yağ analizi yapılarak sonuçlar kaydedilmiştir.

Çizelge 3.6 Yumurta kalite özellikleri sonuçları

Yumurta Kalite Özellikleri	
Yumurta Ağırlığı (g)	65.63
Şekil İndeksi (%)	77.72
Ak İndeksi (%)	6.33
Sarı İndeksi (%)	37.71
Kabuk Yüzey Alanı (cm^2)	75.98
Kabuk Geçirgenliği (mg/ gün / tor)	7.83
Yumurta Por Sayısı (por / 0.25cm^2)	24.64
Kabuk Kalınlığı (µm)	0.466
Por Çapı (µm)	129.37
Haugh Birimi	71.88 / A

3.3.2.5 Embriyo, Sarı Kese ve Organ Ağırlıkları

Her iki enjeksiyon gününden bir buçuk gün sonra yani 16 ve 19. günlerde enjeksiyon yapılan saatte her gruptan rastgele seçilen 10 yumurtanın ağırlıkları alınarak kabukları kırılmıştır. Ardından yumurtadan çıkarılan embriyoların uzunlukları 20 cm uzunlukta bir cetvel yardımı ile gaganın uç kısmından ayak orta parmakla tırnağın birleşimine kadar olan kısmından uzunluk ölçülerek kaydedilmiştir. Daha sonra embriyo tartılarak ve servical dislocation işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından sarı kese pens yardımı ile embriyodan ayrılarak sarı kese tartıldı. Daha sonra göğüs kası, bursa fabricius karaciğer, kalp, akciğerler, proventrikülüs + taşlık içerisi

temizlenerek pens yardımı ile dikkatli bir şekilde embriyodan ayrılarak tartılmış ve kayıt altına alınmıştır.

Bu ölçümler Zootekni Bölümü Kimyasal Analiz Laboratuvarında gerçekleştirildi ve aynı ölçümler çıkışta (21.gün) tekrar edildi. Civcivlerden alınan karaciğer örnekleri glikojen analizi ve mRNA analizi için -20°C'de saklanmıştır. Sarı kese ve tüm vücut örnekleri kuru madde, ham kül içeriği, ham yağ içeriği ve mineral madde analizlerinde kullanılmak üzere yine -20°C'de saklanarak analize kadar bekletilmiştir.

3.3.2.6 Kuluçka Sonuçları

Döllülük oranı, çıkış gücü, kuluçka randımanı ve embriyo ölümleri erken (embriyonik yaşın 1-6. günleri), orta (embriyonik yaşın 7-17. günleri) ve geç (embriyonik yaşın 18-21. günleri) ile kabuğu deldiği halde çıkamayan civcivlerin (kabuk altı ölümler) tespit edilerek gruplandırılması işlemi gerçekleştirilmiştir (Tona vd., 2001; Babacanoğlu, 2010).

Döllülük oranı (%) = [(Döllü yumurta / kuluçkaya konan toplam yumurta) x 100] (3.3)
Çıkış gücü (%) = [(Çıkan civciv / Döllü yumurta) x 100] (3.4)
Kuluçka randımanı (%) =[(Çıkan civciv / Kuluçkaya konan toplam yumurta) x 100] (3.5)
Erken ölüm (%) = [(Ölen embriyo/ Kuluçkaya konan toplam yumurta) x 100] (3.6)
Orta ölüm (%) = [(Ölen embriyo / Kuluçkaya konan toplam yumurta) x 100] (3.7)
Geç ölüm (%) = [(Ölen embriyo / Kuluçkaya konan toplam yumurta) x 100] (3.8)
Kabuk altı ölüm (%) = [(Ölen embriyo / Kuluçkaya konan toplam yumurta) x 100] (3.9)

3.3.2.7 Rektal Sıcaklık Ölçümü

Çıkış gününde rastgele seçilen 10 civcivde ağırlıklar alınarak 8 civcivin rektal sıcaklığı kloak içerisine dijital termometrenin probu 1.2 cm kadar yerleştirilerek ölçüm değeri kayıt altına alınmıştır (Chen vd., 2013).

3.3.2.8 Tibia ve Femur Kemiklerinin Ölçümleri

Çıkışta organ ağırlıkları ve diğer ölçümler için -20°C'de saklanan her gruptan 8 civcive ait sağ ve sol kemiklerde ağırlıklar hassas terazi ile alındıktan sonra dijital kumpas yardımı ile kemik uzunluğu ve çaplara ait ölçümler alınmıştır. Tibia ve Femur kemiklerinin vücuttan

ayrılma işlemi öncelikle tibianın alt kısmından patella kısmına kadar çıkarılmış ve üzerindeki doku parçalarından dikkatli bir şekilde temizlenmiştir. Uzunluk ölçümleri için tibia kemikleri Mitutoyo marka 0.01mm hassasiyetli sürgülü dijital kumpas yardımı ile kemiklerin uç kısımlarından uzunlukları ölçülmüştür ve kayıt altına alınmıştır. Ardından tibiadan ayrılan femur kemikleri kalça ekleminden dikkatli bir şekilde ayrılarak üzerindeki doku parçaları temizlenerek uzunluk ölçümleri en uç kısımlar dikkate alınarak kaydedilmiştir. Hatayı minimize etme amacı ile her kemikten üçer ölçüm alınarak kaydedilmiştir. Daha sonra aynı kemik örneklerinde kemiğin merkezi dikkate alınarak dijital kumpas kullanılarak çap ölçümü gerçekleştirilmiştir. Tüm ölçümler üç tekerrür halinde tekrar kayıt altına alınmıştır.

Şekil 3.6 Tibia ve femur ölçümleri

Şekil 3.7 Ölçümü yapılan kemiklerin saklama işlemi

3.3.2.9 Kan Örneklerinin Alınması

Çıkış günü organ ağırlığı ve diğer ölçümler için her gruptan rastgele seçilen 8 hayvan cerrahi işlem yapılmadan alınan kan örnekleri sarı kapaklı biyokimya tüpü (jelli serum ayırma tüpü 5000 IU/ml) içerisine yaklaşık 0,5-1 ml kadar alınmıştır. Tüpler 4-5 defa yavaş bir şekilde

alt üst edilerek Van YYÜ Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü Kimyasal Analiz Laboratuvarında SIGMA (SIGMA 3-30 K, Germany) marka soğutmalı santrifüj cihazı kullanılarak 4 ºC de 2750 rpm devirde 10 dakika santrifüj edildikten sonra çıkan kan serumu eppendorf tüplere aktarılarak -20 ºC de muhafaza edilmiştir.

3.3.2.10 Tüm Vücut Bileşenlerine Ait Analizler

Çıkış günü civcivden yaklaşık üç saat kadar kurumasın izin verildikten sonra her bir gruptan erkek dişi karışık cinsiyete sahip 10 adet civciv üzerinde yukarıda adı geçen işlemlerden sonra servical dislocation sonrası organlar vücuttan çıkarıldıktan sonra kemikler tibia ve femur sağ ve sol olacak şekilde eklem yerlerinden ayrılarak kemik üzerindeki kaslar tüm vücut ölçümünün yapılacağı mineral analizlerine dahil edilmiştir (Babacanoğlu, 2010). Organların ağırlıkları (karaciğer, akciğer dokuları dışında) ölçüldükten sonra kalan vücut örneklerinde kuru madde, ham yağ, ham kül analizleri yapılmıştır.

Vücut bileşimine ait analizlerin yapıldığı aynı civcivlerden ince bağırsak üzerinden kesilerek ayrılan sarı kese karın bölgesinden bağırsak ile birleştiği yerden dikkatli bir şekilde makas yardımı ile ayrılarak hassas terazi ile tartıldı. Sarı kese örnekleri daha sonra kuru madde, ham yağ, ham kül, Fe ve Zn mineral analizlerinin yapılacağı zamana kadar -20 ˚C'de saklanmıştır.

Benzer şekilde aynı örnekler üzerinden elde edilen kan serumları Fe ve Zn mineral analizlerine kadar - 20˚C' de eppendorf tüplerde bekletilmiştir.

Tibia ve Femur kemiklerinin vücuttan ayrılma işlemi öncelikle tibianın alt kısmından patella kısmına kadar çıkarılmış ve üzerindeki doku parçalarından dikkatli bir şekilde temizlenmiştir. Kemiklerde ilgili ölçümler gerçekleştirildikten sonra kuru madde, toplam mineral, Ca ve P mineral analizlerine kadar - 20˚C' de muhafaza edilmiştir.

3.3.2.10.1 Kuru Madde Analizi

Kemik ölçümlerinden sonra kalan vücut parçaları alüminyum kaplarda 0.0001 g hassasiyetli terazi ile tartıldı ve kuru madde işlemi için 105 ºC sıcaklığında bir gece boyunca kurumaya alınmıştır. Kurutma işlemi sonrası tekrar tartılarak bir öğütücü yardımı ile parçalanıp kilitli poşetlere alınmıştır. Daha sonra bu örnekler toplam kül ve ham yağ içeriği için tekrar kullanıldı. Tüm vücutta kuru madde miktarı ve su miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Babacanoğlu, 2010).

$$\text{Kuru madde (\%)} = [(\text{kuru örnek ağırlığı} / \text{örnek ağırlığı}) \times 100] \quad (3.10)$$

$$\text{Su (\%)} = 100 - \text{\% kuru madde} \quad (3.11)$$

3.3.2.10.2 Ham Kül Analizi

Analizde kullanılan krozeler öncelikle sabit tartıma getirilmek amacıyla 105 ºC bir saat etüvde kurumaya alınmıştır. Bir saatin sonunda etüvden alınan krozeler desikatörde soğumaya bırakıldı. Ardından daraları alınarak numaralandırılmıştır. Öğütülmüş ve kurutulmuş tüm vücut örnekleri numaralandırılan krozelere 0,5 g örnek tartıldı. Krozeler daha sonra soğuk fırına alınarak fırın sıcaklığı kademeli olarak artırılır 2-6 saatin sonunda fırın sıcaklığı 500 ˚C'ye getirildi ve 8 saat yakma işlemi gerçekleştirildi. Kül tamamen gri rengini aldığında krozeler fırından alınarak dikkatli bir şekilde desikatörde soğutuldu. Daha sonra krozeler tartılarak tartım değerleri aşağıdaki formül yardımıyla tüm vücutta ham kül düzeyi hesaplanmıştır (AOAC, 2000).

$$\text{Kül (\%)} = [(\text{yanmış örnek ağırlığı} / \text{örnek ağırlığı}) \times 100] \quad (3.12)$$

3.3.2.10.3 Ham Yağ Analizi

Tüm vücutta ham yağ içeriğinin belirlenmesi için eter ekstrakt standart ölçütleri dikkate alınarak belirtilen ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Analiz öncesi ANKOM XT4 yağ fitre torbaları 105 ºC'de 1 saat boyunca kurumaya alınmıştır. Kurutma sonrası filtre torbaları desikatöde soğutulduktan sonra 0,0001 g hassasiyetli terazi yardımı ile tartılarak dara ağırlıkları kayıt altına alınmış ve numaralandırılmıştır. Bu torbalara daha sonra 0,5 g ağırlığında örnek tartılarak filtre torbalarının ağızları dikkatli bir şekilde sıcak mühür kullanılarak kapatılarak tekrar etüve alınmıştır. Torbalar 2 saat sonra etüvden alınarak desikatöre aktarılmış ve soğumaya bırakılmıştır. Soğutulan filtre torbalarının ağırlıkları alınarak ANKOM cihazı içerisindeki bölmeye dizilmiştir. Daha sonra cihaz kapağı kapatılarak eter bölmesine gerekli düzeyde petrol eteri ilave edilmiştir. Ardından cihaz 60 ºC sıcaklıkta 1 saat boyunca çalıştırıldı. Yağ analizi sonrası cihazdan alınan torbalar etüve alınarak 5 saat kurumaya bırakılarak tartılmıştır. Tartımlardan elde edilen sonuçlar aşağıdaki formül kullanılarak ham yağ miktarı hesaplanmıştır (AOAC 960.39).

$$\text{Ham yağ} = [(100 \times (W_2 - W_3)/W_1] \quad (3.13)$$

W_1: Örnek ağırlığı

W_2: Ekstraksiyon öncesi kurutmanın ardından alınan örnek ve filtre torbasının ağırlığı

W_3: Ekstraksiyon sonrası kurutmanın ardından alınan örnek ve torba ağırlığı

3.3.2.11 Mineral Analizi

Çıkışta her gruptan 8 civcivden alınarak -20 ºC'de saklanan sarı kese ve kemik örnekleri çözdürülerek ham kül ve mineral analizinde kullanılmıştır.

Öğütülmüş ve kurutulmuş kemik ve sarı kese örneklerinden 0.5 g tartılarak porselen krozelere alınmıştır. Krozeler daha sonra soğuk fırına alınarak fırın sıcaklığı kademeli olarak artırılır 2-6 saatin sonunda fırın sıcaklığı 500 ˚C'ye getirildi ve 8 saat yakma işlemi gerçekleştirildi. Kül tamamen gri rengini aldığında krozeler fırından alınarak soğumaya bırakılarak tekrar tartılmıştır. Daha sonra kül örnekleri az miktarda saf su ile ıslatıldı ve önceden hazırlanan 3N HCl'den 4 ml dikkatli bir şekilde eklenerek ve karıştırıldı. Ardından krozeler mineral maddeler çözününceye kadar sıcak pleyt üzerinde kaynamaya bırakıldı. Kaynama işlemi sonrası 10-15 dakika sonra çözeltiler 50 ml falkon tüpleri içerisinde süzme işlemine tabi tutuldu ve derecesine kadar saf su ile 50 kat seyreltilerek tamamlanmıştır. Ardından 50 ml falkon tüp içerisindeki çözelti 15 ml falkon tüplere aktarılarak Van YYÜ Bilim Uygulama ve Araştırma Merkezinde ICP-OES (İndüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometresi, Thermo Scientific, ASX-520, ABD) ve AAS (Atomik Absorpsiyon Spektrometre, Thermo Scientific, İCE-3000 series, ABD) cihazları kullanılarak mineral düzeyleri tespit edilmiştir.

Kan mineral analizleri diğer örneklerden farklı olarak -20 ºC'de saklanan serum örneklerinin çözdürülerek saf su ile seyreltilmesi ile değerlerin okunması sağlandı. Her gruptan 8 hayvana ait kan serumundan 200 µl alınarak 5 ml saf su ile 25 kat seyreltilerek ilgili minerallerin tespit edilmesi amacıyla analiz edilmiştir.

Sarı kese ve kanda Fe, Zn mineralleri kemik örneklerinde Ca, P mineralleri, kuluçka öncesi kalite özellikleri belirlenen yumurtalarda Ca, P, Fe, Zn, Mn, Mg, Cu minerallerine ait düzeyler tespit edilerek kayıt altına alınmıştır. Mineral düzeylerinin sonuçları kayıt işlemi sırasında seyreltme değeri ile çarpılarak kayıt altına alınmıştır.

3.3.2.12 Glikojen Analizi ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi ve Ekstraksiyon Yöntemi

3.3.2.12.1 Ekstraksiyon

Çıkışta her grup için rastgele seçilerek organ ağırlıkları alınan 8 hayvandan alınan karaciğer örneklerinde glikojen analizi için geliştirilen ekstraksiyon yöntemi daha önce yapılan bir çalışmadan (Von Engelhardt ve Groothuis, 2005; Babacanoğlu Çakır, 2024) alınarak aşağıda belirtildiği gibi uygulanmıştır.

Karaciğer örnekleri 15 ml falkon tüplerde çözdürülmeden 1 mg ağırlığında tartıldıktan hemen sonra buz üzerinde her örnek için 4 ˚C'de saklanan potasyum klorürden (KCl) 1 ml eklenerek homojenizatörde homojen hale gelinceye kadar parçalanarak 4 ˚C sıcaklığında 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra ayrılan berrak sıvı fazdan 200 µl alınarak 5 ml eppendorf tüplere aktarılmış ve tekrar 1 ml KCl eklenmiştir. KCl eklendikten sonra 1 dakika boyunca çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Ardından eppendorf tüpler sigma marka mini santrifüj cihazında (SİGMA 1-14) 3700 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştirve tortudan ayrılmış berrak fazdan 200 µl alınmıştır. Daha sonra eppendorf tüplere aktarılarak -20 ˚C sıcaklıkta ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) analizine kadar saklanmıştır.

3.3.2.12.2 Karaciğer Glikojen Analizi

Ticari bir markaya ait (BT LAB Chicken Glycogen ELISA Kit, Rel Assay Diagnostic, Gaziantep, Türkiye) 1 adet tavuğa spesifik ELISA kiti karaciğerde glikojen analizi için kullanılmıştır. Glikojen düzeyleri tavuğa spesifik olan 96 test bölmesine sahip bu kit aracılığıyla enzimatik immuno-sorbent assay analizine dayanan çift antikor sandviç metodu adı verilen çalışma prensibi ile çalışan Biotek marka ELISA (ELx808, Ultra Microplate Reader, Almanya) okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Babacanoğlu Çakır, 2024). Yöntem aşamalı olarak aşağıda belirtilmiştir.

Reaktiflerin Hazırlanma Aşaması

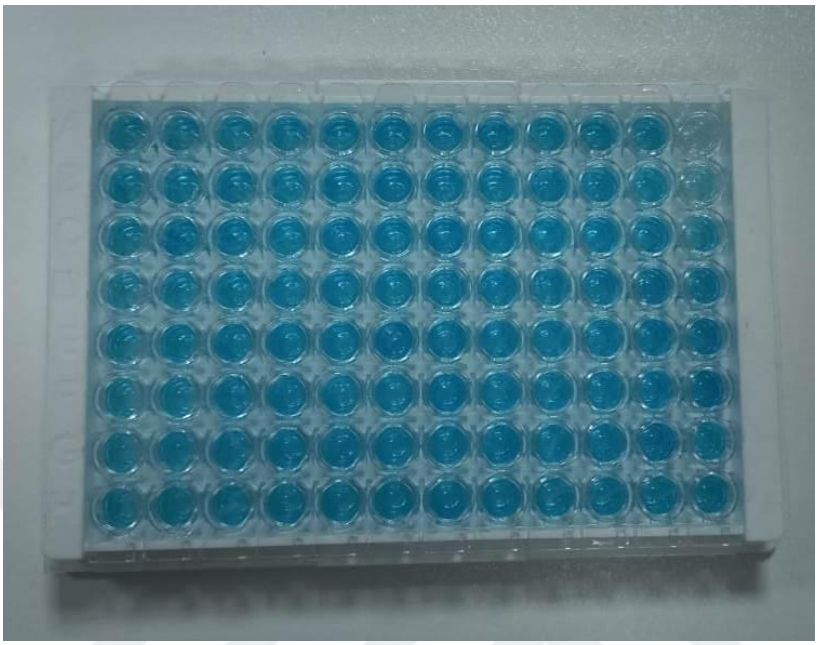
a. Reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilmiştir.
b. Standart hazırlamak için öncelikle 4800 µg / ml standart stok solüsyonu elde etmek için 150 µl standart numune seyreltici oluşturulmuştur.

c. Seyreltme yapılmadan önce standart hafifçe çalkalanarak 15 dk bekletilmiştir.
d. Standart, stok solüsyonu ile her defasında yarısı kadar seyreltilerek 2400 µg / ml, 1200 µg / ml, 600 µg / ml ve 150 µg / ml olarak standartlar oluşturulmuş ve son olarak standart / numune seyreltici sıfır (0 µg / ml) standart olarak eklenmiştir.
e. Biyotinlenmiş antijen santrifüj edilmiştirve karışması için 1 ml biyotinlenmiş antijen seyreltici eklenmiş ve tüm solüsyon tekrar seyreltici tüpüne aktarılarak karıştırılmıştır böylece 6 ml'lik bir stok solüsyon elde edilmiştir.
f. Avidin-HRP Konsantresi düşük hızda kısa süreliğine santrifüj edilmiştirve tamamı HRP seyreltme şişesine eklenerek iyice çalkalandı böylece 6 ml'lik bir stok solüsyon oluşturulmuştur.
g. Yıkama tamponu konsantresi için 25 x 20 ml konsantre yıkama tamponu 480 ml ultra saf su ile seyreltilerek 500 ml'lik bir yıkama tamponu hazırlanmıştır.

3.3.2.12.3 ELISA Kit Prosedürü Aşamaları

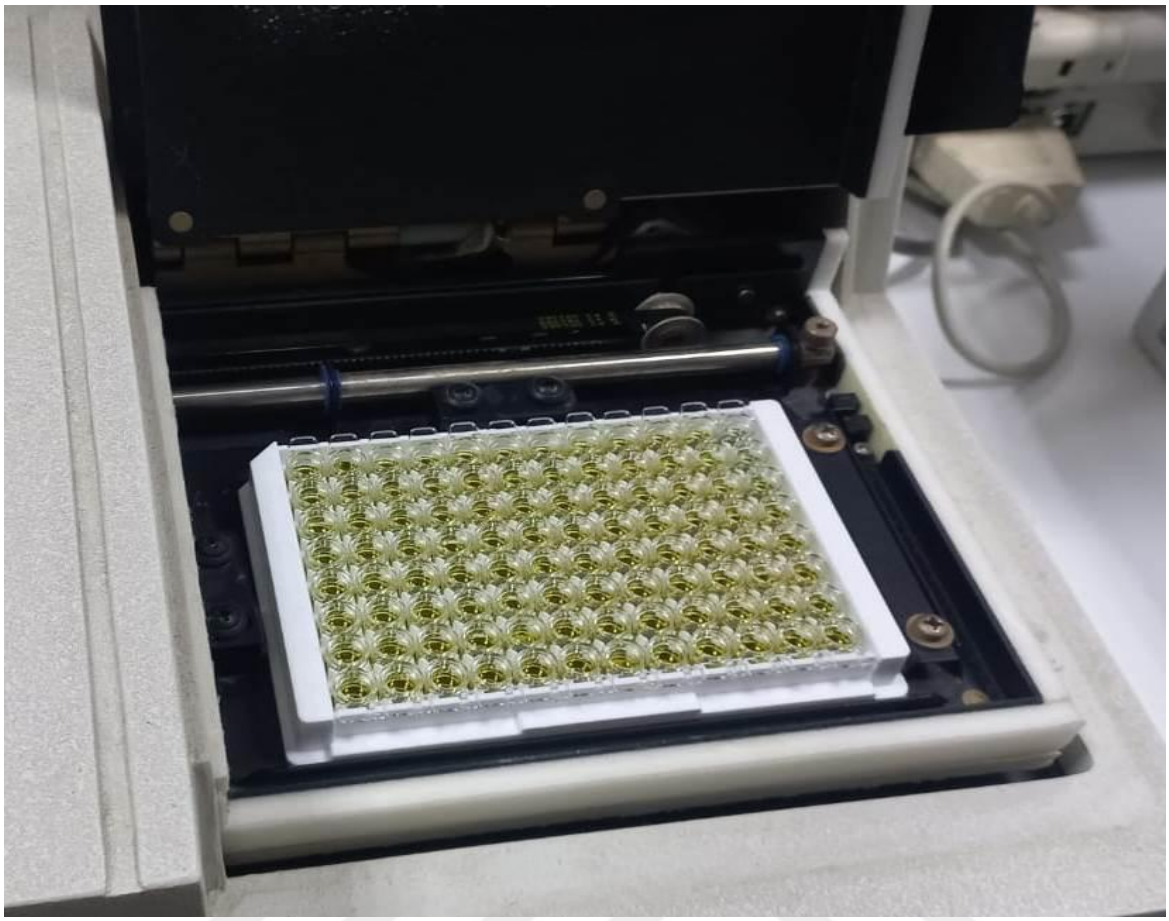
a. Tüm reaktif ve standartlar kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilmiştir.
b. Test kitinde bulunan 96 kuyudan 88 adet kuyu numune ekstraksiyonu için kullanılmıştır, kalan diğer kuyular ise sırası ile standartlar eklenmiştir.
c. Standart kuyulara seyreltilmiş standartlar ve numune kuyularına da 50 µl numune eklenmiştir. Ardından tüm kuyulara 50 µl biyotinlenmiş antijen eklenerek üzeri kapatılmıştır.
d. Üzeri kapatılan plaka 37˚C sıcaklıkta 1 saat inkübe edilmiştir.
e. Bir saatin sonunda plaka çıkarılmış ve 300 µl yıkama tamponuyla manuel olarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
f. Yıkama işleminden sonra plaka üzerindeki tüm sıvı boşaltılarak kurulanmıştır.
g. Ardından tüm kuyulara 50 µl avidin-HRP eklenerek üzeri kapatılıp tekrar 37˚C sıcaklıkta 1 saat inkübe edilmiştir.
h. İnkübasyon sonrası yıkama işlemi tekrar edilmiştir.
i. Daha sonra 50 µl substrat A ve 50 µl substrat B eklenerek üzeri kapatıldı ve 37˚C'de 10 dk inküasyona alınmıştır.
j. Plakalar 10 dakika sonunda çıkartılarak her kuyuya 50 µl stop solüsyonu eklenmiştir. Bu işlemin sonunda daha önce mavi rengine dönen plaka sarı rengine dömüştür.

k. Stop solüsyonunun hemen ardından plaka 450 nm'ye ayarlı ELISA okuma cihazına alınarak okuma işlemi gerçekleştirilmiştir. Okuma işlemi sonunda değerler kaydedilerek hesaplama yapılmıştır.



Şekil 3.8 Stop solüsyon öncesinde gerçekleştirilen işlemlerin ardından plaka renk değişimi

Şekil 3.9 Stop solüsyon eklendikten sonra plakada meydana gelen renk değişimi



Şekil 3.10 ELISA cihazı okuma bölmesi

Şekil 3.11 ELISA okuma cihazı

3.3.3 İn Ovo Yöntemi

Sarı kese enjeksiyonu için enjeksiyon öncesi enjeksiyon bölgesi %70'lik etanolle temizlendikten sonra yumurta 22 G iğne kullanılarak delindi ardından sivri uç aşağı doğru 45° eğim ile 26 G iğneye sahip yarı otomatik enjektör kullanılarak doğrudan yumurta sarısına nano solüsyonlar 0enjekte edilmiştir. Grup dozlarına göre sırasıyla; (S_1) 0.5 ml saf su, (Fe_1) 80 µg Fe + 0.5 ml saf su, (Zn_1) 80 µg Zn nano + 0.5 ml saf su, ($FeZn_1$) 80 µg Fe nano + Zn nano + 0.5 ml saf su her gruptan 136 yumurtaya enjeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Amniyon kese enjeksiyonu için enjeksiyon öncesi enjeksiyon bölgesi %70'lik etanolle temizlendikten sonra yumurta ışık kontrolü yapılarak amniyon kesesinin olduğu bölge seçilerek embriyo zarar görmeyecek şekilde önce yumurtanın Ekvator bölgesinden 22 G iğne kullanılarak delindi ardından 26 G iğneye sahip yarı otomatik enjektör kullanılarak 90° açı ile nano solüsyonlar enjekte edildi. Grup dozlarına göre sırasıyla; (S_2) 0.5 ml saf su, (Fe_2) 80 µg Fe nano + 0.5 ml saf su, (Zn_2) 80 µg Zn nano + 0.5 ml saf su, ($FeZn_2$) 80 µg Fe nano + Zn nano + 0.5 ml saf su her gruptan 136 yumurtaya enjeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Geriye kalan 136 adet yumurta enjeksiyonsuz kontrol grubu olarak belirlenmiştir.

3.4 Demir (Fe) ve Çinko (Zn) Minerallerinin Nano Partiküllerin Malzeme Karakterizasyonlarında Kullanılan Materyaller

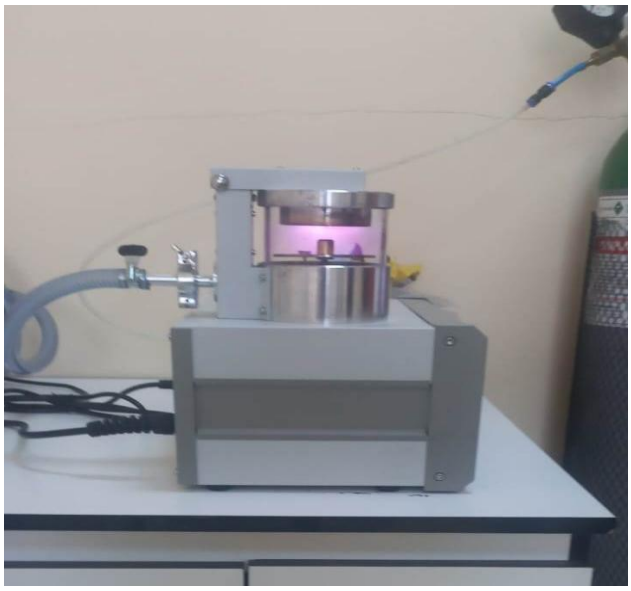
Hazırlanan nano Fe, Zn ve FeZn solüsyonlarının malzeme karakterizasyonu SEM, UV, XPS analizleri ile karakterize edilmiştir. Nano Fe, Zn ve FeZn solüsyonları SEM ve XPS analizleri için kurutma işlemleri ile toz forma getirildi. Şekil 3.14' de verildiği gibi kurutma işlemi Heidolph (Heidolph laborota 4011 digital RotoVap CBD Extraction System) buharlaştırma cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.12 Heidolph buharlaştırma cihazı

Şekil 3.13 Kurutma işlemi sonrası nano Fe, Zn ve Fe+Zn minerallerine ait görüntü

3.5 SEM (Scanning Electron Microscope) Analizleri

Nano partikül minerallerin malzeme karakterizasyonu, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilim Araştırma ve Uygulama Merkezi laboratuvarında Zeiss Sigma 300 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany) cihazı kullanılarak SEM analizleri yapılmıştır. Analiz öncesi toz forma getirilen nano Fe, Zn ve FeZn mineralleri mikroskop bölmesine yerleştirilmeden önce altın ile kaplanmıştır. Kaplama süreci sonrasında mikroskop bölmesine yerleştirilerek inceleme başlatılmıştır. İnceleme sonrasında oluşturulan görüntü ve grafikler kayıt altına alınmıştır.

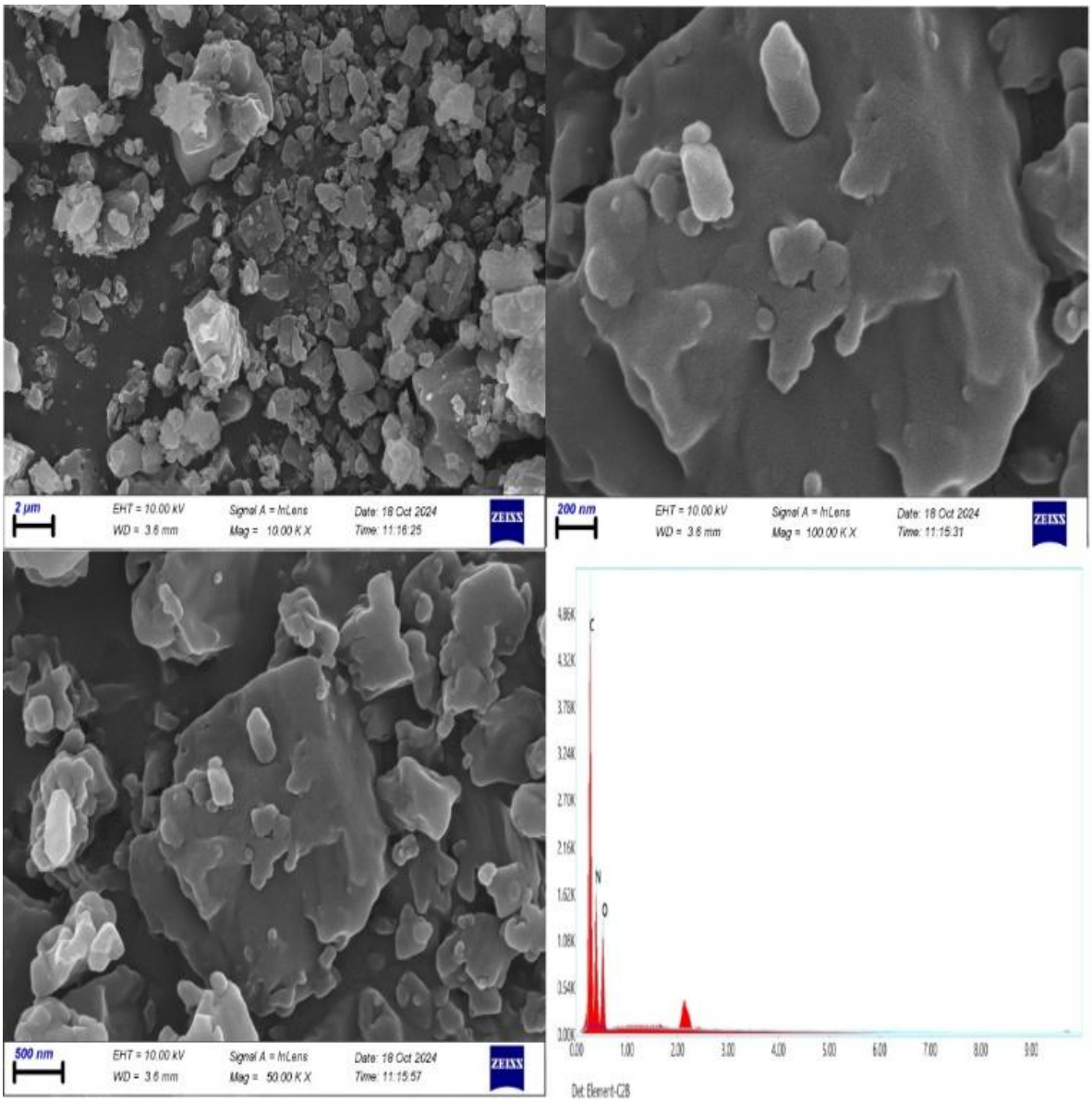


Şekil 3.14 Kaplama ünitesi

Şekil 3.15 SEM (Scanning Electron Microscope) analiz bölümü

3.6 Scanning Electron Microscope (SEM) Analizi

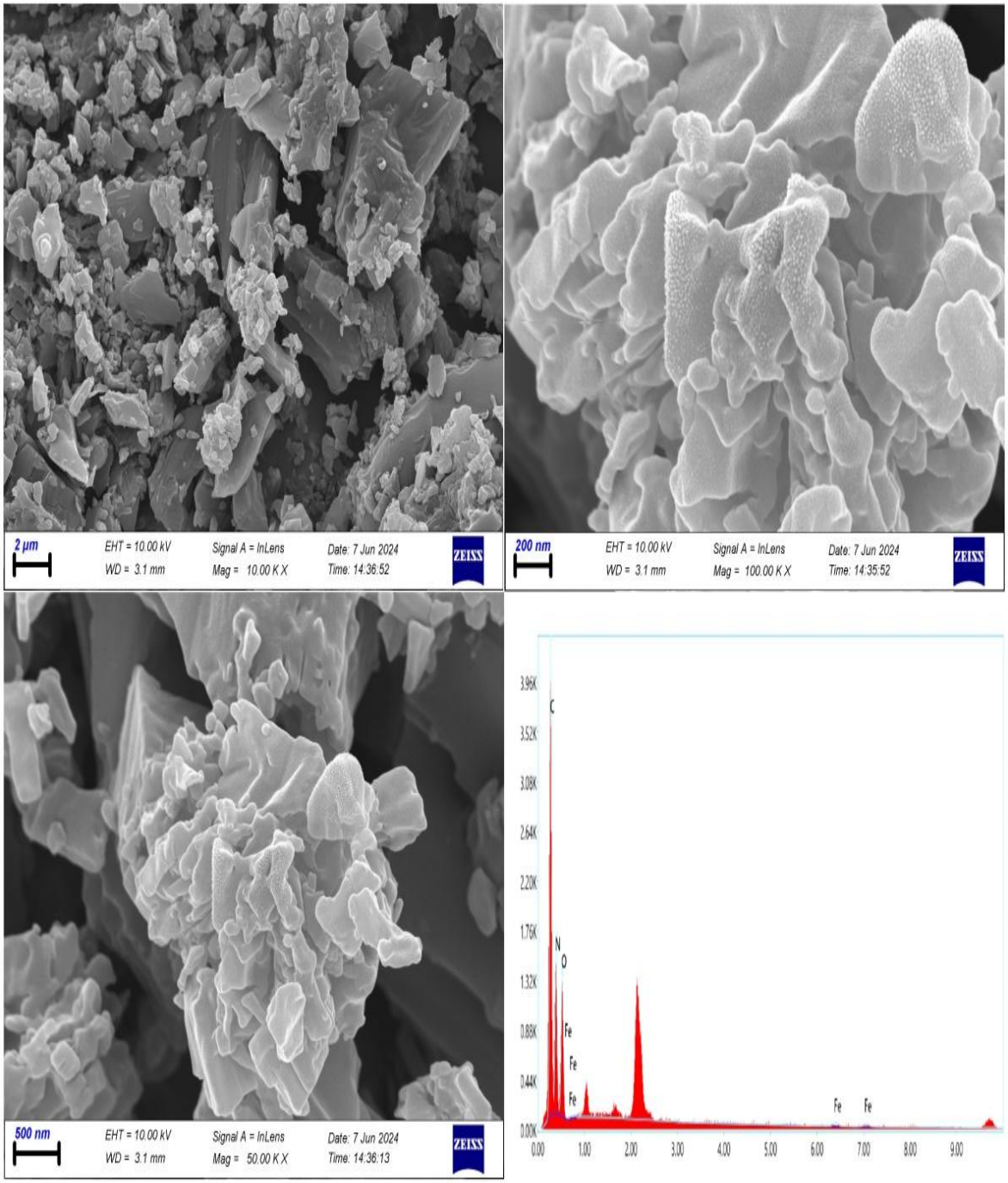
Grafikler incelendiğinde X ekseni üzerindeki tepe noktaları nano partikül içerisindeki elementleri ifade etmektedir. X ekseni üzerinde 2.00 ve 3.00 arasında eşleşmemiş tepe noktası altın kaplamadan gelmektedir. L-Arjinin maddesi iletken bir madde olmadığından dolayı yüzey iletkenliğinin sağlaması için altın ile kaplama işlemi yapılmıştır.



Şekil 3.16 L-Arjinin farklı ölçeklerde SEM görüntüleri

3.6.1 Organik nano Fe SEM Analizleri

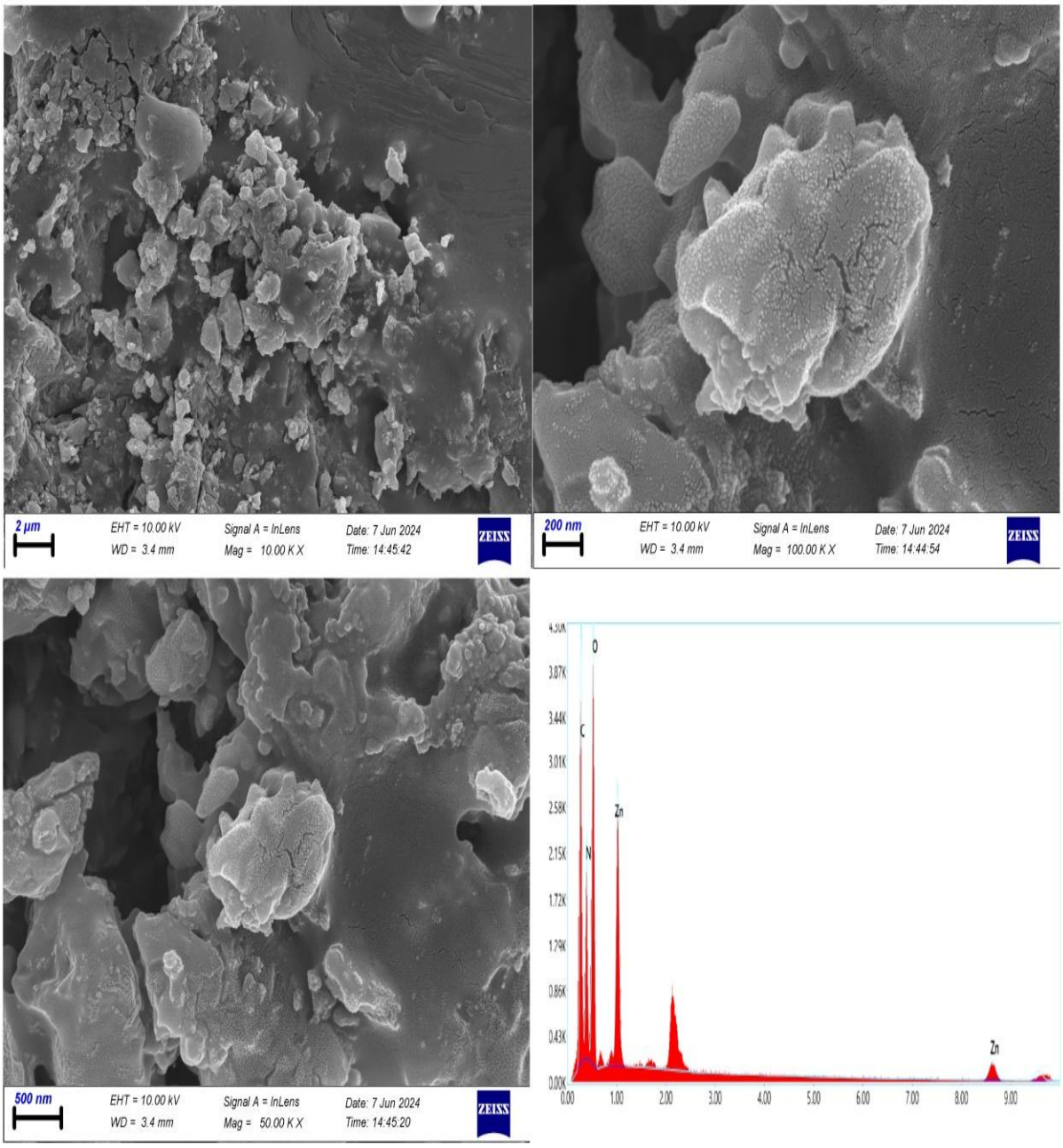
Fe nano partikül morfolojisi incelendiğinde L-Arjinin yüzeyinde demir nano partiküllerinin homojen bir şekilde yüzeye dağıldığı görülmüştür. Burada indirgeme işleminin başarılı olduğu ve L-Arjinin morfolojisinde demir nano partiküllerinden kaynaklı pürüzlenme görülmüştür.



Şekil 3.17 L-Arjinin yüzeyinde Fe nano partiküllerine ait farklı ölçeklerde SEM görüntüleri

3.6.2 Organik nano Zn SEM Analizleri

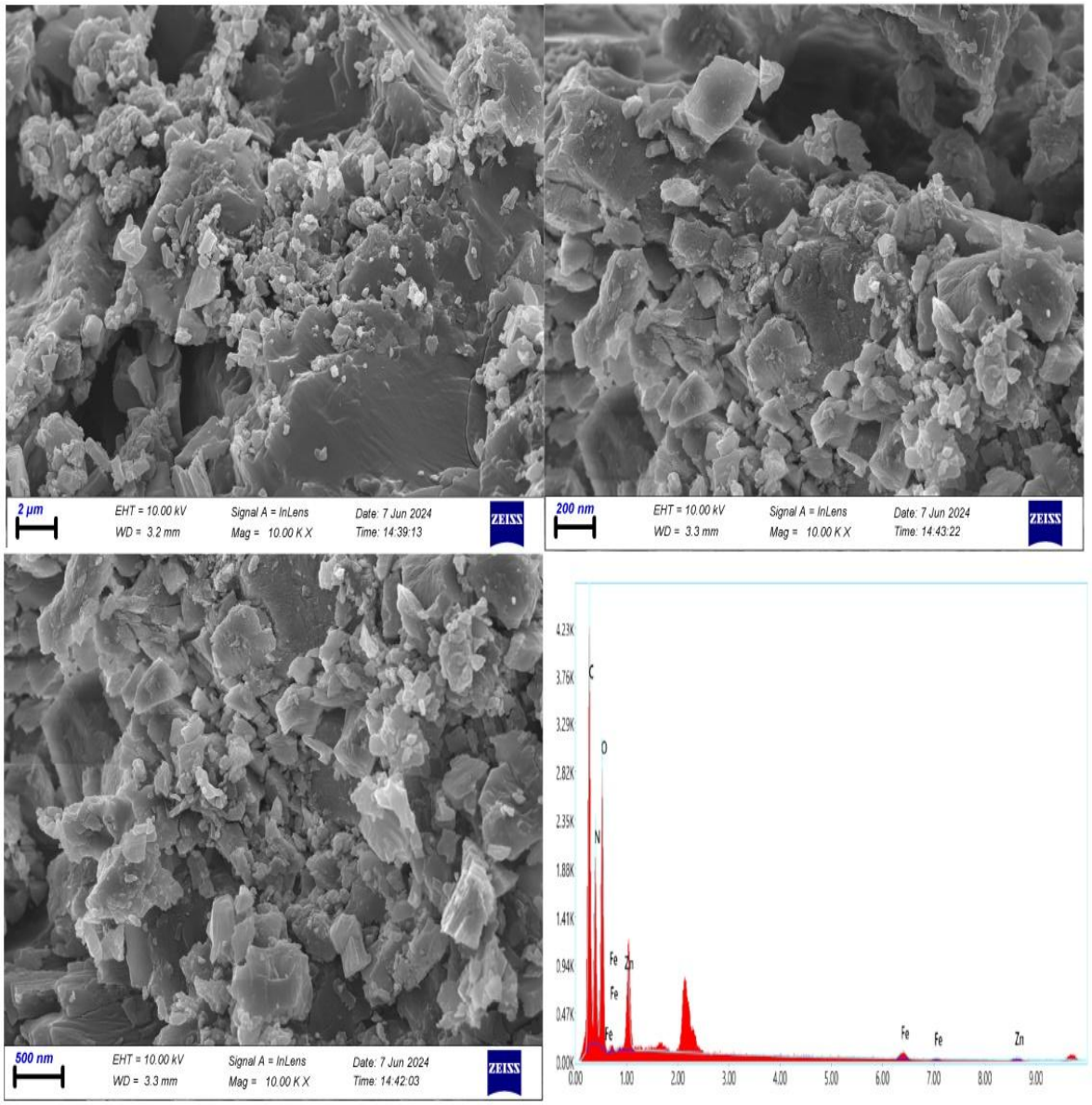
Zn nano partikül morfolojisi incelendiğinde L-Arjinin yüzeyinde demir nano partiküllerinin homojen bir şekilde yüzeye dağıldığı görülmüştür. Burada indirgeme işleminin başarılı olduğu ve L-Arjinin morfolojisinde demir nano partiküllerinden kaynaklı pürüzlenme görülmüştür.



Şekil 3.18 L-Arjinin yüzeyinde Zn nano partiküllerine ait farklı ölçeklerde SEM görüntüleri

3.6.3 Organik nano Fe+Zn SEM Analizleri

Fe+Zn nano partikül morfolojisi incelendiğinde L-Arjinin yüzeyinde demir nano partiküllerinin homojen bir şekilde yüzeye dağıldığı görülmüştür. Burada indirgeme işleminin başarılı olduğu ve L-Arjinin morfolojisinde demir nano partiküllerinden kaynaklı pürüzlenme görülmüştür.



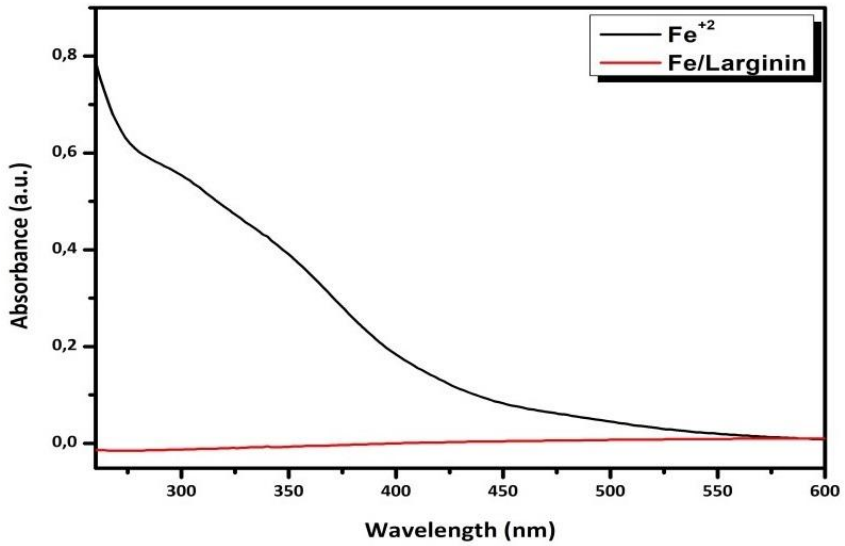
Şekil 3.19 L-Arjinin yüzeyinde Fe+Zn nano partiküllerine ait farklı ölçeklerde SEM görüntüleri

3.7 UV-vis (Ultraviyole ve Görünür Bölge Spektroskopisi) Analizi

UV-Vis analizi, Van YYÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde Shimadzu UV-3600 UV–vis spektrofotometre cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. UV-vis analizinde, Fe, Zn ve Fe+Zn Np numuneleri kuvars hücrelerine aktarılarak ölçümler 200-600 nm dalga boyu aralığında okutuldu. UV-vis ölçüm öncesi numuneler solüsyon ultra saf su ile seyreltme yapılarak kuvars adı verilen küvetlere aktarılmıştır. Ardından küvet UV-vis bölmesine yerleştirilerek işlem başlatılmıştır. Bu işlemlerin ardından veriler kayıt altına alınmıştır ve yorumlanmıştır.

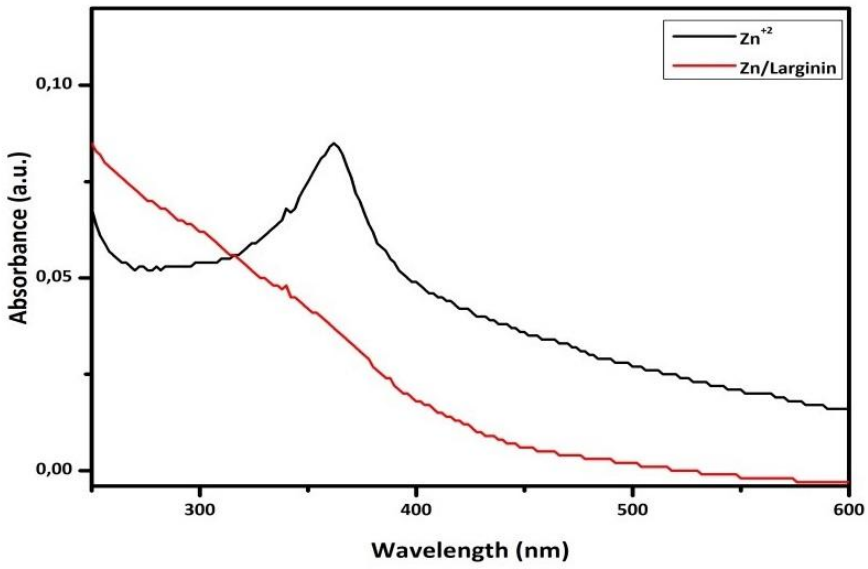
Şekil 3.20 UV-vis analizi

Organik nano Fe partikülleri ve $FeSO_4$ bileşiğinin UV-vis spektrum sonuçları tablo 3.21'de verilmiştir. Ölçüm grafiği incelendiğinde Fe^{2+} iyonu ve Fe/ L-argine kompleks eğrilerinin yorumlamasına göre 250-800 nm dalga boyunda gerçekleştirilen ölçümler, sistemde ultraviyole ve görünür bölgelerin geçişlerinin incelenmesine olanak vermiştir. Yatay eksende incelenen 250-300 nm aralığındaki ölçümler nano partikül oluşumunu kanıtlamak için yeterli olmayabilir ancak bu dalga boyu aralığındaki absorbans değerlerindeki değişimlere göre nano partikül oluşumu incelenmektedir. Bu çalışmada incelenen UV-vis ölçümleri Fe^{+2} iyonlarının 200-300 nm arasında belirgin absorbans gösterdiği gözlemlenmiştir. Fe/L-Arjinin kompleksi incelendiğinde absorbans değerinin dalga boyu aralığında önemli düzeyde düştüğü saptanmıştır. Serbest iyonlarda karakteristik UV absorbans eğrilerinin kaybolması ve geniş dalga boyu aralığında sergiledikleri düşük dalga boyu kompleksin nano boyutlara dönüştüğü yönünde önemli bir gösterge olarak değerlendirilebilir.

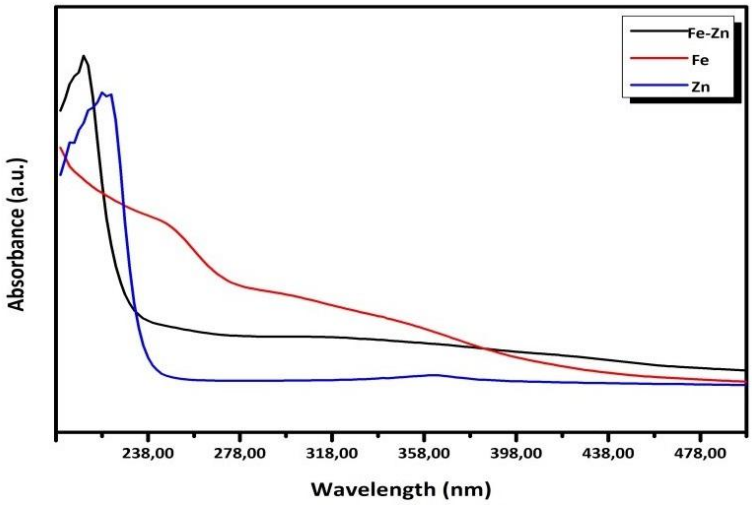


Şekil 3.21 Organik nano Fe mineralinin UV-Vis spektrumu

Organik nano Zn partikülleri ve $ZnSO_4$ bileşiğinin UV-vis spektrum sonuçları tablo 3.22'de verilmiştir. Ölçüm grafiği incelendiğinde Zn^{2+} iyonu ve Zn/ L-argine kompleks eğrileri bu çalışmada UV-vis ölçümleri Zn^{+2} iyonlarının 300-400 nm arasında belirgin absorbans gösterdiği gözlemlenmiştir. Zn/L-Arjinin kompleksi incelendiğinde absorbans değerinin dalga boyu aralığında önemli düzeyde düştüğü saptanmıştır. UV absorbans eğrilerinin kaybolması ve geniş dalga boyu aralığında sergiledikleri düşük dalga boyu Zn/.L-Arjinin kompleksinin nano boyutlara dönüştüğünü göstermiştir.



Şekil 3.22 Organik nano Zn mineralinin UV-Vis spektrumu



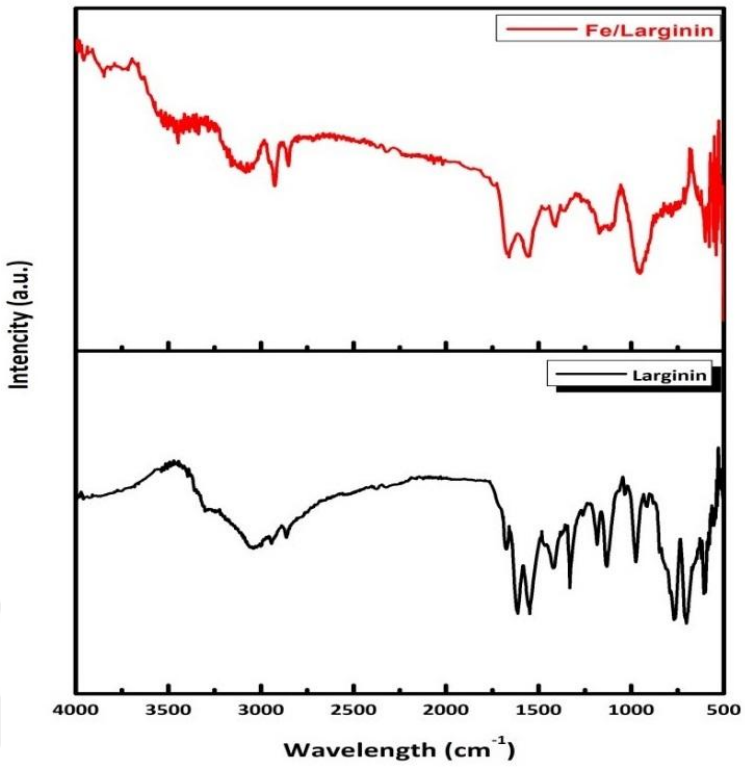
Şekil 3.23 Organik nano Fe+Zn mineralinin UV-Vis spektrumu

Organik nano Fe+Zn partikülleri ve $FeSO_4$ ve $ZnSO_4$ bileşiklerinin UV-vis spektrum sonuçları tablo 3.23'te verilmiştir. Ölçüm grafiği incelendiğinde Fe^{2+} ve Zn^{2+} iyonları ile Fe+Zn/ L-argine kompleks eğrileri incelenmiştir. Bu çalışmada UV-vis ölçümleri Fe^{2+} ve Zn^{+2} iyonlarının 200-500 nm arasında belirgin absorbans gösterdiği gözlemlenmiştir. Fe+Zn/.L-Arjinin kompleksi incelendiğinde absorbans değerinin dalga boyu aralığında önemli düzeyde düştüğü saptanmıştır. UV absorbans eğrilerinin kaybolması ve geniş dalga boyu aralığında sergiledikleri düşük dalga boyu Fe+Zn/L-Arjinin kompleksinin nano boyutlara dönüştüğünü göstermiştir.

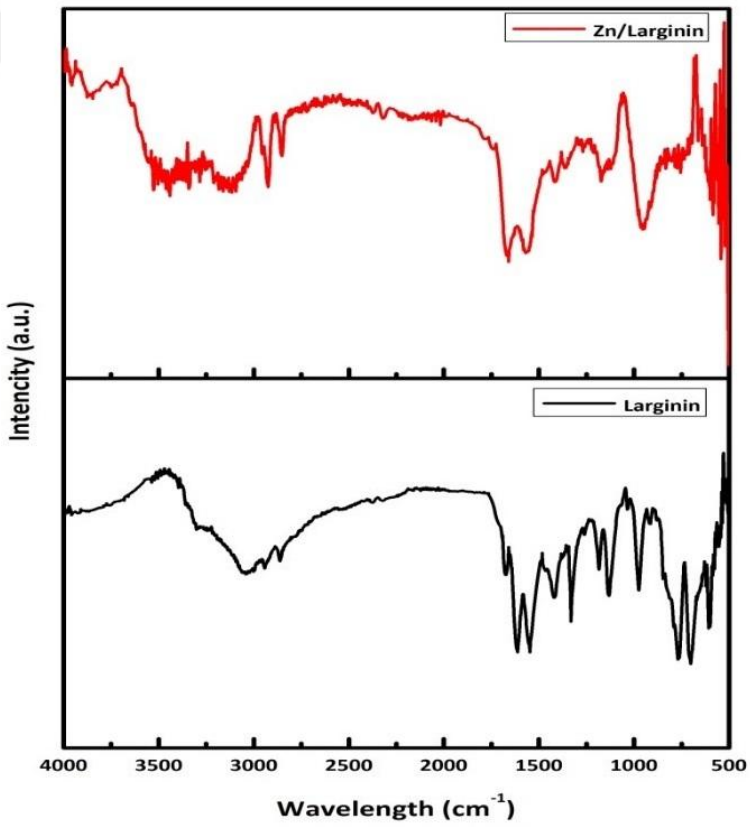
3.8 FT-IR (Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi) Analizi

FT-IR analizi, Van YYÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde Bio-Rad-Win-IR spectrophotometer cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

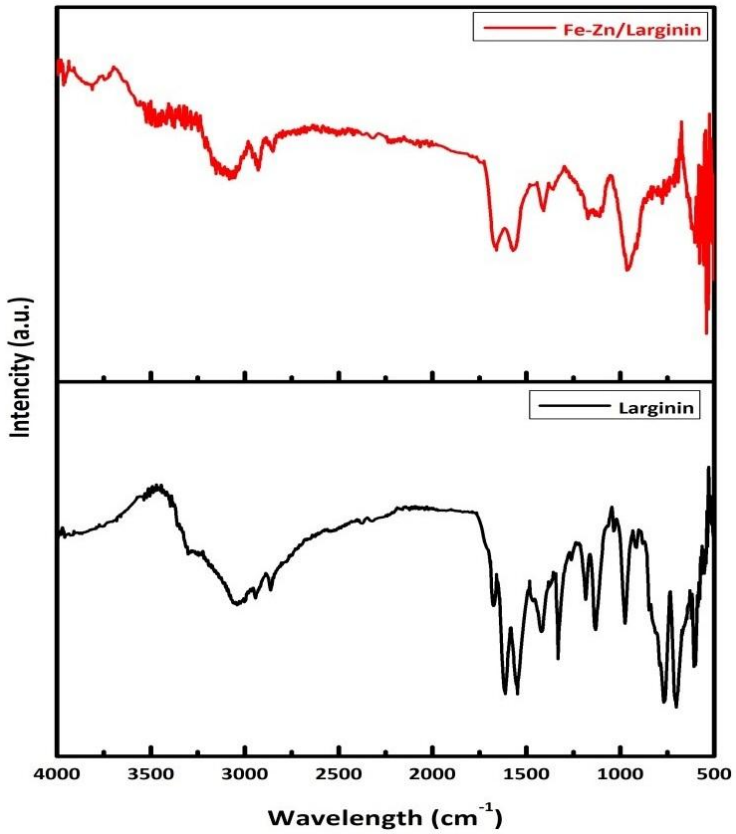
Şekil 3.24 FT-IR analizi



Şekil 3.25 Organik nano Fe mineralinin FT-IR spektrumu



Şekil 3.26 Organik nano Zn mineralinin FT-IR analiz spektrumu



Şekil 3.27 Organik nano Zn mineralinin FT-IR analiz spektrumu

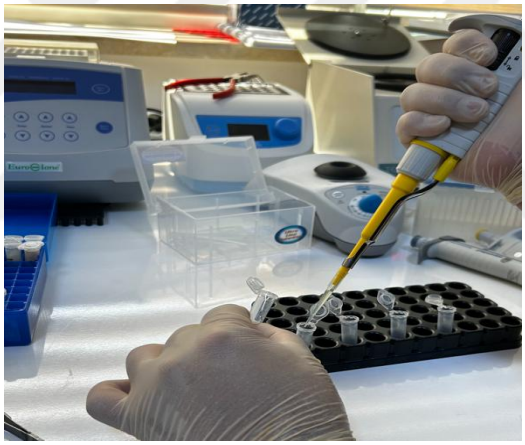
3.9 Gen Ekspresyon Analizi Çalışması

3.9.1 RNA İzolasyonu

Ribonükleik asid (RNA) izolasyonu amacıyla etlik piliç örneklerinden karaciğer dokularından 25 mg örnek alınmıştır. Dokular, RNase içermeyen bir tüpe yerleştirilmiştir ve üzerine 700 µl TRIzol Reaktif eklenmiştir. Dokular, homojen bir karışım elde edene kadar doku homojenizatörü ile tamamen parçalanmıştır. Homojenize edilmiş karışım oda sıcaklığında 5 dakika bekletilerek RNA'nın hücresel komponentlerden ayrışması sağlanmıştır. Karışıma kloroform eklendi ve tüp çalkalanarak iyice karıştırılmıştır. Tüp 15 dakika boyunca 4°C'de, 12.000 x g hızında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst faz dikkatlice alınarak yeni bir tüpe aktarılmıştır. Üst faza izopropanol eklendi ve tüp karıştırılmıştır. Karışım, RNA'nın çökelmesi için 10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Tüp tekrar 10 dakika boyunca 4°C'de, 12.000 x g hızında santrifüj edilmiştirve RNA peleti tüpün dibinde toplanmıştır. RNA peleti, üzerindeki sıvı dikkatlice uzaklaştırılarak %75 etanol ile yıkanmıştır. Etanol yıkaması sonrası tüp 5 dakika boyunca 4°C'de, 7.500 x g hızında santrifüj edilmiştir. Yıkama sıvısı

uzaklaştırılmış ve RNA peleti oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kuru pelet uygun bir RNA çözme tamponu veya su ile çözülerek hazır hale getirilmiştir (Önalan, 2019). RNA izolasyonu amacıyla doku parçalama işlemine ait görüntüler aşağıda şekil 3.30'da verilmiştir.

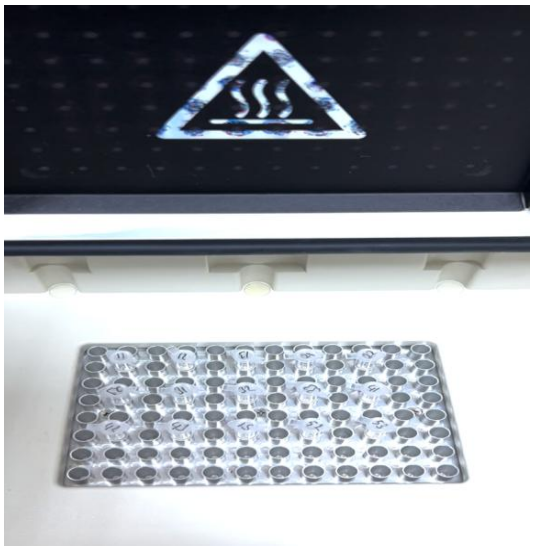
Şekil 3.28 Doku parçalama aşamasına ait görüntüler



Şekil 3.29 Doku parçalama aşamasına ait görüntüler

3.9.2 Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit (cDNA) Eldesi

Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit (cDNA) sentezinin tüm aşamaları +4 ˚C'de cold plate üzerinde gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için All in one cDNA synthesis kit (Solver) kullanılmıştır. İzole edilen 1 µl RNA 10 ng konsantrasyonda eşitlenerek total hacim 20 µl' ye tamamlanmıştır. Ardından, 20 µl cDNA sentez kiti eklenerek, 42 °C'de 60 dakika ve sonrasında 80 °C'de 10 dakika Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) protokolü uygulanmıştır (Schwartz vd., 2020). cDNA sentezi aşamasına ait görüntüler aşağıda verilmiştir (Şekil 3.31).



Şekil 3.30 cDNA aşamasında örneklerin hazırlanma sürecine ait görüntüler

3.9.3 Gen Ekspresyon Analizi

cDNA ürünleri RotorGene Q 9000 (Qiagen) cihazı ile ve SybrGreen qPCR Master Mix (Solver) kullanılarak Real-Time PCR analizinde kullanılmıştır. Gen ekspresyonu analizinde β-aktin referans gen olarak analiz edilmiştir. Hedef gen olarak TFRC ve MT genlerine ait primerler sentezlenmiştir. Çalışmada kullanılan primerler ve özellikleri aşağıda verilmiştir.

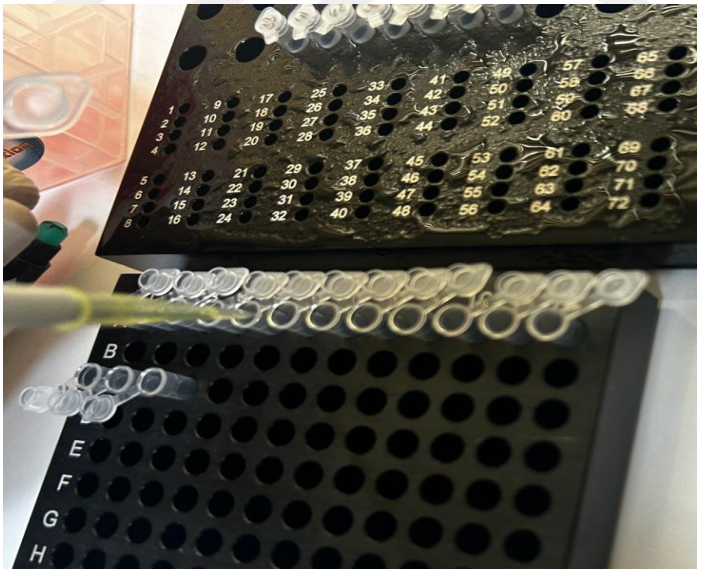
Çizelge 3.7 Çalışmada kullanılan primeler ve özellikleri

Bactin-chicken-F	Yok	GAGAAATTGTGCGTGACATCA	Yok	21	50 nmol	Standart	152BP NM_205518.1
Bactin-chicken-R	Yok	CCTGAACCTCTCATTGCCA	Yok	19	50 nmol	Standart	
TFRC-F-CHİCKEN	Yok	GGACCGCCTGTCATCTTCTGG	Yok	21	50 nmol	Standart	161 BP NM_205256.2
TFRC-R-CHİCKEN	Yok	GCCTCACCAGCCTCAAAGGAG	Yok	21	50 nmol	Standart	
MT-F	Yok	GCAACAACTGTGCCAAGGGC	Yok	20	50 nmol	Standart	138BP nm_205275.1
MT-R	Yok	TTTCGTGGTCCCTGTCACCC	Yok	20	50 nmol	Standart	

PCR karışımı 12 µl SYBRGreen qPCR Master Mix (Solver), 2 µl forward ve 2 µl reverse primer, 5 µl H_2O eklenip toplam hacim 21 µl'ye tamamlanmıştır. Toplam hacmin

üzerine 4 µl cDNA eklenerek 25 µl PCR hacmine ulaşılmıştır. PCR döngü koşullarında, 15 dk boyunca 95 ºC'de denatürasyon ve 95 ºC'de 30 sn, 60 ºC'de 30 saniyelik 55 döngü ile Real-Time PCR protokolü tamamlanmıştır (Lei vd., 2015). Gen ekspresyon analizine ait görüntüler aşağıda verilmiştir.

Şekil 3.31 Real-Time PCR protokol aşamaları

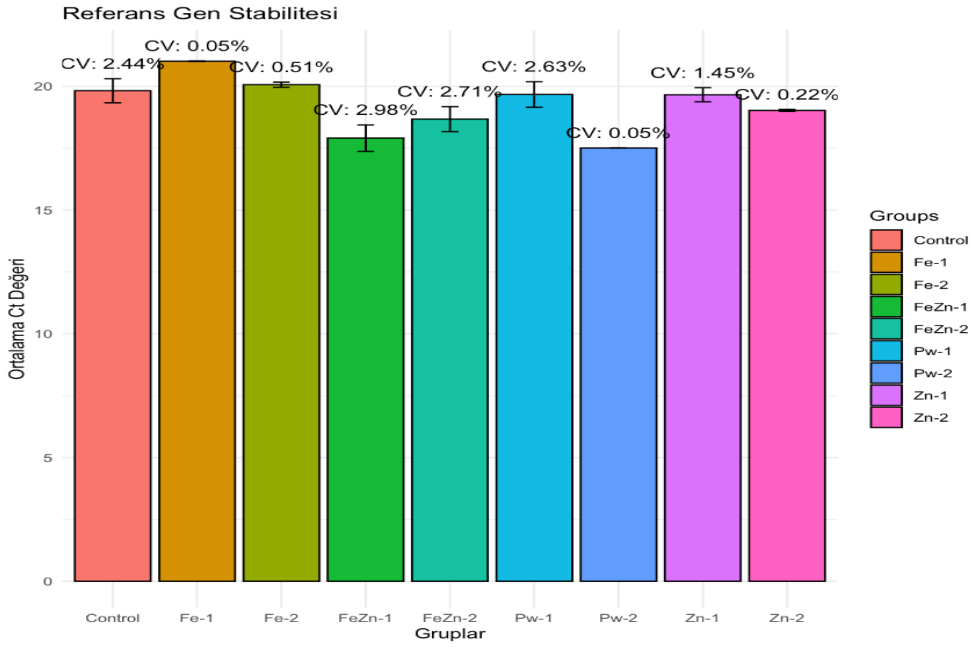


Şekil 3.32 Real-Time PCR protokol aşamaları

Real-Time PCR sonrasında elde edilen Ct değerleri (threshold cycle) için Excel tablosu yapılmıştır. Sonuçlar, GraphPad Prism yazılımı kullanılarak kontrol ve kat değişim kriteri olarak ACTB referans genine göre ham veri normalizasyonu ile $2^{\Delta\Delta CT}$ yöntemine dayalı gerçek zamanlı PCR verileri analiz edilmiştir.

Şekil 3.33 Real-Time PCR aşamasında örneklerin hazırlanması ve yüklemesine ait görüntüle

Çalışmada kullanılan β-aktin referans geninin çalışmada kullanımının doğruluğunu görmek amacıyla referans gen stabilite testi gerçekleştirilmiştir. Test sonucunda tüm gruplarda referans gen sonuçlarının CV değerlerinin kabul edilebilir oranlarda ve yüzde 5'in altında değişim gösterdiği gözlenmiştir. Referans gen stabilite sonucu aşağıda verilmiştir (Şekil 3.34).



Şekil 3.34 Referans gen stabilite testi sonucu

Bu sonuç doğrultusunda etlik piliçlerde gerçekleştirilecek gen ekspresyon çalışmalarında referans gen olarak β-aktin geninin kullanımının analizlerin sonuçlarının doğruluğu açısından daha uygun olduğu görülmüştür.

3.10 İstatistik Analiz

Kuluçkanın 16 ve 19. embriyo gelişimi, çıkışta civciv gelişimi, kemik gelişimi ve mineralizasyonu, kalıntı sarı kese ve kanda ölçülen parametreler ile rektal sıcaklık için elde edilen verilerin analizinde one-way ANOVA kullanılmıştır. Kuluçka sonuçlarına ait parametrelerin analizinde non-parametrik analiz tekerrür düzeyinde uygulanmıştır. Karaciğer glikojen analizi üzerine cinsiyetin etkisi sarı kese mineral enjeksiyonun etkisi ile önemli bulunduğu için bu özelliğin analizinde ana etki olarak grup, yaş ve bunlara ait interaksiyonu içeren GLM modeline göre two-way ANOVA uygulanmıştır. Ortalamalar Student's-t testi ile karşılaştırılmıştır (SAS, 2017). Önemlilikler P<0.05'e göre kabul edilmiştir. Karaciğer MT ve TFRC mRNA genlerin analizlerinden elde edilen CT değerleri kullanılarak normalizasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve ardından 2−ΔΔCT2^{-\Delta\Delta CT}2−ΔΔCT -log transformasyonuna göre bireysel gen ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. ΔCT değerleri, her hedef genin CT değerlerinden housekeeping geninin CT değerlerinin çıkarılmasıyla hesaplanmış ve gruplar arası gen ekspresyon farklılıkları görselleştirilmiştir. Principal Component Analysis (PCA) ile saptanan genlerin elde edildikleri grupların birbirleri ile karşılaştırılmalarında varyasyonlar değerlendirilmiştir Gruplar arası farklılıklar One-way ANOVA ile analiz sonunda Student's-t testi ile karşılaştırılmıştır (SAS, 2017). Önemlilik düzeyi P<0.05 olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Yumurta Ağırlık, Embriyo Uzunluğu, Embriyo Vücut Kitle İndeksi (VKİ) ve Embriyo Organ Ağırlıkları

4.1.1 Kuluçkanın 16. Gününe Ait Veriler

Kuluçkanın 14.5 gününde sarı keseye İOE yapılan saf su, nano Fe, Zn ve Fe+Zn minerallerin oluşturduğu enjeksiyon grupları ile enjeksiyon yapılmayan K grubunda kuluçkanın 16. gününde ölçülen yumurta ağırlıkları (P=0.376) ve embriyo ağırlıkları üzerine İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemsiz (P=0.814) bulunmuştur (Çizelge 4.1). Sarı kese ağırlıkları üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemsiz (P=0.787) bulunmuştur.

İn ovo organik nano mineral enjeksiyon uygulamasının embriyo uzunluğu üzerindeki etkisi önemli (P=0.015) olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.1). Embriyo uzunluğu Fe_1 grubunda kontrol ve diğer enjeksiyon gruplarına benzer bulunurken S_1 grubuna göre önemli düzeyde daha yüksek saptanmıştır. S_1 grubu Fe_1 grubundan önemli düzeyde farklı bulunmuş bu farklılık daha düşük embriyo uzunluğuna sahip olmasından kaynaklanmıştır. En düşük Embriyo uzunluğuna sahip olan S_1 grubu kontrol, Zn_1 ve $FeZn_1$ gruplarından farklı saptanmamıştır (Çizelge 4.1).

Embriyo uzunluğu bakımından kontrol grubu ve diğer uygulama gruplarında embriyo uzunluğunun benzer olduğu saptanmıştır (P>0.05) ve (Vücut Kitle İndeksi (VKİ)) sonuçları incelendiğinde Fe_1 grubunda azalma tespit edilirken S_1 grubunda VKİ düzeyinde artış meydana geldiği gözlenmiştir.

Organ ağırlıklarına ait sonuçlar incelendiğinde karaciğer, kalp, akciğer, göğüs kası, bursa fabricius ve taşlık+proventrikulus ağırlıklarında incelenen sonuçlar gruplar arasındaki fark üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemsiz saptanmıştır (P>0.05).

Kuluçkanın 16. gününde ölçülen oransal embriyo ağırlıkları, sarı kese, kalp, bursa fabricius, taşlık+proventrikulus ağırlık ortalamaları arasındaki farkları üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemsiz bulunmuştur (P>0.05; Çizelge 4.2).

İn ovo organik nano mineral enjeksiyon uygulamasının oransal karaciğer ağırlığı üzerindeki etkisi önemli saptanmıştır (P=0.069; Çizelge 4.2) en yüksek karaciğer ağırlığı S_1 grubunda, en düşük karaciğer ağırlığı K grubunda saptanmış, diğer uygulama gruplarında oransal karaciğer ağırlıkları S_1 ve K grubu ile benzer bulunmuştur.

İncelenen oransal göğüs kası ağırlıklarında da nano minerallerin İOE etkisi önemli bulunmuştur (P=0.062; Çizelge 4.2). Oransal göğüs kası ağırlıklarının en yüksek değeri F_1 grubunda saptanmış, en düşük değer K grubunda saptanmıştır. Diğer uygulama gruplarında oransal göğüs kası ağırlık %, F_1 ve K grupları ile benzer bulunmuştur. Akciğer oransal ağırlıkları üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyon uygulamalarının önemli etkisi saptanmamıştır.

Çizelge 4.1 Organik nano Fe ve Zn partiküllerinin in ovo enjeksiyonunun kuluçkanın 16. gününde yumurta ve embriyo ağırlığı, embriyo uzunluğu (cm), embriyo vücut kitle indeksi (g/cm^2) ve embriyo organ ağırlıklarına ait ortalama değerler (g) ve standart hatalar

	Yumurta ağırlığı	**Embriyo ağırlığı**	**Sarı kese ağırlığı**	**Embriyo uzunluğu**	**VKİ**	**Karaciğer ağırlığı**	**Kalp ağırlığı**	**Akciğer ağırlığı**	**Göğüs kası ağırlığı**	**Bursa fabricius ağırlığı**	**Taşlık + proventrikulus ağırlığı**
Kontrol	57.90 ± 1.15	20.60 ± 0.62	12.59 ±1.06	14.07 ± 0.28 ^{ab}	10.60 ± 0.47 ^{ab}	0.41 ± 0.03	0.143 ± 0.01	0.169 ± 0.03	0.645 ± 0.04	0.025 ± 0.01	0.592 ± 0.04
S_1	57.61 ± 1.09	19.68 ± 0.62	12.49 ± 1.06	13.14 ± 0.28 ^{b}	11.59 ± 0.47 ^{a}	0.52 ± 0.03	0.159 ± 0.01	0.186 ± 0.04	0.686 ± 0.03	0.020 ± 0.01	0.647 ± 0.04
Fe_1	60.55 ±1.15	19.65 ± 0.65	12.37 ± 1.11	14.59 ± 0.30 ^{a}	9.20 ± 0.50 ^{b}	0.44 ± 0.04	0.160 ± 0.01	0.219 ± 0.04	0.752 ± 0.04	0.041 ± 0.01	0.666 ± 0.01
Zn_1	58.21 ± 1.21	20.03 ± 0.65	10.82 ± 1.11	14.25 ± 0.30 ^{ab}	9.93 ± 0.50 ^{ab}	0.46 ± 0.04	0.151 ± 0.01	0.209 ± 0.04	0.745 ± 0.04	0.029 ± 0.01	0.644 ± 0.01
$FeZn_1$	59.05 ± 1.15	19.84 ± 0.62	11.87 ± 1.11	14.08 ± 0.28 ^{ab}	9.96 ± 0.47 ^{ab}	0.42 ± 0.03	0.145 ± 0.01	0.289 ± 0.03	0.695 ± 0.03	0.017 ± 0.01	0.647 ± 0.01
P değeri	0.376	0.814	0.787	0.015	0.016	0.210	0.505	0.173	0.216	0.616	0.754

Aynı stunda Farklı ^{ab} üst simgelere sahip ortalamalar, P<0.05'te önemli ölçüde farklılık gösterir.
VKİ: vücut kitle indeksi. İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su enjeksiyonu; Fe_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe enjeksiyonu; Zn_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_1$: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn.

Çizelge 4.2 Organik nano Fe ve Zn partiküllerinin in ovo enjeksiyonunun kuluçkanın 16. gününde embriyo ağırlığı, embriyo uzunluğu ve organların oransal (%) ağırlıklarına ait ortalama değerler ve standart hataları

	Embriyo ağırlığı	**Sarı kese ağırlığı**	**Karaciğer ağırlığı**	**Kalp ağırlığı**	**Akciğer ağırlığı**	**Göğüs kası ağırlığı**	**Bursa fabricius ağırlığı**	**Taşlık + proventrikulus ağırlığı**
Kontrol	35.64 ± 0.86	21.94 ± 1.90	2.02 ± 0.16^{b}	0.69 ± 0.04	0.82 ± 0.17	3.12 ± 0.18^{b}	0.12 ± 0.02	2.87 ± 0.19
S_1	34.46 ± 0.86	21.86 ± 1.80	2.66 ± 0.16^{a}	0.81 ± 0.04	0.94 ± 0.19	3.49 ± 0.17^{ab}	0.10 ± 0.09	3.28 ± 0.18
Fe_1	32.71 ± 0.91	20.58 ± 1.90	2.24 ±0.16^{ab}	0.82 ± 0.04	1.14 ± 0.19	3.87 ± 0.18^{a}	0.25 ± 0.08	3.41 ± 0.19
Zn_1	34.49 ± 0.91	18.65 ± 1.90	2.32 ±0.16^{ab}	0.75 ± 0.04	1.04 ± 0.18	3.71 ± 0.18^{ab}	0.15 ± 0.08	3.22 ± 0.19
$FeZn_1$	34.63 ± 0.91	20.11 ± 1.90	2.15 ±0.16^{ab}	0.72 ± 0.04	1.52 ± 0.18	3.49 ± 0.18^{ab}	0.08 ± 0.08	3.33 ± 0.19
P değeri	0.248	0.715	0.069	0.108	0.082	0.062	0.621	0.332

Aynı stunda Farklı ^{ab} üst simgelere sahip ortalamalar, P<0.05 e göre önemli ölçüde farklılık gösterir. VKİ: vücut kitle indeksi. İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su enjeksiyonu; Fe_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe enjeksiyonu; Zn_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_1$: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn. Oransal embriyo ağırlığı= embriyo ağırlığı / yumurta ağırlığı x 100, oransal organ ağırlığı= organ ağırlığı / embriyo ağırlığı x 100.

4.1.2 Kuluçkanın 19. Gününe Ait Veriler

Kuluçkanın 17.5. gününde amniyon keseye İO organik nano mineral enjeksiyon uygulaması kuluçkanın 19. gününde yumurta ağırlığı, embriyo ağırlığı, sarı kese, embriyo uzunluğu, vücut kitle indeksi akciğer, göğüs kası, bursa ağırlıkları üzerine etkisi önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$; Çizelge 4.3).

Embriyonun amniyon kesesine İO organik nano mineral enjeksiyon uygulaması karaciğer, kalp ve proventrikulus+taşlık ağırlıklarına etkisi önemli ($P<0.05$) saptanmıştır (Çizelge 4.3).

Kuluçkanın 19. gününde ölçülen karaciğer ağırlığı Zn_2 grubunda daha yüksek elde edilmiştir. Bu yüksek değer diğer gruplardan önemli düzeyde farklı bulunmuş, bu farklılık kontrol, saf su, nano Fe ve Fe+Zn gruplarında karaciğer ağırlığının daha düşük bulunmasından kaynaklanmıştır ($P<0.001$; Çizelge 4.3).

Kuluçkanın 19. gününde kalp ağırlığı Zn_2 grubunda önemli düzeyde artmış, Fe_2 ve S_2 grubunda önemli düzeyde gerilemiştir. Amniyon keseye enjekte edilen nano Zn mineral grubundaki bu artış Fe_2 ve S_2 gruplarındaki bu düşüş kontrol ve $FeZn_2$ gruplarından farklı saptanmamıştır ($P>0.05$; Çizelge 4.3).

Kuluçkanın 19. gününde ölçülen proventrikülüs+taşlık ağırlığı $FeZn_2$ grubunda artmış, Zn_2 grubunda önemli düzeyde gerilemiştir. Amniyon keseye enjekte edilen nano Fe+Zn mineral grubundaki bu artış, Zn_2 grubundaki bu düşüş kontrol, S_2 ve Fe_2 gruplarından farklı saptanmamıştır ($P>0.05$; Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Organik nano Fe ve Zn partiküllerinin in ovo enjeksiyonunun kuluçkanın 19. gününde yumurta ve embriyo ağırlığı, embriyo uzunluğu (cm), embriyo vücut kitle indeksi (g/cm^2) ve embriyo organ ağırlıklarına ait ortalama değerler (g) ve standart hatalar

	Yumurta ağırlığı	**Embriyo ağırlığı**	**Sarı kese ağırlığı**	**Embriyo uzunluğu**	**VKİ**	**Karaciğer ağırlığı**	**Kalp ağırlığı**	**Akciğer ağırlığı**	**Göğüs Kası ağırlığı**	**Bursa ağırlığı**	**Taşlık + proventrikulus ağırlığı**
Kontrol	59.02 ± 1.38	32.12 ± 0.85	11.44 ± 1.26	16.84 ± 0.23	11.36 ± 0.29	0.63 0.04^{b}	0.173 ± 0.01^{ab}	0.289 ± 0.020	0.805 ± 0.04	0.032 ± 0.003	1.150 ± 0.05^{ab}
S_2	57.29 ± 1.38	31.05 ± 0.90	13.47 ± 1.32	16.65 ± 0.24	11.20 ± 0.30	0.54 ± 0.05^{b}	0.154 ± 0.01^{b}	0.231 ± 0.020	0.825 ± 0.04	0.027 ± 0.003	1.114 ± 0.05^{ab}
Fe_2	55.01 ±1.38	30.33 ± 0.90	12.82 ± 1.32	16.31 ± 0.24	11.42 ± 0.30	0.67 ± 0.05^{b}	0.164 ± 0.01^{b}	0.255 ± 0.020	0.740 ± 0.04	0.032 ± 0.003	1.192 ± 0.05^{ab}
Zn_2	58.04 ± 1.38	29.47 ± 0.85	10.75 ± 1.26	16.43 ± 0.23	10.90 ± 0.29	0.88 ± 0.04^{a}	0.210 ± 0.01^{a}	0.254 ± 0.020	0.742 ± 0.04	0.026 ± 0.003	1.018 ± 0.05^{b}
$FeZn_2$	57.66 ± 1.38	29.38 ± 0.85	15.41 ± 1.26	16.65 ± 0.23	10.60 ± 0.29	0.68 ± 0.04^{b}	0.186 ± 0.01^{ab}	0.284 ± 0.020	0.740 ± 0.04	0.026 ± 0.003	1.212 ± 0.05^{a}
P değeri	0.344	0.145	0.096	0.540	0.245	<0.001	<0.001	0.111	0.374	0.306	0.045

Aynı sütundaki farklı üst ^{ab} simgelere sahip ortalamalar, P<0.05'te önemli ölçüde farklılık gösterir. VKİ: vücut kitle indeksi; Kontrol: İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_2: Amniyon kese 0.5 ml saf su; Fe_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe; Zn_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_2$: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn.

Nano minerallerin İn ovo enjeksiyonu kuluçkanın 19. gününde oransal embriyo ağırlığı, göğüs kası, bursa fabricius ağırlıkları üzerindeki etkisi önemsiz saptanmıştır (P>0.05; Çizelge 4.4).

Sarı kese oransal ağırlıkları grupların tamamında önemsiz bulunmuştur (P=0.054; Çizelge 4.4)

Karaciğer oransal ağırlıkları üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemli bulunmuştur (P=0.0001; Çizelge). En yüksek oransal karaciğer ağırlığı Zn_2 grubunda saptanmış, diğer uygulama gruplarında oransal karaciğer ağırlığı düşük bulunmuştur.

Oransal kalp ağırlıklarında da İO organik nano mineral enjeksiyonunun etkisi önemli bulunmuştur (P=0.002; Çizelge 4.4). Oransal kalp ağırlığı Zn_2 grubunda önemli düzeyde artmış, K, Fe_2 ve S_2 gruplarında önemli ölçüde gerileme meydana gelmiştir. $FeZn_2$ grubu diğer gruplarla benzer bulunmuştur.

Akciğer oransal ağırlıkları $FeZn_2$ grubunda artmış, S_2 grubunda önemli düzeyde gerilemiştir (P=0.089; Çizelge 4.4). $FeZn_2$ grubundaki bu artış, S_2 grubundaki bu düşüş kontrol, Zn_2, Fe_2 gruplarından farklı bulunmamıştır.

Kuluçkanın 19. gününde ölçülen oransal proventrikülüs + taşlık ağırlığı üzerine İO organik nano mineral uygulamasının etkisi önemli saptanmış, $FeZn_2$ grubunda oransal proventrikülüs + taşlık ağırlığı artarken, Zn_2 grubunda oransal proventrikülüs + taşlık ağırlığı gerilemiştir (P=0.022; Çizelge 4.4). Kontrol, S_2 ve Fe_2 grupları ise $FeZn_2$ ve Zn_2 gruplarına benzer bulunmuştur.

Çizelge 4.4 Organik nano Fe ve Zn partiküllerinin in ovo enjeksiyonunun kuluçkanın 19. gününde embriyo ağırlığı, embriyo uzunluğu ve organların oransal (%) ağırlıklarına ait ortalama değerler ve standart hataları

	Embriyo ağırlığı	**Sarı kese ağırlığı**	**Karaciğer ağırlığı**	**Kalp ağırlığı**	**Akciğer ağırlığı**	**Göğüs kası ağırlığı**	**Bursa fabricius ağırlığı**	**Taşlık + proventrikulus ağırlığı**
Kontrol	54.52 ± 1.72	19.46 ± 2.09	1.99 ± 0.15^{b}	0.54 ± 0.04^{b}	0.90 ± 0.05^{ab}	2.51 ± 0.11	0.10 ± 0.01	3.58 ± 0.17^{ab}
S_2	54.72 ± 1.81	23.86 ± 2.21	1.77 ± 0.16^{b}	0.49 ± 0.04^{b}	0.75 ± 0.06^{b}	2.65 ± 0.12	0.08 ± 0.01	3.58 ± 0.18^{ab}
Fe_2	56.22 ± 1.81	23.47 ± 2.21	2.22 ± 0.16^{b}	0.54 ± 0.04^{b}	0.84 ± 0.06^{ab}	2.44 ± 2.12	0.10 ± 0.01	3.93 ± 0.18^{ab}
Zn_2	50.82 ± 1.72	18.54 ± 2.09	3.01 ± 0.15^{a}	0.72 ± 0.04^{a}	0.86 ± 0.05^{ab}	2.50 ± 0.11	0.09 ± 0.01	3.44 ± 0.17^{b}
$FeZn_2$	51.17 ± 1.72	26.61 ± 2.09	2.34 ± 0.15^{b}	0.63 ± 0.04^{ab}	0.97 ± 0.05^{a}	2.53 ± 0.11	0.09 ± 0.01	4.19 ± 0.17^{a}
P değeri	0.139	0.054	0.0001	0.002	0.089	0.776	0.621	0.022

Aynı sütundaki farklı üst ^{ab} simgelere sahip ortalamalar, P<0.05'te önemli ölçüde farklılık gösterir. VKİ: vücut kitle indeksi; Kontrol: İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_2: Amniyon kese 0.5 ml saf su; Fe_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe; Zn_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_2$: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn. Oransal embriyo ağırlığı= embriyo ağırlığı / yumurta ağırlığı x 100, oransal organ ağırlığı= organ ağırlığı / embriyo ağırlığı x 100.

4.1.3 Çıkış Gününe (21. Gün) Ait Veriler

Çıkış yapan günlük yaştaki civcivlerde ölçülen civciv ağırlığı, civciv uzunluğu, VKİ, rektal sıcaklığı, sarı kese ağırlığı, karaciğer ağırlığı, kalp ağırlığı, göğüs kası ağırlığı, bursa fabricius ağırlığı ve taşlık + proventrikulus ağırlığı üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyon uygulamasının etkisi önemli saptanmamıştır ($P > 0.05$; Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6).

Akciğer ağırlıkları üzerinde çıkışta günlük yaştaki civcivlerde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemli bulunmuştur ($P=0.024$; Çizelge 4.6). Akciğer ağırlığı Zn_2 grubunda önemli düzeyde artmış, kontrol grubunda ise önemli düzeyde gerilemiştir. Akciğer ağırlığı S_1, S_2, Fe_1, Fe_2, Zn_1, $FeZn_1$, $FeZn_2$ gruplarında incelenen sonuçlar Zn_2 ve kontrol grubundan farklı saptanmamıştır.

Çizelge 4.5 Organik nano Fe ve Zn partiküllerinin in ovo enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin civciv ağırlığı, civciv uzunluğu (cm), civciv vücut kitle indeksine (g/cm^2) ait ortalama değerler (g) ve standart hataları

	Civciv ağırlığı	**Civciv uzunluğu**	**VKİ**	**Rektal sıcaklık**
Kontrol	45.40 ± 1.20	18.66 ± 0.20	13.16 ± 0.39	36.65 ± 0.40
S_1	43.12 ± 1.20	18.66 ± 0.20	12.40 ± 0.39	37.30 ± 0.45
S_2	44.78 ± 1.20	18.67 ± 0.21	12.88 ± 0.41	37.04 ± 0.40
Fe_1	43.77 ± 1.20	18.97 ± 0.22	12.22 ± 0.43	36.35 ± 0.45
Fe_2	43.49 ± 1.20	19.25 ± 0.20	11.73 ± 0.39	37.16 ± 0.45
Zn_1	43.67 ± 1.20	19.18 ± 0.20	11.85 ± 0.39	37.52 ± 0.44
Zn_2	45.93 ± 1.20	18.87 ± 0.20	12.88 ± 0.39	37.02 ± 0.40
$FeZn_1$	44.15 ± 1.20	19.19 ± 0.20	11.99 ± 0.39	36.92 ± 0.44
$FeZn_2$	42.57 ± 1.20	18.78 ± 0.20	12.09 ± 0.39	37.06 ± 0.40
P değeri	0.583	0.208	0.110	0.761

Aynı sütundaki farklı üst ^{ab} simgelere sahip ortalamalar, $P<0.05$'te önemli ölçüde farklılık gösterir. VKİ: vücut kitle indeksi; Kontrol: İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su enjeksiyonu; Fe_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe enjeksiyonu; Zn_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_1$: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn; S_2: Amniyon kese 0.5 ml saf su; Fe_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe; Zn_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_2$: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn.

Çizelge 4.6 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin kalıntı sarı kese ve civciv organ ağırlıklarına ait ortalama değerler (g) ve standart hataları

	Sarı kese	**Karaciğer**	**Kalp**	**Akciğer**	**Göğüs kası**	**Bursa fabricius**	**Taşlık + proventrikulus**
Kontrol	7.07 ± 0.62	1.02 ± 0.07	0.25 ± 0.01	0.41 ± 0.03^{b}	0.81 ± 0.05	0.044 ± 0.004	2.21 ± 0.10
S_1	5.78 ± 0.62	1.02 ± 0.07	0.24 ± 0.01	0.46 ± 0.03^{ab}	0.72 ± 0.05	0.041 ± 0.004	2.32 ± 0.10
S_2	6.54 ± 0.62	1.06 ± 0.07	0.24 ± 0.01	0.47 ± 0.03^{ab}	0.76 ± 0.05	0.039 ± 0.004	2.19 ± 0.10
Fe_1	6.34 ± 0.69	1.14 ± 0.07	0.23 ± 0.01	0.44 ± 0.03^{ab}	0.86 ± 0.06	0.039 ± 0.01	2.11 ± 0.11
Fe_2	5.67 ± 0.62	1.04 ± 0.07	0.24 ± 0.01	0.49 ± 0.03^{ab}	0.77 ± 0.05	0.031 ± 0.01	2.07 ± 0.10
Zn_1	6.28 ± 0.62	0.99 ± 0.07	0.25 ± 0.01	0.49 ± 0.03^{ab}	0.78 ± 0.05	0.045 ± 0.004	2.06 ± 0.10
Zn_2	6.73 ± 0.62	1.13 ± 0.07	0.26 ± 0.01	0.53 ± 0.03^{a}	0.84 ± 0.05	0.045 ± 0.004	2.33 ± 0.10
$FeZn_1$	6.64 ± 0.62	1.15 ± 0.07	0.27 ± 0.01	0.42 ± 0.03^{ab}	0.86 ± 0.05	0.035 ± 0.004	2.20 ± 0.10
$FeZn_2$	7.03 ± 0.65	1.06 ± 0.07	0.25 ± 0.01	0.45 ± 0.03^{ab}	0.73 ± 0.05	0.042 ± 0.004	2.14 ± 0.10
P değeri	0.753	0.625	0.134	0.024	0.411	0.552	0.508

Aynı sütundaki farklı üst ^{ab} simgelere sahip ortalamalar, $P<0.05$'te önemli ölçüde farklılık gösterir. Kontrol: İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su enjeksiyonu; Fe_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe enjeksiyonu; Zn_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_1$: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn; S_2: Amniyon kese 0.5 ml saf su; Fe_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe; Zn_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_2$: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn.

IO organik nano Fe ve Zn mineralleri ile bu minerallerin kombinasyonu enjeksiyonu günlük yaştaki civcivlerde ölçülen oransal sarı kese, karaciğer, kalp, akciğer, göğüs kası, bursa fabricius ve taşlık + proventrikulus ağırlıkları üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyon uygulamasının etkisi önemli saptanmamıştır (P> 0.05; Çizelge 4.7).

Oransal kalp ağırlığı gruplar arasında önemli düzeyde farklı bulunmuştur (P=0.075; Çizelge 4.7). Oransal kalp ağırlığı $FeZn_1$ grubunda artmış, Fe_1 grubunda önemli düzeyde gerilemiştir. Kalp ağırlıkları incelenen S_1, S_2, Fe_2, Zn_1, $FeZn_2$ grupları Fe_1 ve $FeZn_1$ gruplarına benzer bulunmuştur

Çizelge 4.7 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerde organların oransal (%) ağırlıklarına ait ortalama değerler ve standart hataları

	Sarı kese	**Karaciğer**	**Kalp**	**Akciğer**	**Göğüs kası**	**Bursa fabricius**	**Taşlık + proventrikulus**
Kontrol	15.58 ± 1.33	2.24 ± 0.13	0.56 ± 0.02^{ab}	0.90 ± 0.07	1.79 ± 0.11	0.09 ± 0.01	4.87 ± 0.25
S_1	13.41 ± 1.33	2.36 ± 0.13	0.56 ± 0.02^{ab}	1.07 ± 0.07	1.67 ± 0.11	0.09 ± 0.01	5.42 ± 0.25
S_2	14.38 ± 1.33	2.40 ± 0.13	0.54 ± 0.02^{ab}	1.06 ± 0.07	1.69 ± 0.11	0.08 ± 0.01	4.93 ± 0.25
Fe_1	14.34 ± 1.60	2.21 ± 0.16	0.51 ± 0.03^{b}	1.00 ± 0.08	1.90 ± 0.14	0.08 ± 0.01	4.58 ± 0.30
Fe_2	13.25 ± 1.33	2.40 ± 0.13	0.55 ± 0.03^{ab}	1.15 ± 0.07	1.77 ± 0.11	0.07 ± 0.01	4.81 ± 0.25
Zn_1	14.44 ± 1.33	2.30 ± 0.13	0.58 ± 0.02^{ab}	1.17 ± 0.07	1.84 ± 0.11	0.10 ± 0.01	4.76 ± 0.25
Zn_2	14.61 ± 1.33	2.49 ± 0.13	0.57 ± 0.02^{ab}	1.17 ± 0.07	1.85 ± 0.12	0.09 ± 0.01	5.14 ± 0.25
$FeZn_1$	14.94 ± 1.33	2.62 ± 0.13	0.62 ± 0.02^{a}	0.97 ± 0.07	1.95 ± 0.11	0.08 ± 0.01	5.00 ± 0.25
$FeZn_2$	16.38 ± 1.41	2.50 ± 0.13	0.60 ± 0.02^{ab}	1.08 ± 0.07	1.73 ± 0.11	0.09 ± 0.01	5.04 ± 0.25
P değeri	0.844	0.512	0.075	0.066	0.727	0.587	0.584

Aynı sütundaki farklı üst ^{ab} simgelere sahip ortalamalar, P<0.05'te önemli ölçüde farklılık gösterir. Kontrol: İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su enjeksiyonu; Fe_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe enjeksiyonu; Zn_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_1$: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn; S_2: Amniyon kese 0.5 ml saf su; Fe_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe; Zn_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_2$: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn. Oransal ağırlık= organ ağırlığı / civciv ağırlığı x 100.

4.2 Günlük Yaştaki Civcivlerin Tüm Vücut, Kalıntı Sarı Kese ve Kemik Bileşimi

4.2.1 Tüm Vücut Bileşimi

Çıkışta günlük yaştaki civcivlerde yapılan tüm vücut bileşimine ait kuru madde, su, yağ ve ham küliçeriğine ait analiz sonuçları Çizelge 4.8' de gösterilmiştir.

Tüm vücut kuru madde içeriği üzerinde IO organik nano Fe ve Zn ile bu mineral kombinasyon enjeksiyonunun etkisi önemli bulunmuştur ($P<0.05$; Çizelge 4.8). Tüm vücut kuru madde analizine ait sonuçlar incelendiğinde, en yüksek kuru madde düzeyi $FeZn_1$ grubunda, en düşük kuru madde düzeyi ise Zn_1 grubunda saptanmıştır. $FeZn_2$ ve Fe_2 grubu diğer tüm gruplara benzer şekilde saptanmış, kontrol ve S_1 grubu $FeZn_1$ grubuna benzer olarak yüksek bulunurken, S_2, Fe_1, Zn_2 grupları ise $FeZn_1$ grubuna benzer olarak düşük saptanmıştır. Kontrol grubundan farklı olarak her iki embriyonik keseye Zn enjeksiyonu tüm vücut kuru madde içeriğini farklı ortaya koymuştur. Bu farklılık Zn_1 grubunda tüm vücut kuru madde düzeyinin günlük yaştaki civcivlerde gerilemesi yönünde olmuştur (Çizelge 4.8).

Günlük yaştaki civcivlerde tüm vücutta su içeriği üzerine İO organik nano mineral ve bu mineral kombinasyonuna ait partiküllerin enjeksiyonu kuru madde düzeyinin tersine etki göstererek benzer önemlilik düzeyine sahip olmuştur ($P= 0.0276$; Çizelge 4.8). Bu sonuca göre tüm vücut su içeriği günlük yaştaki civcivlerde kontrol, S1 ve FeZn1 gruplarına göre Zn1 grubunda önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuca göre en yüksek vücut su içeriği, Zn1 grubu civcivlerinde saptanırken, en düşük vücut su içeriği ise FeZn1 grubu civcivlerinde saptanmıştır. İn ovo organik nano mineral uygulamanın etkisi ile çıkış yapan günlük yaştaki civcivlerin tüm vücutlarına ait toplam su içeriği kontrol ve S_1 grubu $FeZn_1$ grubuna benzer olarak daha düşük, S_2, Fe_1, Zn_2 gruplarında ise $FeZn_1$ grubuna benzer olarak daha yüksek saptanmıştır. Bu özellik için uygulamanın etkisi ile Fe_2 ve $FeZn_2$ grupları tüm gruplara benzer vücut su içeriğine sahip olmuştur.

Organik nano mineral uygulamasının etkisi ile tüm vücut ham yağ düzeyi en düşük Zn_1 grubunda saptanırken ($P=0.097$; Çizelge 4.8). Saf suyun enjekte edildiği amniyon kese grubu ve $FeZn_1$ grupları S_1 grubuna benzer olarak yüksek bulunmuş, ancak bu gruplara ait ortalama değerler Zn_1 grubundan önemli düzeyde farklı olmuştur. Zn_1 grubunda yer alan civcivlerin toplam vücut yağ düzeyi kontrol ve tüm enjeksiyon gruplarından önemli düzeyde daha düşük saptanmıştır. Kontrol, Fe_1, Fe_2, Zn_2 grupları ise yüksek ve düşük düzeyde ham yağ içeriği saptanan gruplardan farklı bulunmamıştır (Çizelge 4.8).

Günlük yaştaki civcivlerin tüm vücuda ait ham kül düzeyi sonuçları incelendiğinde Zn_1 grubu tüm gruplardan önemli düzeyde yüksek ham kül düzeyine ulaşmış, S1 ve Fe2 grupları

ise diğer gruplardan önemli düzeyde düşük bulunmuştur (Çizelge 4.8). Kontrol, S_2, Zn_2 ve $FeZn_1$ grupları S_1 ve Fe_2 grubuna göre daha yüksek düzeyde ham kül düzeyine sahip olduğu saptanmıştır. Fe_1 ve $FeZn_2$ gruplarında ham kül düzeyi incelendiğinde Zn_1 grubundan düşük, ancak S_1 ve Fe_2 gruplarından yüksek bulunmuş, kontrol S_2, Zn_2 ve $FeZn_1$ gruplarıyla benzer bulunmuştur (P= 0.003; Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin vücut bileşiminde kuru madde, ham yağ ve ham kül içeriğine ait ortalama değerleri (%) ve standart hatalar

	Kuru madde	**Ham Yağ**	**Ham Kül**
Kontrol	21.17 ± 0.48^{ab}	21.10 ± 1.01^{abc}	7.80 ± 0.16^{bc}
S_1	21.18 ± 0.45^{ab}	23.15 ± 1.01^{a}	7.58 ± 0.16^{c}
S_2	20.31 ± 0.45^{bc}	22.16 ± 1.01^{ab}	7.84 ± 0.16^{bc}
Fe_1	20.05 ± 0.45^{bc}	21.60 ± 1.01^{abc}	8.15 ± 0.16^{ab}
Fe_2	20.71 ± 0.43^{abc}	22.39 ± 1.01^{abc}	7.57 ± 0.16^{c}
Zn_1	19.64 ± 0.45^{c}	18.93 ± 1.01^{c}	8.42 ± 0.16^{a}
Zn_2	20.06 ± 0.43^{bc}	20.87 ± 1.01^{abc}	7.91 ± 0.16^{bc}
$FeZn_1$	21.78 ± 0.43^{a}	21.85 ± 1.01^{ab}	7.75 ± 0.16^{bc}
$FeZn_2$	20.72 ± 0.45^{abc}	19.32 ± 1.01^{bc}	8.19 ± 0.16^{ab}
P değeri	0.0276	0.097	0.003

Aynı sütundaki farklı üst ^{ab} simgelere sahip ortalamalar, $P<0.05$'te önemli ölçüde farklılık gösterir. Kontrol: İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su enjeksiyonu; Fe_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe enjeksiyonu; Zn_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_1$: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn; S_2: Amniyon kese 0.5 ml saf su; Fe_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe; Zn_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_2$: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn.

4.2.2 Kalıntı Sarı Kese Bileşimi

IO organik nano mineral uygulaması çıkışta günlük yaştaki civcivlerin kalıntı sarı kesesinde ölçülen kuru madde ve su içeriği gruplar arası önemli bir fark saptanmamıştır (P>0.05; Çizelge 4.9). Ancak günlük yaştaki civciv kalıntı sarı kesesinde incelenen ham kül ve yağ düzeyi üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemli saptanmıştır (P<0.05; Çizelge 4.9).

Günlük yaştaki civcivlerin kalıntı sarı kesesinde saptanan ham yağ % K, S_1 ve $FeZn_1$ gruplarında en yüksek düzeyde saptanmış, S_2 ve Fe_2 gruplarında önemli düzeyde düşük saptanmıştır. Günlük yaştaki civciv kalıntı sarı kesesindeki yağ düzeyi Fe_1, Zn_1, Zn_2 ve $FeZn_2$ gruplarında ise diğer gruplara benzer düzeyde saptanmıştır (P= 0.044; Çizelge 4.9).

Ham kül madde düzeyi incelendiğinde günlük yaştaki civcivlerin kalıntı sarı kesesinde en yüksek ham kül düzeyinin Zn_2 grubunda olduğu, en düşük ham kül madde düzeyinin ise Fe_1, Zn_1 ve $FeZn_2$ gruplarında saptanmıştır. Kontrol, S_1, S_2, Fe_2 ve $FeZn_1$ gruplarında civciv kalıntı sarı kesesinin ham kül düzeyi incelendiğinde yüksek ve düşük ham kül madde düzeyi incelenen gruplara benzer düzeyde ham kül madde düzeyi saptanmıştır (P= 0.028; Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin sarı kese bileşiminde kuru madde, ham yağ ve ham kül içeriğine ait ortalama değerler (%) ve standart hatalar

	Kuru madde	**Ham Yağ**	**Ham Kül**
Kontrol	52.42 ± 1.14	39.96 ± 1.28^{a}	4.21 ± 0.26^{ab}
S_1	52.84 ± 1.14	40.71 ± 1.28^{a}	4.27 ± 0.26^{ab}
S_2	51.42 ± 1.21	35.67 ± 1.28^{b}	4.23 ± 0.27^{ab}
Fe_1	51.87 ± 1.21	38.70 ± 1.28^{ab}	3.82 ± 0.27^{b}
Fe_2	50.17 ± 1.21	36.70 ± 1.28^{b}	4.18 ± 0.26^{ab}
Zn_1	50.53 ± 1.14	38.78 ± 1.28^{ab}	3.65 ± 0.26^{b}
Zn_2	50.84 ± 1.21	37.64 ± 1.28^{ab}	4.61 ± 0.27^{a}
$FeZn_1$	52.01 ± 1.08	41.18 ± 1.28^{a}	3.89 ± 0.24^{ab}
$FeZn_2$	49.64 ± 1.21	37.04 ± 1.28^{ab}	3.79 ± 0.27^{b}
P değeri	0.555	0.044	0.028

Aynı sütundaki farklı üst ^{ab} simgelere sahip ortalamalar, $P<0.05$'te önemli ölçüde farklılık gösterir. Kontrol: İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su enjeksiyonu; Fe_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe enjeksiyonu; Zn_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_1$: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn; S_2: Amniyon kese 0.5 ml saf su; Fe_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe; Zn_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_2$: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn.

4.2.3 Tibia Kemiklerinin Bileşimi

Çıkışta günlük yaştaki civcivlerin tibia kemiklerinde kuru madde ve su içeriği düzeyi üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemli saptanmamıştır (P=0.367; Çizelge 4.10).

Çıkışta günlük yaştaki civcivlerin tibia kemiklerinin ham kül madde düzeyi üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemli saptanmamıştır (P=0.954; Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin tibia kemik bileşiminde kuru madde ve ham kül düzeyine ait ortalama değerler (%) ve standart hatalar

	Kuru madde	**Ham Kül**
Kontrol	30.56 ± 1.73	27.62 ± 0.68
S_1	27.48 ± 1.73	27.98 ± 0.68
S_2	26.29 ± 1.73	27.62 ± 0.68
Fe_1	25.48 ± 1.73	27.83 ± 0.68
Fe_2	28.43 ± 1.73	27.46 ± 0.68
Zn_1	26.55 ± 1.73	28.84 ± 0.68
Zn_2	26.80 ± 1.73	27.54 ± 0.68
$FeZn_1$	30.68 ± 1.73	27.74 ± 0.68
$FeZn_2$	27.34 ± 1.73	28.14 ± 0.68
P değeri	0.367	0.924

Aynı sütundaki farklı üst ^{ab} simgelere sahip ortalamalar, P<0.05'te önemli ölçüde farklılık gösterir. Kontrol: İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su enjeksiyonu; Fe_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe enjeksiyonu; Zn_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_1$: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn; S_2: Amniyon kese 0.5 ml saf su; Fe_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe; Zn_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_2$: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn.

4.3 Günlük Yaştaki Civcivlerin Tibia ve Femur Kemiklerinin Gelişimi

4.3.1 Tibia ve Femur Kemiklerinin Sağ ve Sol Kemik Ağırlık Ölçümleri

Çıkışta günlük yaştaki civcivlerin tibia ve femur kemiklerine ait ağırlık ölçümleri Çizelge 4.11 aracılığıyla verilmiştir.

Günlük yaştaki civcivlerin sağ tibia ve sağ femur kemiklerinin ağırlık ölçümleri üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemsiz olduğu saptanmıştır (P=0.544; Çizelge 4.11).

Çıkışta günlük yaştaki civcivlerin sol tibia kemiklerinin ağırlık ölçümleri üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemli saptanmamıştır (P=0.590; Çizelge 4.11). İncelenen sol femur kemiklerinin ağırlık ölçümleri üzerinde benzer şekilde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemli saptanmamıştır (P=0.572; Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin sağ tibia, sağ femur ve sol tibia, sol femur kemik ağırlıklarına (mg) ait ortalama değerler ve standart hatalar

	Sağ tibia ağırlığı	**Sağ femur ağırlığı**	**Sol tibia ağırlığı**	**Sol femur ağırlığı**
Kontrol	0.30 ± 0.016	0.18 ± 0.011	0.30 ± 0.016	0.18 ± 0.009
S_1	0.29 ± 0.016	0.17 ± 0.011	0.29 ± 0.016	0.17 ± 0.009
S_2	0.31 ± 0.016	0.17 ± 0.11	0.30 ± 0.016	0.18 ± 0.009
Fe_1	0.29 ± 0.016	0.17 ± 0.11	0.29 ± 0.016	0.17 ± 0.009
Fe_2	0.29 ± 0.016	0.17 ± 0.11	0.29 ± 0.016	0.17 ± 0.009
Zn_1	0.28 ± 0.016	0.16 ± 0.11	0.28 ± 0.016	0.17 ± 0.009
Zn_2	0.29 ± 0.016	0.18 ± 0.11	0.29 ± 0.016	0.17 ± 0.009
$FeZn_1$	0.27 ± 0.016	0.15 ± 0.11	0.27 ± 0.016	0.16 ± 0.009
$FeZn_2$	0.26 ± 0.016	0.15 ± 0.11	0.25 ± 0.016	0.15 ± 0.009
P değeri	0.544	0.753	0.590	0.572

Aynı sütundaki farklı üst ^{ab} simgelere sahip ortalamalar, P<0.05'te önemli ölçüde farklılık gösterir. Kontrol: İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su enjeksiyonu; Fe_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe enjeksiyonu; Zn_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_1$: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn; S_2: Amniyon kese 0.5 ml saf su; Fe_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe; Zn_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_2$: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn.

4.3.2 Tibia ve Femur Kemiklerinin Sağ ve Sol Uzunluk Ölçümleri

Çıkışta günlük yaştaki civcivlerin tibia ve femur ölçüm değerleri Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çıkışta günlük yaştaki civcivlerin sağ tibia kemiklerine ait uzunluk ölçümleri üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemli bulunmamıştır (P=0.901; Çizelge 4.12). Günlük yaştaki civcivlerin femur uzunluklarına ait ölçümleri incelendiğinde benzer şekilde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemli bulunmamıştır (P=0.975; Çizelge 4.12).

Günlük yaştaki civcivlerin sol tibia kemik uzunluklarına ait ölçümler incelendiğinde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemli bulunmamıştır (P=0.938; Çizelge 4.12). Günlük yaştaki civcivlerin incelenen sol femur kemik uzunlukları üzerinde benzer şekilde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemli bulunmamıştır (P=0.971; Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin sağ tibia, sağ femur ve sol tibia, sol femur kemiklerinde uzunluk ölçümlerine (mm) ait ortalama değerleri ve standart hatalar

	Sağ tibia uzunluğu	**Sağ femur uzunluğu**	**Sol tibia uzunluğu**	**Sol femur uzunluğu**
Kontrol	30.83 ± 0.39	22.37 ± 0.32	30.79 ± 0.41	22.45 ± 0.33
S_1	31.00 ± 0.39	22.55 ± 0.32	30.95 ± 0.41	22.45 ± 0.33
S_2	31.15 ± 0.39	22.44 ± 0.32	31.10 ± 0.41	22.43 ± 0.33
Fe_1	30.80 ± 0.39	22.43 ± 0.32	30.72 ± 0.41	22.46 ± 0.33
Fe_2	30.96 ± 0.39	22.42 ± 0.32	30.83 ± 0.41	22.44 ± 0.33
Zn_1	30.80 ± 0.39	22.42 ± 0.32	30.84 ± 0.41	22.50 ± 0.33
Zn_2	30.86 ± 0.39	22.48 ± 0.32	30.79 ± 0.41	22.50 ± 0.33
$FeZn_1$	30.00 ± 0.39	22.44 ± 0.32	30.87 ± 0.41	22.33 ± 0.33
$FeZn_2$	31.24 ± 0.39	21.98 ± 0.32	30.20 ± 0.41	21.96 ± 0.033
P değeri	0.901	0.975	0.938	0.971

Aynı sütundaki farklı üst ^{ab} simgelere sahip ortalamalar, P<0.05'te önemli ölçüde farklılık gösterir. Kontrol: İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su enjeksiyonu; Fe_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe enjeksiyonu; Zn_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_1$: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn; S_2: Amniyon kese 0.5 ml saf su; Fe_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe; Zn_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_2$: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn.

4.3.3 Tibia ve Femur Kemiklerinin Ayrı Ayrı Sağ ve Sol Çap Ölçümleri

Çıkışta günlük yaştaki civcivlerin tibia ve femur kemiklerinin çaplarına ait ölçümler Çizelge 4.13 aracılığıyla verilmiştir.

Günlük yaştaki civcivlerin incelenen sağ tibia kemik çapları üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemli saptanmıştır ($P<0.05$; Çizelge 4.13). Günlük yaştaki civcivlere ait sağ tibia kemiklerinin çap ölçümleri F_1 grubunda önemli düzeyde yüksek saptanmış, Fe_2 grubunda ise önemli düzeyde düşük saptanmıştır. Sağ tibia çap ölçümleri K, S_1,S_2, Zn_1,Zn_2, $FeZn_1$ ve $FeZn_2$ gruplarında ise yüksek ve düşük ölçümlerin bulunduğu gruplara benzer saptanmıştır ($P=0.020$; Çizelge 4.13).

Günlük yaştaki civcivlerde incelenen sağ femur çap ölçümleri üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemli saptanmamıştır ($P=0.337$; Çizelge 4.13).

Günlük yaştaki civcivlerin sol tibia kemiklerine ait çap ölçümleri incelendiğinde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemli saptanmamıştır ($P=0.140$; Çizelge 4.13). Sol femur çap ölçümleri incelendiğinde benzer şekilde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemsiz saptanmıştır ($P=0.227$; Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin sağ tibia, sağ femur ve sol tibia, sol femur kemiklerinde çap ölçümlerine (mm) ait ortalama değerleri ve standart hatalar

	Sağ tibia çap	**Sağ femur çap**	**Sol tibia çap**	**Sol femur çap**
Kontrol	1.75 ± 0.023^{bc}	1.73 ± 0.028	1.77 ± 0.025	1.74 ± 0.027
S_1	1.74 ± 0.023^{bc}	1.67 ± 0.028	1.72 ± 0.025	1.68 ± 0.027
S_2	1.73 ± 0.023^{bc}	1.68 ± 0.028	1.72 ± 0.025	1.67 ± 0.027
Fe_1	1.80 ± 0.023^{a}	1.72 ± 0.028	1.78 ± 0.025	1.72 ± 0.027
Fe_2	1.69 ± 0.023^{d}	1.67 ± 0.028	1.69 ± 0.025	1.64 ± 0.027
Zn_1	1.76 ± 0.023^{bc}	1.72 ± 0.028	1.74 ± 0.025	1.71 ± 0.027
Zn_2	1.75 ± 0.023^{bc}	1.72 ± 0.028	1.72 ± 0.025	1.68 ± 0.027
$FeZn_1$	1.79 ± 0.023^{bc}	1.75 ± 0.028	1.77 ± 0.025	1.72 ± 0.027
$FeZn_2$	1.71 ± 0.023^{bc}	1.67 ± 0.028	1.70 ± 0.025	1.66 ± 0.027
P değeri	0.020	0.337	0.140	0.227

Aynı sütundaki farklı üst ^{abcd} simgelere sahip ortalamalar, P<0.05'te önemli ölçüde farklılık gösterir. VKİ: vücut kitle indeksi; Kontrol: İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su enjeksiyonu; Fe_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + nano Fe enjeksiyonu; Zn_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + nano Zn; $FeZn_1$: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + nano Fe+Zn; S_2: Amniyon kese 0.5 ml saf su; Fe_2: Amniyon kese 0.5 ml ovo saf su + nano Fe; Zn_2: Amniyon kese 0.5 ml ovo saf su + nano Zn; $FeZn_2$: Amniyon kese 0.5 ml nano ovo saf su + Fe+Zn.

4.4 Günlük Yaştaki Civcivlerin Sarı Kese Kalıntı, Plazma Serum ve Tibia Kemiklerinin Mineral Düzeyleri

4.4.1 Kalıntı Sarı Kese Fe ve Zn Mineral Düzeyleri

Çıkışta günlük yaştaki civcivlerin kalıntı sarı kesesinde Fe ve Zn mineral düzeyleri Çizelge 4.14'te verilmiştir.

Günlük yaştaki civcivlerin kalıntı kesesinde Fe mineral düzeyi üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyonunun etkisi önemli saptanmıştır (P=0.046; Çizelge 4.14). Kalıntı sarı kese Fe mineral düzeyi kontrol ve S_1 grubunda yüksek saptanırken, en düşük kalıntı sarı kese Fe düzeyi S_2 ve Fe_1 grubunda saptanmıştır. Kalıntı sarı kese düzeyi Fe_2, Zn_1, Zn_2, $FeZn_1$ ve $FeZn_2$ gruplarında ise yüksek ve düşük Fe düzeyi saptanan gruplarla benzer bulunmuştur.

Kalıntı sarı kese Zn düzeyi üzerinde de benzer şekilde İO organik nano mineral enjeksiyonunun etkisi önemsiz saptanmıştır (P>0.05; Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin kalıntı sarı kesesinde Fe (ppm) ve Zn (ppm) mineral düzeylerine ait ortalama değerler ve standart hatalar

	Fe	**Zn**
Kontrol	30.02 ± 4.21^{a}	28.18 ± 8.55
S_1	31.11 ± 4.21^{a}	44.58 ± 8.55
S_2	19.5 ± 4.46^{b}	17.25 ± 9.06
Fe_1	18.21 ± 4.46^{b}	18.40 ± 9.06
Fe_2	25.01 ± 4.46^{ab}	24.19 ± 9.06
Zn_1	23.11 ± 4.2^{ab}	22.97 ± 8.55
Zn_2	20.29 ± 4.46^{ab}	31.50 ± 9.06
$FeZn_1$	26.11 ± 3.99^{ab}	34.16 ± 8.11
$FeZn_2$	27.04 ± 4.46^{ab}	18.65 ± 9.06
P değeri	0.046	0.399

Aynı sütundaki farklı üst ^{abc} simgelere sahip ortalamalar, P<0.05'te önemli ölçüde farklılık gösterir. Kontrol: İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su enjeksiyonu; Fe_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe enjeksiyonu; Zn_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_1$: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn; S_2: Amniyon kese 0.5 ml saf su; Fe_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe; Zn_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_2$: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn.

4.4.2 Plazma serum Fe ve Zn Mineral Düzeyleri

Çıkışta günlük yaştaki civcivlerin plazma serumunda incelenen Fe ve Zn düzeyleri Çizelge 4.15'da verilmiştir.

Günlük yaştaki civcivlerin plazma serum Fe düzeyi incelendiğinde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemli bulunmuştur (P=0.067; Çizelge 4.15). Ancak plazma serum Zn düzeyi üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemli saptanmamıştır (P>0.05; Çizelge 4.15).

Plazma serum Fe düzeyi S_2 grubunda yüksek saptanmış olup kontrol grubunda oldukça düşük saptanmıştır. Plazma serum Fe düzeyi Fe_1 ve Fe_2 gruplarında S_2 grubuna benzer ancak düşük saptanmıştır. S_1 ve Zn_2 grupları kontrol grubuna benzer düzeyde düşük saptanmıştır. Plazma serumunda Fe düzeyi incelenen Zn_1, $FeZn_1$ ve $FeZn_2$ gruplarında ise yüksek ve düşük Fe mineral düzeyi saptanan gruplardan farklı bulunmamıştır (P=0.067; Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin plazma serumunda Fe (ppm) ve Zn (ppm) düzeylerine ait ortalama değerler ve standart hatalar

	Fe	**Zn**
Kontrol	3.74 ± 0.76^{c}	2.24 ± 0.23
S_1	4.32 ± 0.76^{bc}	3.05 ± 0.23
S_2	7.40 ± 0.76^{a}	2.75 ± 0.23
Fe_1	5.93 ± 0.76^{ab}	2.54 ± 0.23
Fe_2	5.98 ± 0.76^{ab}	2.55 ± 0.23
Zn_1	5.43 ± 0.76^{abc}	2.64 ± 0.23
Zn_2	4.88 ± 0.76^{bc}	2.54 ± 0.23
$FeZn_1$	5.66 ± 0.76^{abc}	2.47 ± 0.23
$FeZn_2$	5.72 ± 0.76^{abc}	2.41 ± 0.43
P değeri	0.067	0.475

Aynı sütundaki farklı üst ^{abc} simgelere sahip ortalamalar, P<0.05'te önemli ölçüde farklılık gösterir. Kontrol: İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su enjeksiyonu; Fe_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe enjeksiyonu; Zn_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_1$: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn; S_2: Amniyon kese 0.5 ml saf su; Fe_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe; Zn_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_2$: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn.

4.4.3 Tibia Kemiklerinin Ca ve P Mineral Düzeyleri

Çıkışta günlük yaştaki civcivlerin tibia kemiklerinde Ca ve P düzeyleri Çizelge 4.16^'da verilmiştir.

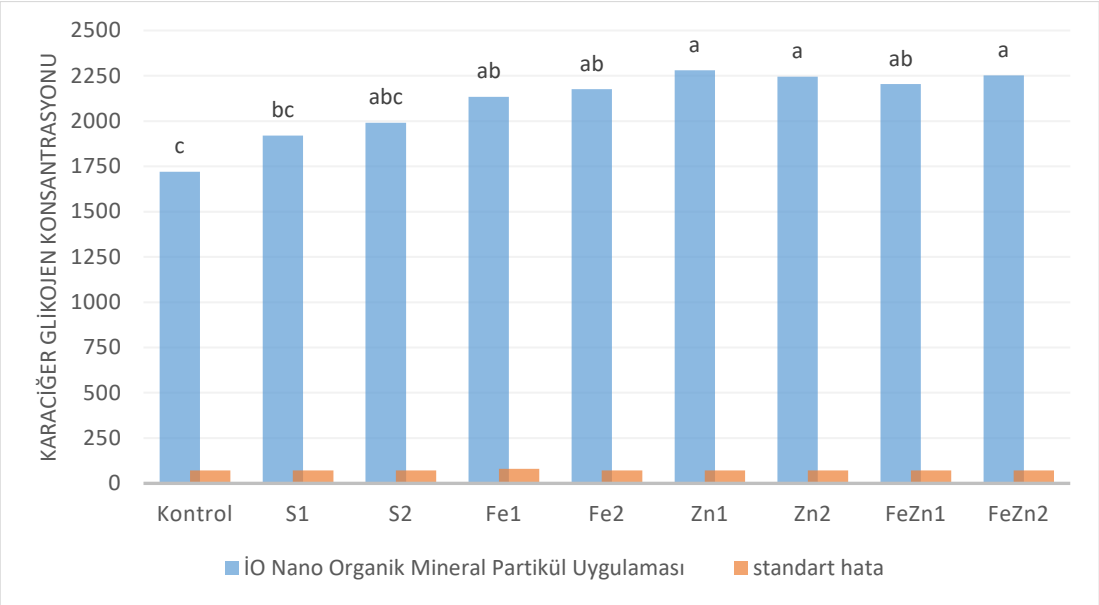
Günlük yaştaki civcivlerin tibia kemiklerinde incelenen kalsiyum düzeyi üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi gruplar arasında önemli bir farklılık göstermemiştir (P=0.569; Çizelge 4.16). Tibia kemiklerinde P düzeyine sonuçlarına göre yine kontrol ve diğer uygulama gruplarında İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisine ait önemli bir fark saptanmamıştır (P>0.05; Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin tibia kemiklerinde Ca (ppm) ve P (ppm) mineral düzeylerine ait ortalama değerler ve standart hatalar

	Ca	**P**
Kontrol	544.74 ± 63.08	1562.13 ± 334.96
S_1	505.94 ± 63.08	1594.33 ± 334.96
S_2	396.14 ± 63.08	1666.25 ± 334.96
Fe_1	416.20 ± 63.08	1278.37 ± 334.96
Fe_2	375.98 ± 63.08	1604.87 ± 334.96
Zn_1	508.62 ± 63.08	1693.83 ± 334.96
Zn_2	419.66 ± 63.08	1282.67 ± 334.96
$FeZn_1$	460.38 ± 63.08	1261.58 ± 334.96
$FeZn_2$	423.59 ± 63.08	1703.94 ± 334.96
P değeri	0.569	0.958

Aynı sütundaki farklı üst ^{abc} simgelere sahip ortalamalar, P<0.05'te önemli ölçüde farklılık gösterir. Kontrol: İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su enjeksiyonu; Fe_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe enjeksiyonu; Zn_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_1$: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn; S_2: Amniyon kese 0.5 ml saf su; Fe_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe; Zn_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_2$: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn.

4.5 Günlük Yaştaki Civcivlerin Karaciğer Dokusunda Glikojen Düzeyleri

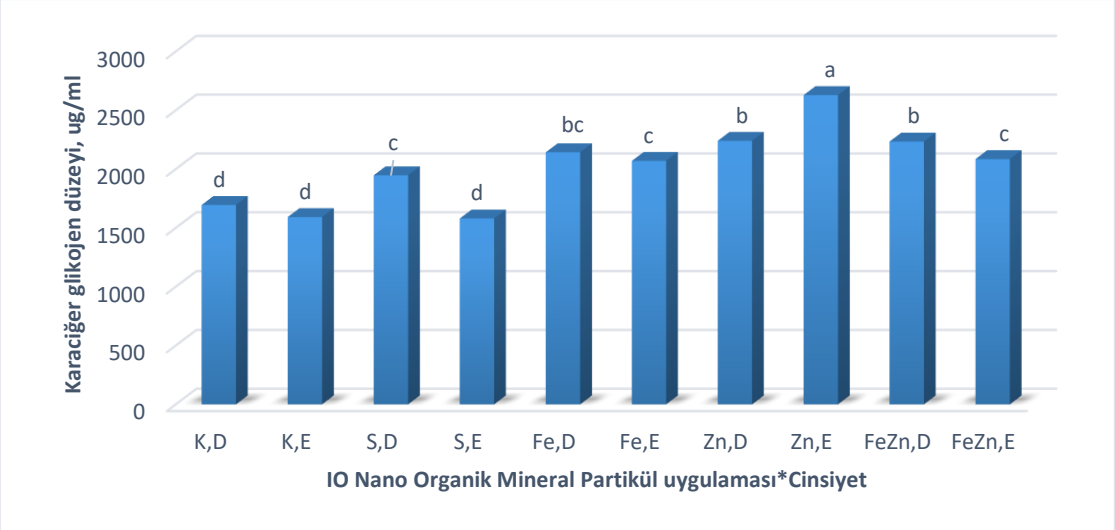


Şekil 4.1 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin karaciğer glikojen konsantrasyonu düzeyine ait ortalama değerler ve standart hatalar

Aynı sütundaki farklı üst ^{abc} simgelere sahip ortalamalar, P<0.05'te önemli ölçüde farklılık gösterir. Kontrol: İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su enjeksiyonu; Fe_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe enjeksiyonu; Zn_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_1$: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn; S_2: Amniyon kese 0.5 ml saf su; Fe_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe; Zn_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_2$: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn.

Kuluçkanın 21. gününde çıkış yapmış günlük yaştaki civcivlere ait karaciğer glikojen düzeyi üzerine IO organik nano Fe ve Zn ile bu mineral enjeksiyonunun etkisi oldukça önemli bulunmuştur (P=0.0001; Şekil 4.1). Bu sonuçlara göre, en düşük karaciğer glikojen düzeyi kontrol grubunda saptanmıştır. Her iki embriyonik keseye uygulanan İO organik nano mineral enjeksiyon gruplarında karaciğer glikojen düzeyi kontrol grubuna göre önemli düzeyde daha yüksek saptanmıştır. Karaciğer glikojen düzeyi Zn_1, Zn_2 ve $FeZn_2$ gruplarında kontrole göre önemli düzeyde artış göstermiş ve bu gruplarda karaciğer glikojen düzeyi S1 grubundan da önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.1). Saf su (S_1 ve S_2) grupları kontrole benzer karaciğer glikojen düzeyine sahip olmuştur. Kontrol grubu ile kıyaslandığında Fe_1, Fe_2 ve $FeZn_1$ gruplarında karaciğer glikojen düzeyi oldukça yüksek elde edilmiş, ancak bu gruplar S_1 grubuna benzer karaciğer glikojen düzeyine sahip olmuştur (Şekil 4.1). Karaciğer

glikojen konsantrasyonu S_2 grubunda kontrol, S_1 ve mineral enjeksiyon gruplarına göre farklılık göstermemiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.2 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin karaciğer glikojen konsantrasyonu düzeyi ve cinsiyet arasındaki interaksiyon etkisin ait ortalama değerler ve standart hatalar

Aynı sütundaki farklı üst ^{abcd} simgelere sahip ortalamalar, $P<0.05$'te önemli ölçüde farklılık gösterir. Kontrol: İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su enjeksiyonu; Fe_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe enjeksiyonu; Zn_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_1$: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn.

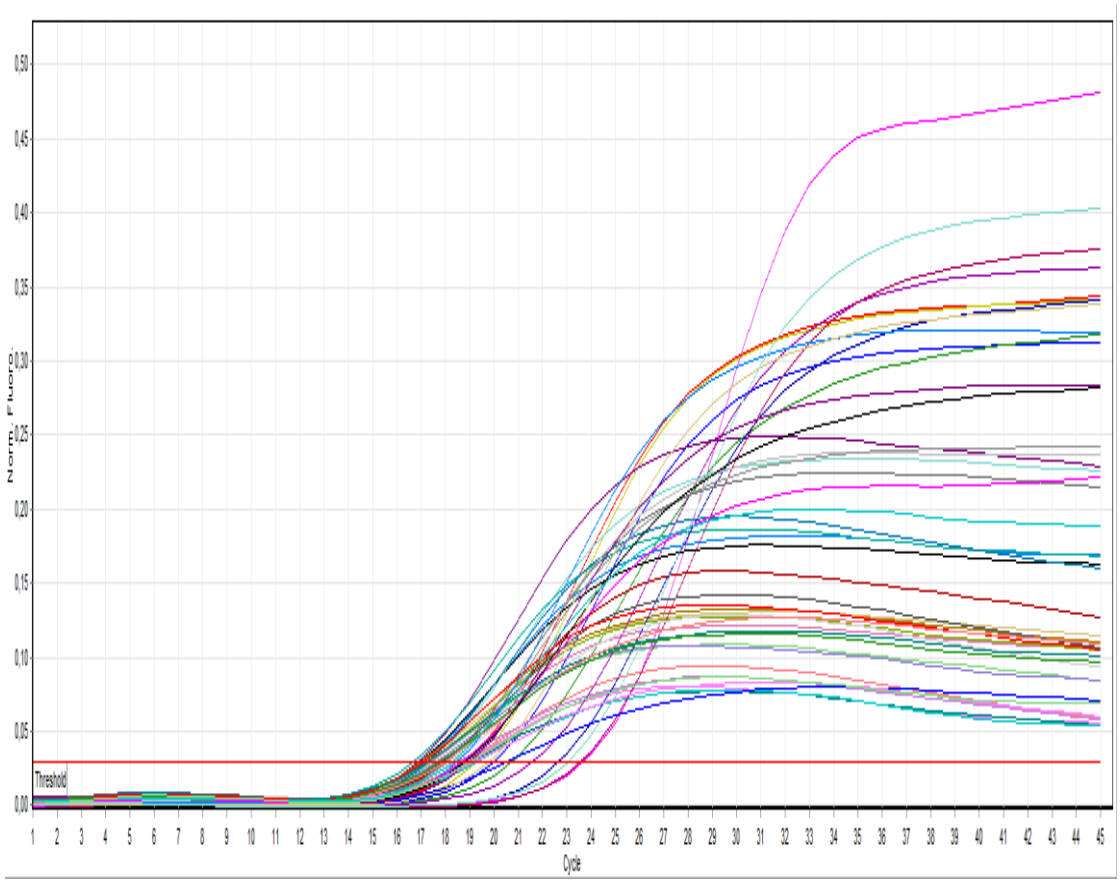
Etlik civcivlerin karaciğer glikojen düzeyi üzerine İO organik nano mineral uygulaması ve cinsiyet arasındaki interaksiyon önemli saptanmıştır ($P=0.029$; Şekil 4.2). Bu interaksiyon in ovo organik nano Zn enjeksiyon grubunun en yüksek karaciğer glikojen düzeyine sahip olması ve bu artışın erkek yönlü cinsiyette daha yüksek olmasından kaynaklanmıştır (Şekil 4.2). Bu sonucun aksine, İO organik nano FeZn ve S gruplarında dişi civcivlerin erkek civcivlere göre daha yüksek glikojen düzeyi gösterdiği, bunların dışındaki diğer gruplarda (K ve Fe grupları) cinsiyetin etkisinin önemsiz olduğu saptanmıştır (Şekil 4.2).

4.6 Gen Ekspresyon Analiz Sonuçları

Karaciğer dokularında günlük yaştaki etlik civcivlerde incelenen TFRC genine ait analiz sonuçlarının belirlenmesi için referans gen olarak kullanılan β-aktin geni Real-Time PCR sonuçlarında otomatik threshot değeri 0.03 olarak cihaz üzerinde

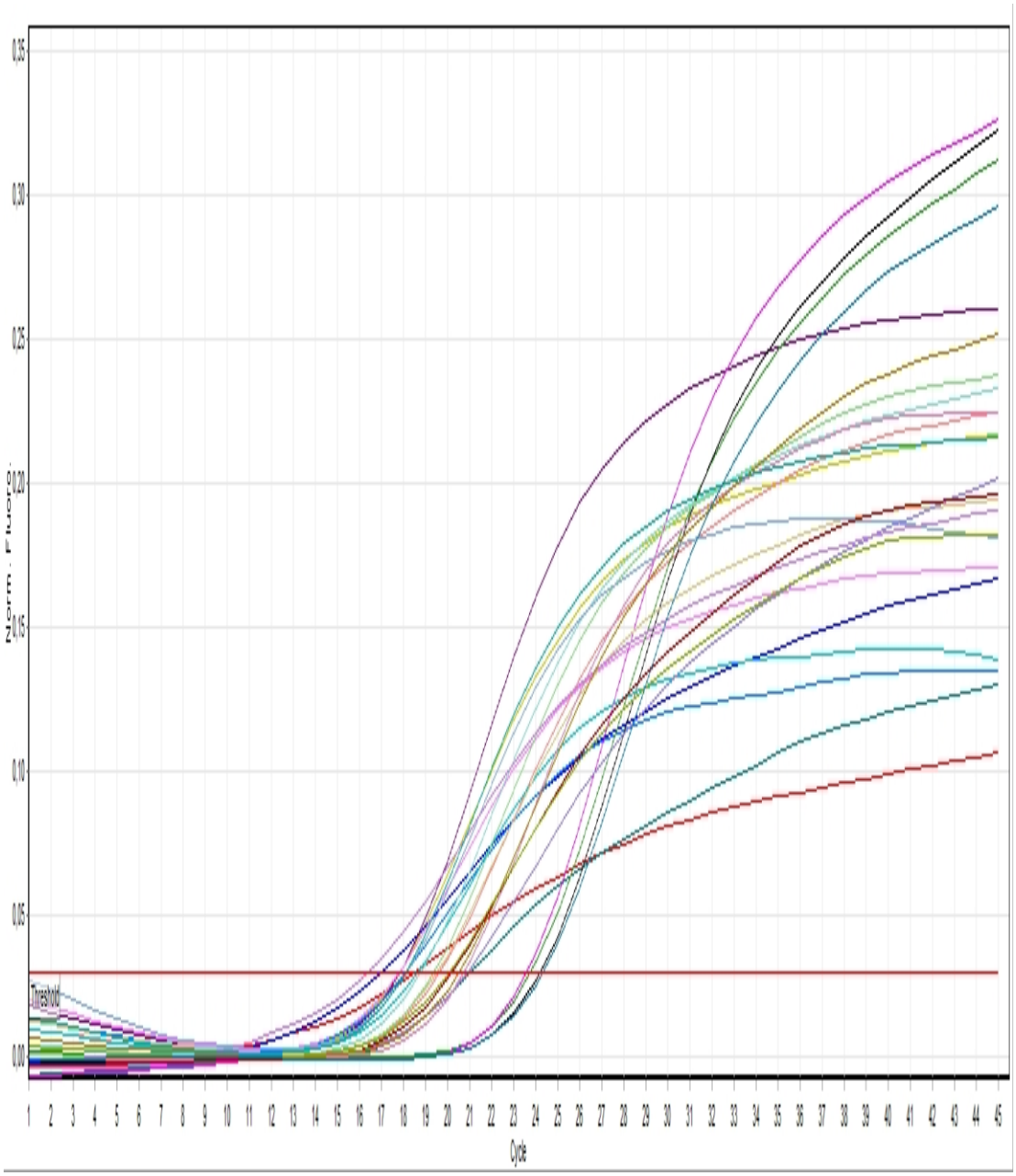
belirlenmiştir. Buna göre tüm örneklerin threshot değerinin üzerinde sonuç verdiği ve sigmoidal eğri oluşturdukları görülmüştür.

Çalışmada referans gen olarak kullanılan β-aktin geni Real-Time PCR sonuçlarında otomatik threshot değeri 0.03 olarak cihaz tarafından belirlenmiştir. Tüm örneklerin thereshot değerinin üzerinde olduğu ve ct değeri verdiği görülmüştür. β-aktin geni Real-Time PCR sonucu aşağıda verilmiştir (Şekil 4.3).



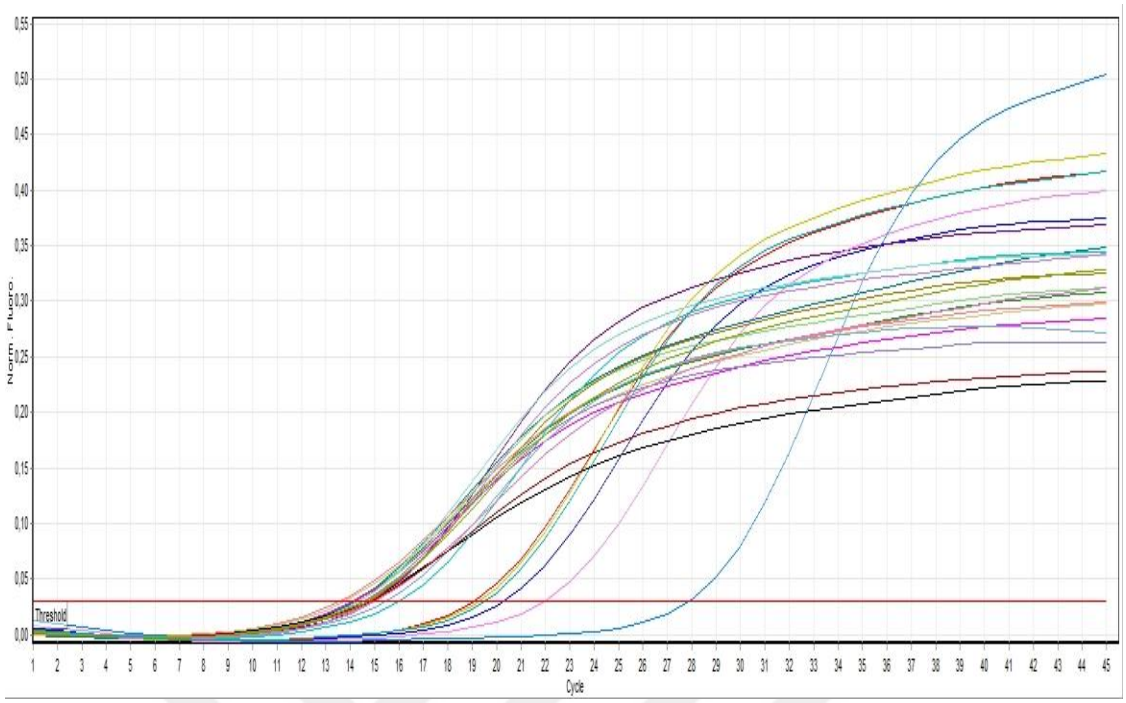
Şekil 4.3 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin karaciğer dokusunda saptanan MT ve TFRC genleri için referans gen olarak kullanılan β-aktin genine ait Real-Time PCR görüntüsü

Çalışmada MT (Matallothionein) genine spesifik sentezlenen primerlerin optimizasyonları gerçekleştirilmiş ve Real-Time PCR sonucunda cihaz tarafından otomatik threshot değeri 0,03 olarak belirlenmiştir. Tüm örneklerin threshot değerinin üzerinde sonuç verdiği ve sigmoidal eğri oluşturdukları görülmüştür. MT hedef genine ait Real-Time PCR sonucu aşağıda verilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin karaciğer dokusunda saptanan MT genine ait Real-Time PCR görüntüsü

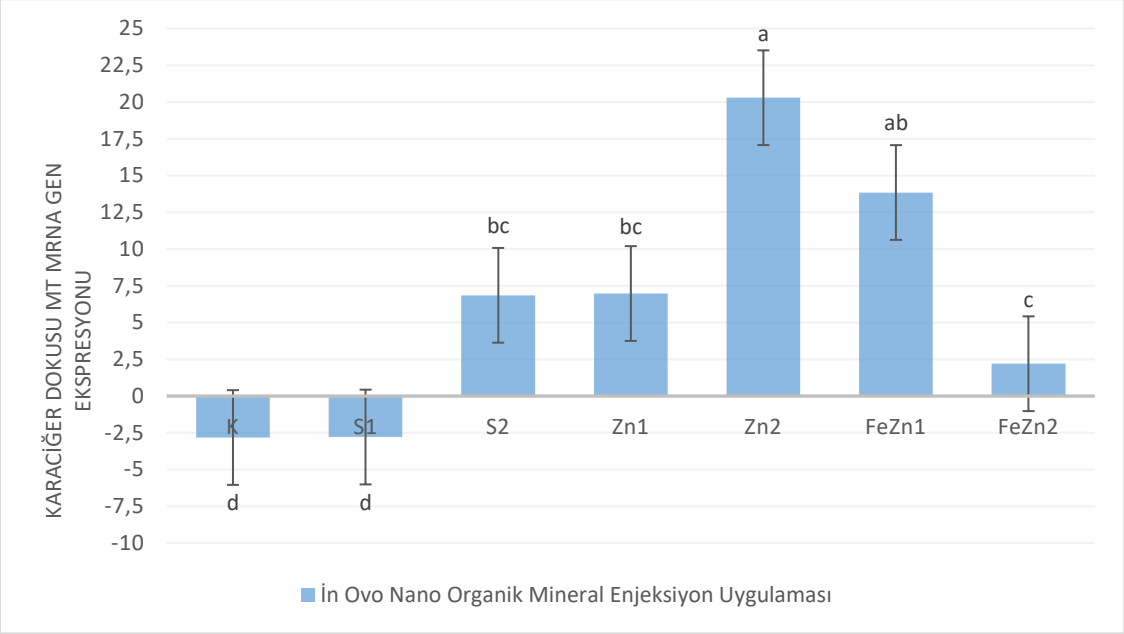
Çalışmada TFRC genine spesifik sentezlenen primerlerin optimizasyonları gerçekleştirilmiş ve Real-Time PCR sonucunda cihaz tarafından otomatik threshot değeri 0.03 olarak belirlenmiştir. Tüm örneklerin threshot değerinin üzerinde sonuç verdiği ve sigmoidal eğri oluşturdukları görülmüştür. TFRC hedef genine ait Real-Time PCR sonucu aşağıda verilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin karaciğer dokusunda saptanan TFRC genine ait Real-Time PCR görüntüsü

Günlük yaştaki etlik civcivlerin karaciğer dokularında incelenen MT (Metallothionein) genine ait ekspresyon düzeyleri tüm enjeksiyon grupları kendi aralarında ve kontrol grubuna göre karşılaştırılmak üzere elde edilen ortalamalar Şekil 4.6' da gösterilmiştir. Karaciğer dokusunda incelenen MT mRNA gen ekspresyon düzeyleri üzerine enjeksiyon gruplarının kontrol ve S1 gruplarına göre önemli düzeyde yukarı yönlü ekspresyon saptanmıştır ($P<0.0001$; Şekil 4.6). Kontrol grubu MT gen ekspresyon düzeyi yaklaşık – 3 olarak önemli düzeyde diğer gruplara göre daha düşük bulunmuş, sarı kese enjeksiyon grubu olan S_1 grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında benzer ekspresyon düzeyine sahip olmuştur. Amniyon kese saf su enjeksiyon grubu olan S_2 grubunda ise MT gen ekspresyon düzeyi kontrol grubuna göre yaklaşık 10 kat daha yüksek bulunmuştur. Sarı kese IO organik nano Zn enjeksiyon grubu olan Zn_1 grubu ve Zn_2 grubu incelendiğinde Zn_1 grubu kontrol grubuna göre yaklaşık 10 kat yüksek MT mRNA ekspresyon düzeyi ile sonuçlanırken, bu sonuç Zn_2 grubunda yaklaşık 23 kat daha yüksek bulunmuştur. Amniyon keseye enjeksiyon grubu olan Zn_2 grubu tüm diğer gruplardan daha yüksek MT mRNA gen ekspresyon düzeyine sahip olurken, FeZn1 grubu ile benzer MT gen ekspresyon düzeyi elde edilmiştir. Kombine grupları oluşturan $FeZn_1$

ve $FeZn_2$ grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sarı kese IO organik nano Fe+Zn enjeksiyon grubu olan $FeZn_1$ grubu kontrol grubundan yaklaşık 17 kat yüksek ekspresyon düzeyi gözlemlenmiş, amniyon kese IO organik nano Fe+Zn enjeksiyon grubu olan $FeZn_2$ grubu ise yaklaşık 5 kat yüksek düzeyde MT mRNA gen ekspresyon düzeyi gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).

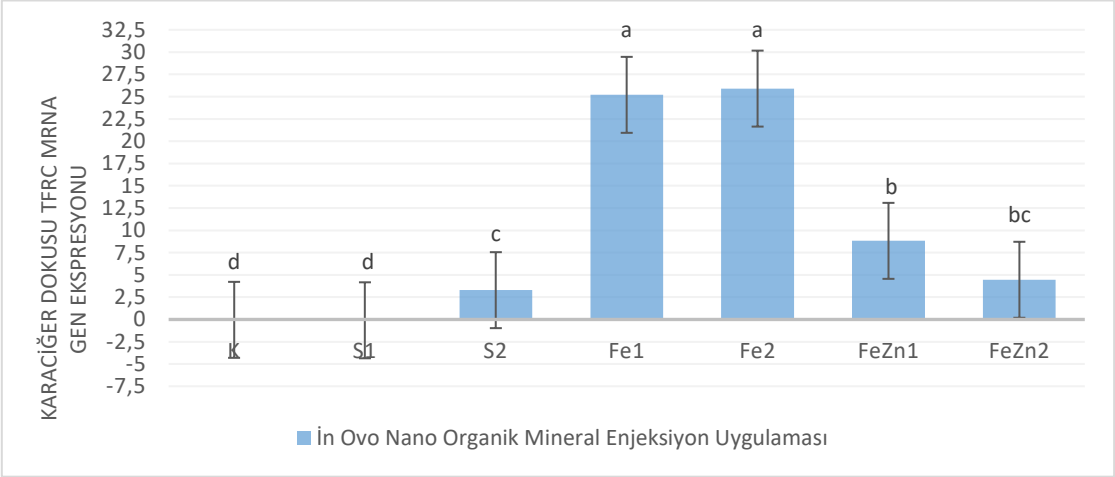


Şekil 4.6 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin karaciğer dokusunda MT mRNA gen ekspresyon düzeyine ait ortalama değerler ve standart hatalar

Aynı sütundaki farklı üst [abcd] simgelere sahip ortalamalar, P<0.05'te önemli ölçüde farklılık gösterir. Kontrol: İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su enjeksiyonu; Fe_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe enjeksiyonu; Zn_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_1$: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn; S_2: Amniyon kese 0.5 ml saf su; Fe_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe; Zn_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_2$: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn. (P=0.0001)

Günlük yaştaki etlik civcivlerin karaciğer dokularında incelenen TFRC (Transferrin reseptörü) genine ait ekspresyon düzeyleri deney grupları kontrol grubuna göre değerlendirilmiştir. Real Time PCR analizinden elde edilen TFRC mRNA gen ekspresyon düzeyleri Şekil 4.7' de verilmiştir. İncelenen TFRC mRNA gen ekspresyon düzeyleri üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisi önemli bulunmuştur (P<0.0001; Şekil 4.7). Kontrol grubu TFRC mRNA gen ekspresyon düzeyi yaklaşık -0.04 olarak saptanmıştır. Sarı kese saf su enjeksiyon grubu olan S_1 grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında benzer TFRC mRNA gen ekspresyon düzeyi gözlemlenmiştir.

Amniyon keseye enjekte edilen saf su grubu S_2 grubu ise kontrol grubundan yaklaşık 3 kat fazla TFRC mRNA gen ekspresyon düzeyi ile önemli bulunmuştur. Demir grupları incelendiğinde Fe_1 ve Fe_2 grupları önemli bulunmuş olup sarı kese IO organik nano Fe enjeksiyonu olan Fe_1 grubu kontrol grubuna göre yaklaşık 25 kat fazla TFRC mRNA gen ekspresyon düzeyi saptanmış, amniyon kese IO organik nano Fe enjeksiyon grubu olan Fe_2 grubu ise en yüksek TFRC mRNA ekspresyon düzeyi ile kontrol grubundan yaklaşık 26 kat fazla bulunmuştur. Her iki kese enjeksiyon grupları olan kombine grupları TFRC mRNA gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde sarı kese IO organik nano Fe+Zn enjeksiyon grubu olan $FeZn_1$ grubu kontrolden yaklaşık 9 kat fazla bulunmuş, amniyon kese IO organik nano Fe+Zn enjeksiyon grubu olan $FeZn_2$ grubu ise kontrolden yaklaşık 4 kat fazla mRNA gen ekspresyon düzeyi gözlemlenmiştir.

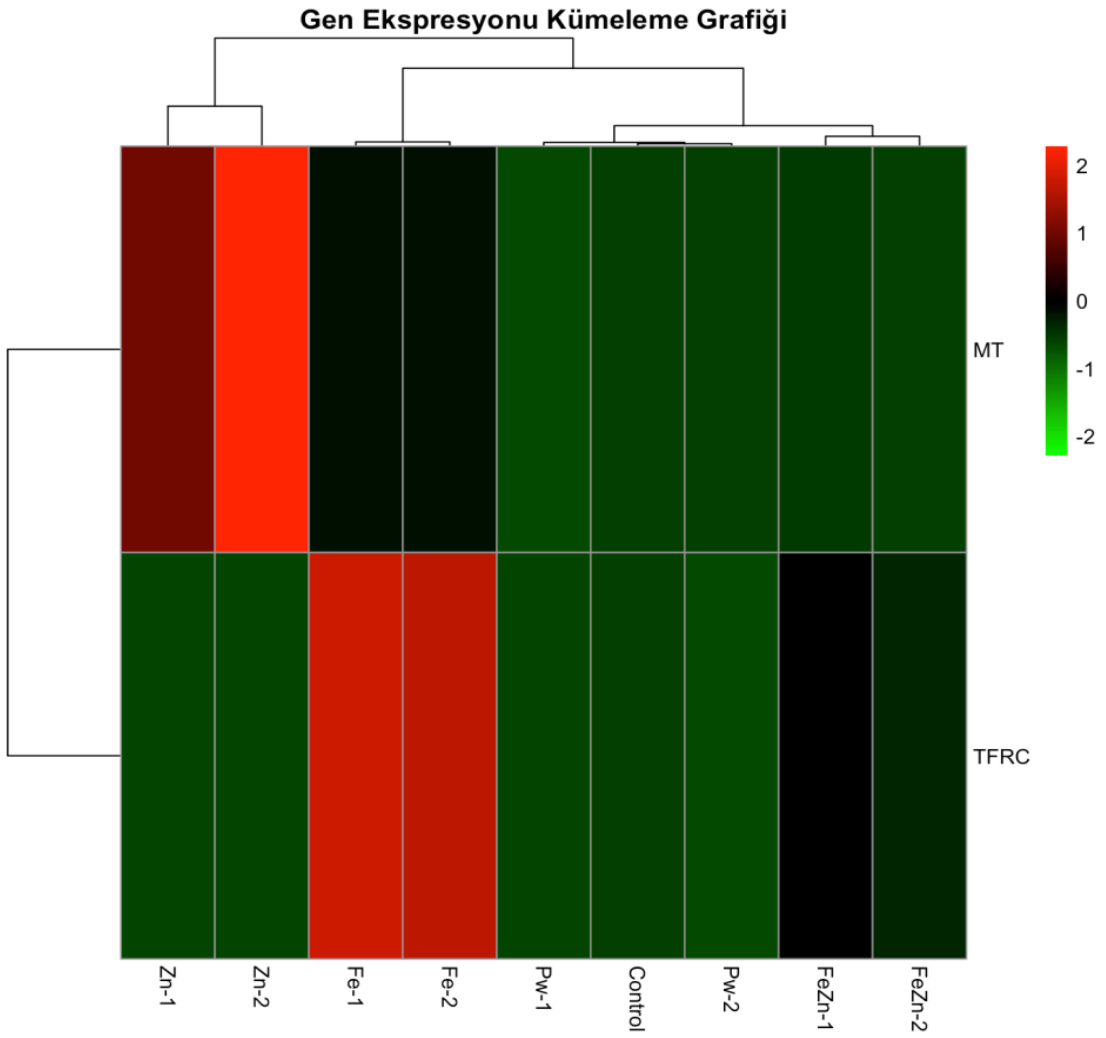


Şekil 4.7 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun çıkışta (21. gün) günlük yaştaki etlik civcivlerin karaciğer dokusunda TFRC mRNA gen ekspresyon düzeyine ait ortalama değerler ve standart hatalar

Aynı sütundaki farklı üst ^{abcd} simgelere sahip ortalamalar, $P<0.05$'te önemli ölçüde farklılık gösterir. Kontrol: İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su enjeksiyonu; Fe_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe enjeksiyonu; Zn_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_1$: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn; S_2: Amniyon kese 0.5 ml saf su; Fe_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe; Zn_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_2$: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn. ($P=0.003$).

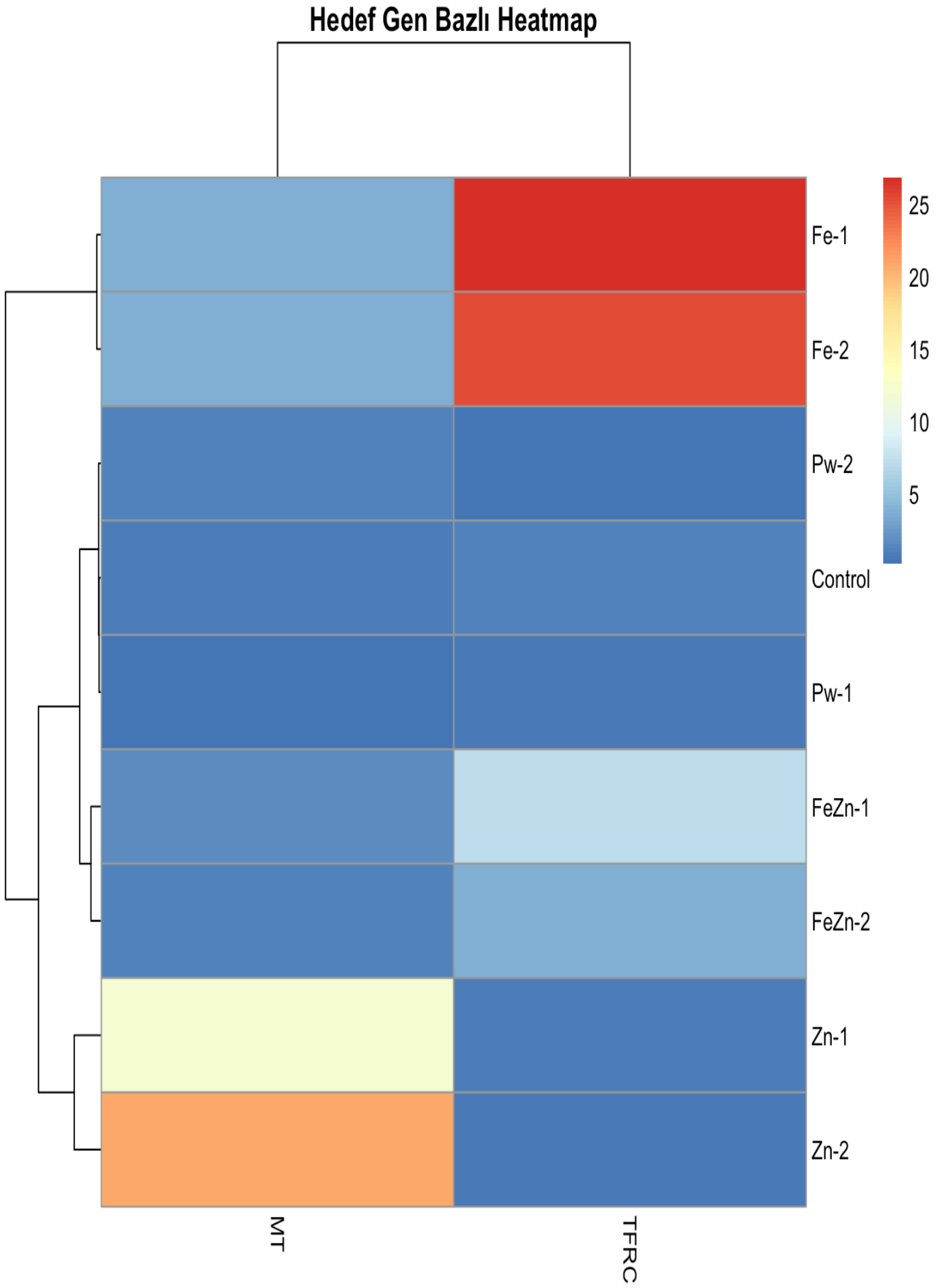
Hiyerarşik kümeleme (heatmap) grafiğinde (Şekil 4.8) eksende yer alan TFRC ve MT genleri incelenmiş ve renklere göre TFRC geni Fe_1 ve Fe_2 grupları hariç tüm gruplarda düşük ekspresyon göstermiştir. Bu sonuçlara göre TFRC geni demir varlığında kırmızı renk ile yüksek ekspresyon göstermiştir. Kontrol grubu koyu yeşil rengi ile düşük

ekspresyon düzeyi gösterirken siyah renkte olan $FeZn_1$ grubu ekspresyon düzeyinde değişiklik göstermemiştir.



Şekil 4.8 Hiyerarşik kümeleme (heatmap) grafiği

Hedef gen bazlı heatmap (ısı haritası) grafiğine göre (şekil 4.9) mavi renk düşük ekspresyon düzeylerini, beyaz ve açık renkler orta, kırmızı renk ise yüksek ekspresyon seviyelerini göstermektedir. Buna göre; dikey eksende yer alan deney grupları ve yatay eksende yer alan genler incelendiğinde TFRC geni Fe_1 ve Fe_2 gruplarında yüksek düzeyde ekspresyon göstermiştir. Diğer gruplarda ise düşük ekspresyon düzeyi göstermiştir. Aynı grafikte yer alan MT gen sonuçlarında Zn grupları olan Zn1 ve Zn2 gruplarında MT gen ekspresyonu yüksek diğer gruplarda ise düşük MT ekspresyon düzeyi göstermiştir.



Şekil 4.9 Hedef gen bazlı heatmap (ısı haritası) grafiği

4.7 Kuluçka Sonuçları

İn ovo organik nano mineral enjeksiyonu, minerallerin verildiği saf su enjeksiyonları ve kontrol gruplarında bulunan yumurtalara ait ağırlık ölçümleri fark olmaksızın gruplar arasında benzer saptanmıştır (P=0.554; Çizelge 4.18).

İn ovo enjeksiyon uygulama grupları ve kontrol grupları arasında döllülük oranına ait fark önemsiz saptanmıştır (P>0.05; Şekil 4.18).

Çizelge 4.17 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun etlik civcivlerin döllü yumurta, çıkış gücü ve kuluçka randımanına (%) ait ortalama değerler ve standart hatalar

	Döllülük oranı	**Çıkış gücü**	**Kuluçka randımanı**
Kontrol	88.23 ± 2.75	92.27 ± 2.32	89.94 ± 3.45^{b}
S_1	89.58 ± 2.75	87.31 ± 2.32	85.1 ± 3.45^{c}
S_2	90.35 ± 2.75	91.82 ± 2.32	87.04 ± 3.45^{c}
Fe_1	96.32 ± 2.75	81.16 ± 2.32	81.18 ± 3.45^{d}
Fe_2	91.91 ± 2.75	85.16 ± 2.32	85.19 ± 3.45^{c}
Zn_1	84.55 ± 2.75	92.87 ± 2.32	95.46 ± 3.45^{a}
Zn_2	89.70 ± 2.75	87.18 ± 2.32	87.21 ± 3.45^{c}
$FeZn_1$	88.97 ± 2.75	85.75 ± 2.32	79.09 ± 3.45^{d}
$FeZn_2$	91.91 ± 2.75	81.06 ± 2.32	81.33 ± 3.45^{d}
P değeri	0.241	0.350	0.244

Aynı sütundaki farklı üst ^{abc} simgelere sahip ortalamalar, P<0.05'te önemli ölçüde farklılık gösterir. Kontrol: İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su enjeksiyonu; Fe_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe enjeksiyonu; Zn_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_1$: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn; S_2: Amniyon kese 0.5 ml saf su; Fe_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe; Zn_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_2$: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn.

Çıkış gücü üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyon uygulamasının etkisi önemli saptanmıştır (P=0.0001; Çizelge 4.18). Çıkış gücü kontrol grubunda önemlid düzeyde yüksek, $FeZn_2$ grubunda ise önemli düzeyde düşük saptanmıştır.

Kuluçka randımanı üzerinde İO organik nano mineralerin etkisi önemsiz bulunmuştur (P>0.05; Çizelge 4.18).

İn ovo organik nanoenjeksiyon uygulamalarının etkisi erken ölüm, geç ölüm, kabuk altı ölüm ve toplam ölüm üzerindeki etkisi önemli bulunmuştur (P<0.05; Çizelge 4.19). Erken ölümler Zn_2 grubunda kontrol, S_1, S_2, Fe_1, Fe_2, Zn_1, $FeZn_1$ ve $FeZn_2$ gruplarına kıyasla önemli düzeyde yüksek saptanmıştır (P=0.0001; Çizelge 4.19). Geç ölümlerin incelendiği sonuçlarda $FeZn_1$ grubu oldukça önemli düzeyde yüksek geç ölüm saptanırken, en düşük geç ölüm kontrol ve S_2 gruplarında saptanmıştır. Kabuk altı ölümler S_2, Fe_1, Fe_2 ve $FeZn_1$ gruplarında önemli düzeyde yüksek saptanmış, erken ölüm düeyi ise kontrol, S_1, Zn_1ve Zn_2, FeZn gruplarında önemli düzeyde düşük saptanmıştır (P=0.0001; Çizelge 4.19).

Toplam ölümler incelendiğinde $FeZn_1$, Fe_1 ve $FeZn_2$ önemli düzeyde yüksek, Zn_1 grubunda ise önemli düzeyde düşük saptanmıştır (P=0.0001; Çizelge 4.19).

Çizelge 4.18 İn ovo organik nano mineral partikül enjeksiyonunun etlik embriyoların erken ölüm, geç ölüm, orta ölüm, kabuk altı ölüm ve toplam ölüm (%) ait ortalama değerler ve standart hatalar

Uyugulamalar	Erken ölüm	Orta Ölüm	Geç ölüm	Kabuk altı ölüm	Toplam ölüm
Kontrol	4.44 ± 0.82^{b}	4.44 ± 1.53	0 ± 1.36^{d}	1.72 ± 1.91^{c}	10.6 ± 3.45^{c}
S_1	2.22 ± 0.82^{c}	3.45 ± 1.53	9.23 ± 1.36^{a}	0 ± 1.91^{d}	14.9 ± 3.45^{b}
S_2	1.77 ± 0.82^{c}	4.44 ± 1.53	0 ± 1.36^{d}	6.39 ± 1.91^{b}	12.6 ± 3.45^{b}
Fe_1	0.73 ± 0.82	4.41 ± 1.53	3.83 ± 1.36^{c}	9.85 ± 1.91^{a}	18.82 ± 3.45^{a}
Fe_2	2.34 ± 0.82^{c}	0.73 ± 1.53	1.47 ± 1.36^{d}	10.27 ± 1.91^{a}	14.81 ± 3.45^{b}
Zn_1	0 ± 0.82^{d}	1.79 ± 1.53	5.32 ± 1.36^{b}	0 ± 1.91^{d}	4.54 ± 3.45^{d}
Zn_2	6.41 ± 0.82^{a}	3.81 ± 1.53	2.57 ± 1.36^{c}	0 ± 1.91^{d}	12.79 ± 3.45^{b}
$FeZn_1$	3.24 ± 0.82^{b}	3.08 ± 1.53	6.46 ± 1.36^{b}	8.13 ± 1.91^{b}	20.91 ± 3.45^{a}
$FeZn_2$	4.44 ± 0.82^{b}	4.30 ± 1.53	9.93 ± 1.36^{a}	0 ± 1.91^{d}	18.67 ± 3.45^{a}
P değeri	0.0001	0.223	0.0005	0.0001	0.0001

Aynı sütundaki farklı üst ^{abcde} simgelere sahip ortalamalar, P<0.05'te önemli ölçüde farklılık gösterir. Kontrol: İn ovo enjeksiyon yapılmayan grup; S_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su enjeksiyonu; Fe_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe enjeksiyonu; Zn_1: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_1$: Sarı kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn; S_2: Amniyon kese 0.5 ml saf su; Fe_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe; Zn_2: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Zn; $FeZn_2$: Amniyon kese 0.5 ml İn ovo saf su + organik nano Fe+Zn.

5. TARTIŞMA

5.1 Embriyo ve Civciv Gelişimi

Kuluçkanın 14.5 gününde sarı keseye in ovo enjeksiyonu yapılan nano Zn, Fe, Fe+Zn mineral uygulamasının etkisi kuluçkanın 16. ve 19. günündeki embriyo ağırlık üzerindeki etkisi önemsiz olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar, Łukasiewicz vd. (2020) kuluçkanın 1. günü in ovo nano ZnO uygulamasının 19. günde ölçülen embriyo ağırlığı sonucu ile uyumlu bulunmuştur. Benzer şekilde Ghane-Khoshkebijari vd. (2024) çalışmasında nano Zn in ovo uygulamasının canlı ağırlık üzerindeki etkisinin önemsiz olduğunu bildirmektedir. Ancak bu sonuçlardan farklı olarak Mwangi vd. (2017) organik Zn kaynağının 14-21 günlük yaşta canlı ağırlığı artırdığını bildirmektedir. Başka bir çalışmada Saki vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada İO enjeksiyon uygulaması ile Fe mineralinin nano, alimet ve nano alimet şelat formlarında ve farklı düzeylerde kullanımı ile bu minerallerin günlük yaştaki etlik piliçlerin ağırlıkları üzerindeki etkisi incelenmiş, sonuç olarak nano grupları bu çalışma ile uyumlu olarak benzer bulunmuş ancak alimet şelat formunda enjekte edilen Fe mineral grubunda civciv ağırlıklarının yüksek bulunduğu bildirilmektedir.

Mevcut çalışmadan farklı olarak Goel vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada ise nano partikül Fe mineralinin civciv ağırlığı üzerindeki etkisinin önemsiz olduğunu bildirmektedir. Mevcut çalışmanın diğer yaşları ele alındığında İO organik nano minerallerin günlük yaştaki civcivlerin ağırlığında önemli bir etkisi olmamıştır. Łukasiewicz vd. (2020) nano Zn mineralinin çeşitli çalışmalarda embriyo, civciv ağırlıkları ve büyütme dönemi alınan canlı ağırlıklar üzerindeki farklı etkilerden kaynaklı tutarsızlıkları nano partiküllerin nano ölçekteki boyutları, farklı kaynaklar kullanılarak elde edilen nano partikül türlerine ve dozuna, ayrıca deneysel tasarımdaki farklılıklara bağladığını bildirmektedir.

Bu çalışmada, kuluçkanın 16. gününde sarı keseye organik nano Fe enjeksiyonu embriyo uzunluğunu önemli düzeyde artırdı. Ancak Kuluçkanın 19. günü ve çıkış gününde uzunluk ölçümleri İO organik nano mineral enjeksiyonlarından etkilenmemiştir ($P>0.05$). Civciv uzunluğu, civciv gelişiminin tespiti için önemli bir ölçümdür (Meijerhof, 2009). Ayrıca civciv kalitesinin belirlenmesinde de oldukça önemli bir yere

sahiptir (Willemsen vd., 2008). Elde ettiğimiz bu bulgular kuluçkanın 12. ve 18. günlerinde İO yöntem ile uygulanan P, Mg, Ca, Zn, Mn, Cu minerallerin embriyo uzunluğu üzerinde olumlu önemli etkilerin olduğu bildirildiği Ahmed vd. (2023) sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

Ağırlık ölçümünün boy uzunluğu karesine bölünmesiyle hesaplanan vücut kitle indeksi, değeri vücudun normal, zayıf ya da aşırı kiloda olup olmadığı üzerinde fikir vermektedir (Zierle-Ghosh ve Jan, 2018). Mevcut çalışmanın bulguları VKİ hesaplamaları ile embriyonik yaşın 16. gününde İO organik nano mineraller civciv gelişimi üzerinde önemli etkiler meydana getirmiştir ($P<0.05$). VKİ ölçümleri ve bu ölçümler üzerinde minerallerin etkisi ile ilgili spesifik araştırmaların yeterli olmaması bu konu ile ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak İO organik nano Fe ve Zn partiküllerinin enjeksiyonunun embriyo gelişimini kuluçkanın 16. ve 19. gününde değişmeyen yumurta ve sarı kese ağırlığına bağlı olarak embriyo gelişimini ve çıkışta civciv gelişimini etkilemediğini bu çalışma sonuçları göstermiştir.

5.2 Kuluçka Sonuçları

Farklı formlarda Zn mineralinin 18. günde amniyon kese enjeksiyon uygulamasının kuluçka randımanında düşüş ile sonuçlandığı bildirilmektedir (Jose vd., 2018). Bu çalışmada ise organik nano mineral enjeksiyonlarının kuluçka randımanı (%) üzerinde önemli bir etkisi saptanmamıştır. Başka bir çalışmada Oliveira (2015) tarafından bildirildiğine göre kuluçkanın 17. gününde amniyon keseye enjekte edilen farklı düzeylerdeki (0.181 mg/ml ve 0.544 mg/ml) Zn mineral içeren mineral solüsyonlarının, kuluçka randımanının arttığı bildirilmektedir. Çalışmalar arasındaki farklar mineral formları ve doz kaynaklı etkilerden dolayı ortaya çıkmış olabilir.

Kuluçkalık yumurtaların rastgele seçilip gruplara dağıtılmasına rağmen erken ölümlern amniyon kese organik nano Zn mineral enjeksiyon grubunda yüksek saptanması dişi damızlık kaynaklı veya rasyon kaynaklı bir sonuç olableceği düşünülmektedir. Bu konuda daha fazla çalışma yapılması grekmektedir. İn ovo enjeksiyon uygulamalarından bağımsız olarak erken ölümler kuluçka koşulları ve genetik faktörlere bağlı olarak gerçekleşmekte olduğu ve erken ölümlerin kuluçka boyunca en yüksek ölüm oranlarının

olduğu dönem olarak bilinmektedir (Fechheimer, 1981). Bu çalışmada İO enjeksiyon uygulamalarının başladığı ilk günün 14.5. gün olması nedeniyle enjeksiyon uygulamasının erken ölüm üzerinde herhangi bir etkisi olmadığından diğer faktörlere ilişkin çalışmaların yapılması gereği vardır.

Elde edilen geç ölüm ile ilgili bulgular, özellikle sarı kese enjeksiyon uyglamaları yapılan gruplarda saptanmıştır. Amniyon kese Fe+Zn organik nano minerallerin enjeksiyonu yine geç ölümlerde kontrole göre önemli düzeyde ($P<0.05$) yüksek saptanmıştır. Bu sonuçlar diğer İO enjeksiyon uygulamaları ile kıyaslandığında aslında ölüm oranlarının normal olduğu görülmüştür ancak kontrol ve diğer düşük ölüm oranlarına sahip gruplarla kıyaslandığında farklar önemli bulunmuştur. Bu durumda sarı kese saf su etkisiyle enjeksiyon uygulamalarındaki geç ölüm oranlarındaki artışın sebebi olabileceği ve amniyon kese Fe+Zn mineral kombinasyon etkisinin geç ölümleri artırdığı yönünde bilgi verebilir. Kabuk altı ölümler incelendiğinde sarı kese ve amniyon kese organik nano Fe minerali ile sarı kese Fe+Zn minerallerinin etkisiyle artmıştır. Ayrıca sarı kese saf su enjeksiyon etkisiyle yinekabuk altı ölümlerinde artış saptanmıştır. Bu sonuçlarda diğer çalışma sonuçları ile kıyaslandığında aslında normal ama bu çalışmada düşük saptanan gruplarla karşılaştırıldığında önem ortaya çıkmıştır. Bu durum yine organik nano Fe ve Zn mineralleri ile bu minerallerin kombinasyonuna ait etkilerden kaynaklı meydana gelmiş olabilir. Toplam ölümlerde İO organik nano mineral enjeksiyonunun etkisiyle yüksek saptanmıştır. Sarı kese organik nano Fe minerali ve her iki embriyonik keseye enjekte edilen organik nano Fe+Zn mineral enjeksiyonunda toplam ölüm oranının yüksek saptanması ölümler üzerinde organik nano minerallerin olumsuz etkilerinin olduğu veya minerallerin formuna bağlı olarak ortaya çıktığı söylenebilir. Bu sonuçlar, organik nano Fe mineralinin embriyonik ölümler üzerinde önemli etkilerin saptanmadığını (Abd El-Azeem ve Abdel Rahman, 2022) ve nano Zn mineralinin farklı düzeylerde kuluçkanın 18. gününde amniyon kese enjeksiyonunun ölüm oranı üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı bildiren Joshua vd. (2016) çalışmalar ile paralellik göstermezken Sun vd. (2018) tarafından yapılan bir diğer çalışmada Zn-Lizin mineralinin farklı düzeylerini kuluçkanın 9-10. günlerinde sarı kese İO enjeksiyonunun embriyonik ölüm oranını azalttığı bildirildiği sonuçlar ile zıtlık göstermektedir.

5.3 Organ Gelişimi

Karaciğer ağırlıkları üzerinde İO organik nano mineral etkisinin embriyonik yaşın 16. gününde önemsiz olduğu saptanmıştır ($P>0.05$). Oransal karaciğer ağırlıkları incelendiğinde ise 16. günde in ovo mineral enjeksiyonun etkisi önemli ($P<0.05$) bulunmuştur. Embriyonik yaşın 19. gününde karaciğer ağırlığı 16. günden farklı olarak amniyon kese organik nano Zn mineralinin etkisi ile artmış, amniyon kese organik nano Fe enjeksiyonunun etkisiyle önemli düzeyde düşüş ortaya çıkmıştır. Oransal karaciğer ağırlığı üzerinde nano mineral etkisi 19. günde yalnızca amniyon kese yoluyla uygulanan organik nano Zn ile artış göstermiştir. Amniyon kese yoluyla uygulanan Fe+Zn mineralleri hariç diğer uygulamalarda oransal karaciğer ağırlığı önemli düzeyde düşük bulunmuştur. Günlük civcivlerde ölçülen karaciğer ağırlıkları üzerinde de İO organik nano mineral enjeksiyonunun önemli bir etkisine rastlanmamıştır.

Zn mineralinin hücre gelişimi ve bölünmesindeki önemli rolü (Stamoulis vd., 2007; Favier ve Hininger, 2005) aslında karaciğer gelişimine katkı sağladığı görülmektedir. Bunlara ek olarak enzimatik aktivitelerdeki rolü ile karaciğerde Zn gereksinimi karşılaştığımız sonucu açıklamaktadır. İn ovo mineral çalışmalarının bulunmamasından dolayı bu çalışma besleme çalışmaşarı ile kıyaslanmıştır.

Abd El-Hack vd. (2024) tarafından yapılan çalışmada farklı düzeylerde organik nano Zn kaynağının 7, 21 ve 38 günlük yaştaki etlik piliçlerde karaciğer ağırlığında önemli bir etki meydana getirmediğini bildirilmektedir. Mahmud vd. (2020) çalışmasında 7 ve 21 günlük yaştaki etlik piliçlerin rasyonuna eklenen ZnO nano partiküllerin karaciğer ağırlığı üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı bildirilmektedir. Mevcut çalışmada kuluçkanın 16. gününde ve günlük yaştaki civcivlerde karaciğer ağırlığı üzerinde İO organik nano minerallerin etkisi bu çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur. Farklı formlarda nano Zn (Zn sülfat, nano Zn sülfat, nano Zn metiyonin, Zn nano max) ile 42 günlük yaşa kadar 80 mg/kg rasyon ilavesi ile beslenen etlik piliçlerde 42. günde oransal karaciğer ağırlığında önemli bir etkinin meydana gelmediği bildirilmektedir (Mohammadi vd., 2015). Rasyon ile farklı düzeylerde kullanılan nano C vitamini ve nano Zn oksit mineralinin 42 günlük yaştaki etlik piliçlerde oransal karaciğer ağırlığı üzerinde önemli etki meydana getirdiği bildirilmektedir (Bahrampour vd., 2021).

İn ovo organik nano Fe, Zn ve Fe+Zn minerallerinin kuluçkanın 16. gününde embriyonun kalp ağırlığı ve oransal kalp ağırlıkları üzerindeki etkisi önemli saptanmamıştır (P>0.05). Ancak embriyonik yaşın 19. günüde ve günlük yaştaki civcivlerde İO organik nano minerallerin kalp ağırlık ve oransal kalp ağırlıkları üzerindeki etkileri önemli bulunmuştur. Embriyonik yaşın 19. gününde kalp ağırlığı Zn_2 grubunda yüksek, Fe_2 grubunda ise düşük olduğu saptanmıştır. Oransal kalp ağırlığı ise 19. günde yalnıza Zn_2 grubunda yüksek düzeyde saptanmıştır. Çıkışta incelenen kalp ağırlığında nano minerallerin etkisi önemsiz saptanmıştır, oransal kalp ağırlığı ise 19. günden farklı olarak sarı kese organik nano Fe+Zn enjeksiyonu ile artmış, sarı kese organik nano Fe enjeksiyonu kalp ağırlığında düşüş meydana getirmiştir.

Zn mineralinin kardiyovasküler sistem için oldukça önemli olduğu vurgulanmaktadır, ayrıca embriyonik dönemde kalbin gelişimi ve dolaşım sitemi için gerekli olduğu bildirilen Zn minerali eksikliğinde çeşitli kalp hastalıklarına yol açmaktadır (Özyıldırım ve Baltacı, 2023). Bu çalışma sonuçlarında Zn mineralinin kalp gelişimini olumlu yönde etkilediği görülmektedir.

Mohammadi vd. (2015) çalışmasında 42 günlük yaştaki etlik piliçler üzerinde farklı formlarda rasyon ile verilen Zn kaynaklarının oransal kalp ağırlığı üzerindeki etkisinin önemsiz olduğunu bildirmektedir. Ghane-Khoshkebijari vd. (2024), çalışmasında embriyonik yaşın 10. gününde hava boşluğuna enjekte edilen 0.02 ve 0.05 mg organik Zn mineralinin kalp ağırlığı üzerindeki etkisinin önemsiz olduğu bildirilmektedir.

Farklı düzeylerde nano Zn (45, 90, 135, 180 mg/kg) rasyon ile verilen Lohman 33 günlük yaştaki piliçlerde kalp ağırlığı bazal rasyon verilen kontrol grubu ve 90 mg Zn içeren grupta önemli düzeyde yüksek olduğu, ancak 180 mg Zn kullanılan grupta kalp ağırlığında düşüş meydana geldiği bildirilmektedir (Hidayat vd., 2021). Abdel-Rahman vd. (2022) çalışmasında ısı stresi altında etlik civcivlerde rasyonda 4 mg/kg nano demir ve metiyonin uygulamasının kalp ağırlığını artırdığı bildirilmektedir.

Nano mineral İO enjeksiyonu embriyonik yaşın 16. gününde akciğer ağırlığı etkisi önemsiz saptanmıştır. Embriyonik yaşın 19. gününde ise akciğer ağırlığını amniyon kese organik nano Fe+Zn enjeksiyonu artırmış olması akciğer gelişimini desteklemiş, ancak amniyon kese saf su enjeksiyonu ile akciğer ağırlığının düşük saptanması saf suyun gelişimi gerilettiği yönünde bilgi verebilir. Çıkışta günlük yaştaki civcivlerin amniyon

kese organik nano Zn mineral etkisiyle akciğer ağırlığının kontrole göre artış sağlaması Zn mineralinin akciğer gelişimini desteklediği yönünde bilgi verebilir.

Xu ve Mortola, (1989) hipoksik koşulların akciğer ağırlığı üzerinde etkisinin olduğunu bildirmektedir. Babacanoğlu (2018) yüksek rakım koşullarında kuluçkaya O_2 takviyesinin akciğer ağırlığını artırdığı ve böylece akciğer gelişimine katkı sağladığını bildirmektedir. Bu çalışmada embriyonik yaşın 19. gününde akciğer ağırlığındaki artışın yüksek rakım koşullarında amniyon kese aracılığıyla verilen organik nano Zn minerallerinin akciğer gelişimini desteklediği görülmüştür. Kanatlı hayvanlarda akciğer dokusu üzerinde yapılan bir çalışmada kuluçkanın 18. gününde hava kılcal damarlarının belirginleştiğini (Maina, 2003), 19. günde embriyo zarı delerek ilk defa akciğer solunumunu gerçekleştirdiği bildirilmektedir (Rahn vd., 1979).

Taşlık+proventrikulus ağırlığı 16. günde İO organik nano minerallerden etkilenmemiştir. Ancak 19. günde amniyon kese nano Fe+Zn minerallerinin etkisi ile artış, amniyon kese organik nano Zn mineral enjeksiyonu ile düşüş meydana gelmiştir. Oransal taşlık+proventrikulus ağırlıklarında da benzer şekilde amniyon kese ile uygulanan nano Fe+Zn enjeksiyonu ile artış saptanmış amniyon kese organik nano Zn enjeksiyonu ise düşük oransal taşlık + proventrikulus ağırlığı ile sonuçlanmıştır. Günlük yaştaki civcivlerde İO organik nano mineral enjeksiyonunun taşlık+proventrikulus ağırlığı ve oransal ağırlıkları üzerinde önemli bir etkiye rastlanmamıştır. Bu çalışma ile uyumlu olarak farklı düzeylerde organik nano Zn minerali rasyon uygulaması taşlık ağırlığı üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmektedir (Abd El-Hack vd., 2024). Farklı düzeylerde (10,20,30,40 ppm) ZnO nano ve oksitetrasiklin (OTC) içeren rasyonların 35 günlük etlik piliçlerde oransal proventrikulus ağırlığı üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı, ancak oransal taşlık ağırlıklarını önemli düzeyde düştüğü bildirilmektedir (Mahmoud vd., 2020). Isı stresi altındaki 28 günlük etlik piliçlerde nano Fe+metiyonin rasyon uygulaması taşlık ağırlığı üzerinde önemli bir etki meydana getirmediği bildirilmektedir (Abdel-Rahman vd., 2022).

İn ovo organik nano mineral enjeksiyonu sonrası 16. günde göğüs kası ağırlığı önemsiz bulunmuş, ancak sarı kese organik nano Fe enjeksiyonu oransal göğüs kası ağırlığı arttırmış, kontrol grubunda ise düşüş meydana gelmiştir. Embriyonik yaşın 19. gününde göğüs kası ağırlıkları üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyonunun önemli bir etkisi saptanmamıştır. Günlük yaştaki civcivlerin göğüs kası ağırlıklarında da benzer

şekilde önemli bir etkiye rastlanmamıştır. Liu vd. (2011) çalışmasında farklı formlarda (Zn amino asit, Zn proteinat, Zn sülfat) kullanılan Zn kaynaklarının 42. günde kesime alınan arbor acres erkek piliçlerinde göğüs kası oransal ağırlıkları üzerinde önemli bir etkisi olmadığı bildirilmektedir. Rasyonda organik Zn kaynağının artırıldığı (15, 30, 45, 60 ppm) bir çalışmada 42 günlük yaştaki etlik piliçlerde göğüs kası oransal ağırlığı üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı bildirilmektedir (Rossi vd., 2007). Rasyonlarına 120 ve 240 mg/ kg $ZnSO_4$ eklenen dişi ve erkek etlik civcivlerde 42 günlük büyütme sonrası göğüs kası ağırlığının 120 mg/kg düzeyinde uygulanan Zn kaynağında artış meydana geldiği bildirilmektedir (Qudsieh vd., 2018).

Kas dokularında Fe yüklenmesi oksidatif stres etkisi ile kas yıkımına sebep olduğu bildirilmektedir (Halon-Golabek vd., 2019). Ayrıca oksidatif stres koşulları altında kas yaralanmaları hücre içi demir ihtiyacında artış meydana geldiğini bildirilmektedir (Suh vd., 2022). Düşük hepsidin nedeniyle artan demirin kas kütlesinde büyümeye yardımcı olabileceği bildirilmektedir (Buratti vd., 2015).

Bursa fabricius ağırlıkları ve oransal ağırlıkları İO enjeksiyon sonrası 16. gün ve 19. günlerde önemli bir etkiye rastlanamamıştır. Günlük yaştaki civcivlerin bursa fabricius ağırlıkları üzerinde de İO organik nano mineral enjeksiyonunun önemli bir etkisine rastlanmamıştır. Mahmoud vd. (2020) çalışmasında nano ZnO ve oksitetrasiklin rasyon uygulaması 10, 20 ve 40 ppm düzeylerinde oransal bursa fabricius ağırlığını artırdığı bildirilmektedir. Rasyonda farklı formlarda 80 mg/kg düzeyinde Zn uygulamasının oransal bursa ağırlığını artırdığı bildirilmektedir (Mohammadi vd., 2015). Yine başka bir çalışmada etlik piliçlerde, rasyonda 200 mg/kg Zn takviyesinin oransal bursa fabricius ağırlığını 42. günde artırdığı bildirilmektedir (Sajadifar vd., 2013). Rasyonda farklı düzeylerde (20, 60, 80 ve 100 mg/kg) $FeSO_4$ kaynağının bursa fabricius oransal ağırlığını etkilemediği bildirilmektedir (Lin vd., 2020). Yine farklı düzeylerde (10, 20, 40, 80, 160, 320 ppm) $ZnSO_4$ $7H_2O$ formunda Zn mineralinin verildiği bir çalışmada 40 ppm düzeyinin 4 haftalık yaşta bursa ağırlığını önemli ölçüde artırdığı bildirilmektedir (Sunder vd., 2008). Fe mineralinin bağışıklık üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır, özellikle Fe eksikliği durumunda bağışıklık organlarında gelişim geriliğine yol açtığı bildirilmektedir (Cherayil, 2010). Bursa fabricius organı, kanatlı hayvanlarda erken yaşlarda belirgin olan ve B lenfosit hücrelerinin bir kaynağı olarak görev yapan önemli bir bağışıklık organıdır. Bursa fabricius ağırlığı yaş ilerledikçe artar

fakat gelişimini tamamlayan kanatlı hayvanlarda tamamen kaybolduğu bildirilmektedir (Verma vd., 2017). Zn eksikliği durumunda lenfoid organlarda gelişim geriliğinin meydana geldiği bildirilmektedir (Zalewski, 1996).

Jarosz vd. (2016) çalışmasında Fe eksikliği durumunda T hücreleri aracılığıyla sağlanan IL-2 üretiminde aksaklığın ortaya çıktığını bildirmektedir. Optimum Zn düzeyi bağışıklık için gereklidir, antikor ve hücre aracılı bağışıklık üzerindeki önemli etkileri ile bağışıklığı desteklediği bildirilmektedir. Ek olarak hücre çoğalması ve hücre yenilenmesi üzerindeki etkileri Zn düzeyinin değişimlerinden etkilendiği bildirilmektedir (Cummings ve Kovacic, 2009).

Kuluçkanın 16. günü İO sarı kese aracılığıyla verilen organik nano Fe minerali göğüs kası ağırlığını artırması embriyonik dönemde Fe mineralinin kas gelişimi olumlu yönde etkilediği görülmüştür. Kuluçkanın 19. günde amniyon keseye enjekte edilen organik nano Zn enjeksiyon uygulamasının etkisiyle karaciğer ve kalp ağırlığı ve oransal ağırlıkları artmıştır. Bu artış çıkış öncesi Zn mineralinin etkisiyle embriyonun kalbinde meydana gelen gelişimden kaynaklı olduğu (Virden vd., 2004), amniyon kese İO organik nano Zn mineralinin MT gen ekspresyonu ve karaciğer Zn metabolizmasından kaynaklı bu dokuda gelişim sağlamış olabilir sonucuna varılmıştır.

5.4 Tüm Vücut, Sarı Kese ve Kemik Bileşimi

Etlik damızlıklara ait embriyolara kuluçkanın 14.5. ve 17.5. günlerinde uygulanan nano mineral partiküllerin etkisi ile tüm vücut bileşimi değerlendirildiğinde genel olarak çıkışta günlük yaştaki civcivlerin vücut ham yağ düzeyi ve dolayısı ile kuru madde düzeyinde de artış olmuştur. Bu iki özellik arasında ki ilişkinin benzeri tüm vücut yağ düzeyi ile vücut kuru madde düzeyi arasında da gözlemlenmiş, buna göre tüm vücut yağ düzeyi azalırken tüm vücut kuru madde düzeyinde de paralel olmuştur. Bu çıkarım, kuluçkanın 14. gününde sarı keseye Zn enjekte edildiğinde günlük yaştaki civcivlerin tüm vücut kompozisyonun ait sonuçlarda daha etkili gözlenmiştir. Etlik embriyo/civciv vücudunda kuluçkanın 14. gününden itibaren çıkışa doğru vücut su içeriği ile ham kül düzeyinin benzer şekilde gerilemesi ve bunun tam tersi toplam vücut yağ içeriğinin vücut kuru madde düzeyi ile paralel şekilde artması bu özellikler açısından sonuçlandırılan çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (Babacanoğlu, 2010). Tüm vücut kuru madde

düzeyini İO organik nano Fe+Zn minerallerinin sarı kese enjeksiyonu artırmış, ancak bu artış enjeksiyon yapılmayan veya verildiği solüsyon grubu ile benzer saptanırken, sarı kese İO organik nano Zn mineraline ait partikül enjeksiyonunun tüm vücut kuru madde düzeyini geriletmesi yukarıdaki çıkarımın temel nedenini oluşturmuştur. Bu çalışma, sarı kese İO organik nano Zn mineral enjeksiyonunun tüm vücut ham yağ düzeyini düşürdüğü, embriyonun sarı kesesine saf su ile birlikte nano partikül Zn enjekte edildiğinde muhtemelen Zn'nin saf su ile etkileşiminden dolayı tüm vücut yağ düzeyi azaltmıştır. Tüm vücut yağ düzeyinin sarı kesede Zn uygulaması ile daha düşük bulunması Zn mineralinin yağ metabolizmasında düzenleyici etkisi ile ilişkili olabilir (Winiarska-Mieczan vd., 2021) sonucuna varılmıştır. Bu ilişkinin nedeni Zn'nin sarı keseye enjeksiyonunun embriyonun lipid metaolizmasından sorumlu olan tüm dokulardaki görevli enzimlerin gen ekspresyon akivitelerini aktive etmesinden (Liu vd., 2015) kaynaklı olabileceğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Kuluçka boyunca Zn düzeyinin kuluçkanın yarısına kadar değişmediği, kuluçkanın 17.5. gününden sonra Zn düzeyinin düşme eğilimi gösterdiği ve çıkışta Zn içeriğinin oldukça agresif bir düşüş sergilediği bildirilmektedir (Hopcroft vd., 2019). Bu çalışmada da Zn uygulamasının sarı kese yağ düzeyini Hopcroft vd. (2019) ifade ettiği gibi kuluçka boyunca, Zn düzeyindeki düşüş nedeniyle gerilemiş olabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla bu çalışma sonuçları incelendiğinde, sarı keseye organik form Zn enjeksiyonuna rağmen, sarı kese Zn düzeyi ve sarı kese yağ düzeyinin gerilemesinin temel nedeni sarı kesedeki düşük ham yağ düzeyinden kaynaklı kuru madde düşüktür, bu da yağ ve yağda çözünen bileşiklerinsarı keseden embriyonun doku ve organlarına geçişi ile yakından ilişkili oolduğu bildirilmektedir (Surai, 2002).

Günlük yaştaki civcivlerin vücutlarında ham kül madde düzeyi üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının etkisinin önemli bulunmasının kaynağını Zn mineralinin embriyonun sarı kesesine enjeksiyonuna dayandırılmaktadır. Sarı kese İO organik nano Zn mineral enjeksiyonu tüm vücut ham kül madde düzeyini arttırırken, sarı kese organik Fe enjeksiyonu tüm vücut ham kül madde düzeyini etkilememiştir. Farklı embriyonik keselere farklı mineral madde enjeksiyonu uygulaması karşılaştırıldığında, Zn mineralinin sarı keseye enjeksiyonu günlük yaştaki civcivlerin toplam vücut su içeriği ve buna bağı olarak ham kül düzeyini arttırırken, amniyon kesede Zn mineraline ait benzer bir etki veya bir artış ortaya çıkmamıştır. Ancak bu çalışmada Fe mineralinin

kuluçkanın farklı dönemlerinde farklı embriyonik keselere enjeksiyonu çıkışta civcivlerin tüm vücutlarında benzer vücut su ve ham kül düzeyine sahip olmasına yol açmıştır. Bu sonuç, sarı kese ham kül düzeyinin Zn'nin sarı keseye enjeksiyonu ile düşük saptanması ve tüm vücutta yüksek düzeyde ham kül madde ile sonuçlanması sarı kese Zn'nin civciv vücuduna metabolize olduğu iyi bir şekilde geçiş yaptığı gözlenmektedir.

Babacanoğlu (2010) tarafından daha önce yapılan çalışmada etlik embriyo/civciv vücudunda HK (%) miktarının, kuluçkanın 14. gününden itibaren çıkışa doğru gerilediği bildirilmektedir. Bu çalışmada ham kül (%) oranının sarı kesede düşük saptanması özellikle Fe mineralinin kuluçkanın 12. gününden sonra embriyonun sarı kese ve sarı kese zarında azalması ve çıkışa doğru embriyonun vücut Fe içeriğini artırdığını bildiren çalışma sonucu ile uyumlu bulunmuştur (Ma vd., 2025).

Sarı kese besin madde bileşimi açısından bu çalışma sonuçları; çıkışta sarı kesenin yağ içeriğinin değiştiğini, su ve mineral düzeylerinin değişmediğini ortaya koymuştur. Bu sonuçların temel nedeni nano partikül Fe'nin kuluçkanın 17.5. gününde amniyon keseye uygulanması ile çıkışta civcivin sarı kese ham yağ düzeyini düşürmesidir. Günlük yaşta etlik civcivin kalıntı sarı kese ham yağ içeriğinin tüm mineral uygulamalarına kıyasla amniyon keseye Fe enjeksiyonu ile azalması, çıkışta civcivin sarı kese veya karaciğer dokularındaki Fe metabolizmasından kaynaklanmaktadır (Bai vd., 2021). Bu çalışmada, organik nanoformda Fe+Zn partikül kombinasyonu embriyonun amniyon kesesine enjekte edildiğinde saf suyun etkisi ile bu kesenin sıvısının ortamındaki özelliklerin etkisi ile çıkışta civcivin toplam vücut ham yağ (%) düzeyi gerilemiş, ham kül düzeyi ise önemli bir şekilde artırmıştır. Bu artış amniyon keseyi oluşturan sıvının fiziko-kimyasal özelliklerine bağlı olarak amniyonun sıvısının pH, viskokozitesi, lizozom aktivitesi, besin madde içeriği (Biesek, 2023) amniyon sıvısının içeriğinden kaynaklı saf suyun bu ortamdaki iyon dengesi ve her iki minerale ait kombinasyonun bu dengeye eşlik etmesi sonucunda çıkışta civcivin toplam vücut mineral düzeyi arttırmış olabileceği düşünülmektedir.

İn ovo organik nano minerallerin farklı keselere (sarı ve amniyon) enjeksiyonları civciv toplam vücut kuru madde, su, ham yağ ve ham kül düzeylerini önemli ölçüde etkilediği saptanmıştır. Çıkışta gelişim ile beraber vücut kuru madde düzeyi artırdığı bildirilmektedir (Peebles vd., 1999). Bu çalışmada tüm vücut kuru madde düzeyi önemli

düzeyde artması yukarıdaki çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Bu çalışmada, sarı kese Fe+Zn minerallerinin çıkışta gelişimi olumlu yönde etkilediği gözlenmektedir.

Tüm vücut ham kül düzeyinin sarı keseye organik nano Zn enjeksiyonu ile artması, Zn mineralinin sarı keseye İO uygulanması günlük yaştaki civcivlerin tüm vücut bileşiminde ihtiyaç duyulan mineralleri bünyesine iyi bir şekilde aldığı düşünülmektedir.

Ancak bu çalışmada, sarı kese saf su ve organik nano Fe mineralinin etkisi ile tüm vücut mineral birikiminde gerileme olduğu saptanmıştır. Mevcut araştırmalar incelendiğinde bu konu ile ilgili sınırlı çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle literatürdeki bu eksiklik bu konu hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, Çıkışta günlük yaştaki civcivlerin kalıntı sarı kesesinde kuru madde ve su düzeyi üzerinde İO organik nano mineraller etkili olmazken, yağ ve ham kül düzeyi üzerine minerallerin etkisinin ortaya çıkması çıkış sırasında enerji metabolizmasındaki değişimlere bağlı olarak çıkışın metabolik bir süreç olması ile ilişkilidir (De Oliveira vd., 2008). Dolayısıyla, bu süreç sarı kesedeki ham yağ ve ham kül düzeyi üzerindeki değişime minerallerin metabolik aktivitesinin nedeni olabileceği düşünülmektedir.

Çıkışta günlük yaştaki civcivlerden elde edilen kalıntı sarı kese su içeriğinin değişmemesi, çıkışa doğu kalıntı sarı kese su içeriğinin %53'ten %30'a kadar kademeli düşebildiği şeklinde bildirilen çalışma sonucu (Van Der Wagt vd., 2020) ile uyumlu olmuştur. Bu değişmeyen kalıntı sarı kese kuru madde düzeyinde saptanan kalıntı sarı kese yağ ve mineral düzeyleri ise uygulanan nano minerale spesifik olarak değişim göstermiştir.

Sarı kese embriyo gelişimi sırasında embriyo için temel bir enerji kaynağıdır ve daha önemlisi sarı kesedeki yağ içeriği embriyonun hayati organlarının gelişimin başlatılmasında kullanılır (Şahan vd., 2014). Bu nedenle sarı kesede bulunan ham yağın embriyo tarafından kullanımı kuluçkanın 12. gününden sonra artarak devam etmektedir (Peebles vd., 1999). Kuluçkanın son periyoduna doğru çıkış öncesi birkaç gün yağ metabolizması embriyo için bu nedenle oldukça önemlidir ve bu sürede sarı kesede bulunan yağın neredeyse %80'i embriyo tarafından mobilize edilmektedir (Romanoff, 1960). Bu çalışmada, kalıntı sarı kesede saptanan düşük yağ düzeyi amniyon keseye enjekte edilen organik nano Fe mineralinin etkisi ile civcivin sarı kesede bulunan yağı etkin bir şekilde emilime uğrattığını ve Fe'nin etkisi ile emilime uğrayan yağı çıkışa doğru embriyonun artan enerji talebini karşılamak için kullandığını ortaya koymuştur.

Civciv kalıntı sarı kesesinde bulunan HK (toplam minerallerin düzeyi) in ovo organik nano minerallerin enjeksiyonu ile değişim göstermemiştir. Bu sonuç, çıkışta incelenen sarı kese kalıntısında, Fe ve Zn düzeyleri için de benzer şekilde elde edilmiştir. Bu sonuçların aksine, Yair ve Uni. (2011) amniyon keseye enjekte edilen mineral maddelerin (Fe ve Zn) embriyo tarafından kullanılarak kalıntı sarı kesede bulunan Zn ve Fe mineral düzeylerinde artış olduğu bildirilmesi bu çalışma sonuçları ile uyumsuz bir sonuç ortaya koymaktadır. Bu çalışmaların sonuçları embriyonik keselere İO organik Fe ve Zn minerallerine ait enjeksiyon uygulamasının etlik civcivin kalıntı sarı kesesinde bulunan toplam minerallerin düzeylerini farklı şekilde etkilediğini göstermektedir.

Sonuç olarak, ham kül (%) sarı keseden kullanımı amniyon kese organik nano Zn enjeksiyonu ile günlük yaştaki civcivlerde gerilemiştir. Bu durumun sebebi embriyonun amniyon kese aracılığıyla ilk defa oral yoldan beslenerek aldığı organik nano Zn mineralinden kaynaklı mineral maddelerinin çıkışta yeterli olduğu ve sarı keseden bu mineralleri mobilize etmediği düşünülebilir. Sarı kese mineral enjeksiyonunun etkin kullanıldığı gruplardaki civcivlerde ise sarı kese organik nano Fe ve Zn minerallerinin etkisi ile amniyon kese organik nano Fe+Zn minerallerinin çıkışta sarı kese aracılı mineral kullanımının arttığı ve sarı kesedeki mineralleri daha iyi kullandığı sonucuna varılabilir.

İn ovo organik nano mineral enjeksiyonunun günlük yaştaki etlik civcivlerin tibia kemiklerinde incelenen kuru madde, su ve ham kül düzeyleri üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır. Bu bulgu Oliveira vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada kuluçkanın 17. gününde İO organik mineral (Zn, Cu ve Mn) içeren bir çözeltinin amniyon keseye enjeksiyonunun tibia ham kül düzeyi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını bildirmesi ile uyumlu olmuştur. Ancak aynı çalışmada yüksek düzeyde uygulanan İO organik mineral enjeksiyonun kuru madde düzeyini artırdığı bildirilmektedir. Tibia kemikleride kuru madde düzeylerinde her iki çalışmada ortaya çıkan bu fark mineral madde formlarının farklı olmasına dayandırılarak: bu çalışmada $ZnSO_4$ Zn formu L-Arjinin ile kompleks bir organik Zn mineral yapı oluşumundan dolayı böyle bir etki ortaya çıkmış olabilir. Başka bir çalışmada ise $ZnSO_4$ formunda Zn mineralinin kuluçkanın 18. gününde İO enjeksiyonunun tibia ham kül düzeyini etkilememesi yönünde bildirilen sonuç (Sogunle vd., 2018) ile bu çalışma sonuçları uyumludur. Benzer şekilde, rasyona organik Zn ilavesinin farklı doz düzeyindeki değişimine rağmen tibia ham kül düzeyi üzerine

önemli bir etkisinin olmadığı yönündeki çalışma sonucu (El-Husseini vd., 2012) da bu çalışmada ile benzerlik göstermektedir.

5.5 Kemik Gelişimi

Günlük yaştaki etlik civcivlerin kemik gelişiminin saptanması amacıyla ölçülen her iki sağ ve sol tibia ve femur kemiklerin ağırlıkları ile uzunlukları üzerine İO organik nano mineral enjeksiyonun etkisinin bulunmaması, farklı embriyonik keselerde artırılan spesifik minerallerin çıkışta civcivin kemik gelişimini etkilemediğini ortaya koymuştur. Bu çalışma ile uyumlu olarak Oliveira vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada kuluçkanın 17. gününde amniyon keseye enjekte edilen Zn mineralinin günlük yaştaki civcivlerin tibia uzunlukları üzerindeki etkisini önemsiz saptaması bu sonucu teyit etmektedir. Etlik piliçlerin genel gelişimi ve iskelet gelişimi üzerinde Zn mineralinin etkisini incelemek amacıyla 25, 50 ve 100 mg/kg düzeyinde Zn glisin organik mineralinin rasyona ilavesinin kemik ağırlığı ve uzunluğu üzerinde önemli etkiler meydana getirmediği bildirilmektedir (Kwiecień vd., 2016). Yair vd. (2015) yaptıkları bir çalışmada kuluçkanın 17. günü amniyon keseye enjekte edilen organik ve inorganik minerallerin (Zn, Mn, Cu, P, K, Na) tibia ağırlığı ve uzunluğu üzerinde önemli bir etki saptanmamıştır. Benzer şekilde, başka bir çalışmada İO yöntem ile amniyon keseye enjekte edilen Zn, Mn ve Cu minerallerinin tibia ağırlığı ve uzunluğu üzerindeki önemli bir etki saptanmadığı bildirilmektedir (Şentürk, 2019). Farklı Zn formlarından oluşan (Zn, Zn oksit, Zn Bioplex) ve 100, 150, 200 mg/kg dozların kullanıldığı rasyon çalışmasında Zn mineralinin tibia ağırlığı, uzunluğu ve çapı üzerindeki etkisinin önemli olmadığı bildirilmektedir (Sahraei vd., 2012). Rasyonda inorganik mineraller yerine %16 Z, %16 Fe, %16 Cu ve %20 Ca glisin şelatlarının %25 ve %50 düzeylerinde kullanılması ile incelenen tibia ağırlık/uzunluk oranı ve çapları üzerinde önemli etkilerin saptanmadığı bildirilmektedir (Flis vd., 2019). Yukarıda incelenen çalışma sonuçlarının tamamı mineral kaynağının emik gelişimi üzerindeki etkisinin olmadığı yönündedir. Tüm bu çalışma sonuçlarına benzer şekilde mevcut çalışmada da çıkışta günlük yaştaki civcivlerin sağ femur, sol tibia ve sol femur çapları üzerinde İO organik nano mineral partiküllerin enjeksiyonunun etkisi önemli bulunmamıştır. Ancak sarı kese ve amniyon keseye uygulanan Fe mineralinin sağ tibia çapını farklı şekilde etkilemesi Fe mineralinin nano

partikül şeklinde uygulanmasının embriyonik keseye spesifik bir etki olarak sergilemiştir. Sağ tibia çapı sarı kese organik nano Fe enjeksiyonun etkisiyle artarken, Amniyon keseye organik nano Fe enjeksiyonu etkisi ile geriletmiştir. Sağ tibia çapındaki bu farklılık kemik dokusu gelişiminin Fe mineralinin embriyonun sarı kesesine enjekte edildiğinde ve organik nano partikül olarak enjekte edildiğinde kemik gelişimini tek yönlü desteklediği söylenebilir. Etlik piliçlerde kemik gelişimi üzerinde Fe mineral dengesinin önemli etkileri olduğu bildirilmektedir (Kwiatkowska vd., 2018). Ancak bu etki Fe formlarına bağlı ortaya çıkabilir. Örneğin etlik piliç rasyonlarında $FeSO_4$ formuna karşılık farklı düzeylerde uygulanan organik Fe kaynağı olan Fe-glisinat formunun etlik piliç kemik gelişiminde tibia kemiklerinin morfometrik, fiziksel ve diğer kuvvet parametreleri üzerinde olumlu etkiler meydana getirdiği bildirilmektedir (Kwiatkowska vd., 2018). Bu çalışmada sarı keseye enjekte edilen organik nano Fe partikülünün günlük yaştaki civcivlerin tibia kemiklerinin çaplarında meydana getirdiği artışın sebebi Fe mineralinin kemik gelişimi üzerindeki etkisinin kullanılan Fe formuna ve enjekte edildiği keseye bağlı olarak etkiler ortaya koymuştur.

Bu çalışma sonuçları, organik nano mineral enjeksiyonunun çıkışta günlük yaştaki civcivlerin kemik gelişimini etkilememiş, ancak yalnızca sağ tibia çapının gelişimi üzerinde organik nano Fe mineralinin sarı keseye uygulandığı grupta daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.

5.6 Sarı Kese, Kemik ve Plazma Mineral Düzeyleri

Çalışmada sarı kese İO organik nano minerallerin sarı kese ve amniyon kese enjeksiyon uygulamasında özellikle keseler karşılaştırıldığında Zn mineral düzeyindeki farklar gerçekleşmemiştir. Farklı embriyonik keselere uygulanan İO organik nano mineral enjeksiyonu günlük yaştaki civcivlerin sarı kesesindeki Fe düzeyi üzerinde önemli bir etki oluşturmuştur. Sarı keseye enjekte edilen organik nano Fe partikülünün etkisi ile sarı kese Fe düzeyindeki gerilemenin günlük yaştaki civcivin kalıntı sarı keseden Fe emilimini diğer minerallere göre çok daha etkin bir şekilde gerçekleştirdiğini, hatta bunu çıkışta plazma serumunda Fe düzeyinin önemli bir şekilde artmasının da sağlandığı gözlenmiştir. Farklı embriyonik keselere enjekte edilen organik nano Fe mineralinin etkisi ile günlük etlik civcivin plazma serumunda artan Fe mineral düzeyinin Zn ve Fe'nin

Zn kombinasyon uygulamasına kıyasla etkin bir şekilde artması Fe'nin kandaki metabolizmasını daha fazla aktive ettiğini göstermiştir. Aslında bu sonuç Fe'nin Zn mineraline göre çıkışta metabolik etkisinin daha fazla olduğunu da göstermiştir. Bu çalışma bulguları Yair ve Uni, (2011) tarafından yapılan İO enjeksiyon yöntemi ile mineral kombinasyonundan oluşan (Fe, Zn, Mn, Cu ve P) bir solüsyonun amniyon keseye enjekte edilmesinin embriyonun sarı kese mineral emilimini artırdığını bildiren çalışma ile benzerlik gösterektedir. Buradan hareketle, amniyon keseye mineral kombinasyonu enjekte edildiğinde embriyonun sarı kesenin mineral madde etkinliği artmaktadır. Ancak Fe+Zn kombinasyonunun amniyon keseye enjeksiyonu sarı kesenin ham kül düzeyini değiştirmemesi ile ilişkili olarak sarı kese Fe ve Zn düzeylerini de etkilememesi bu yorumu kısmen desteklemektedir. Ancak sarı kese Fe düzeyi incelendiğinde enjeksiyon uygulamaları arasında belirgin farklar gözlemlenmiştir. Sarı kese saf su enjeksiyon grubu kontrol ile birlikte Fe minerali yüksek düzeyde bulunmuş, amniyon kese saf su enjeksiyonu ve sarı kese İO organik nano Fe enjeksiyonu sarı kese Fe düzeyini düşürmüştür. Bunların dışındaki diğer enjeksiyon grupları benzer olmasına karşın enjeksiyon yapılmayan gruptan elde edilen civcivlerin sarı kesesinde daha düşük sarı kese Fe düzeyi saptanmıştır. Dolayısıyla mevcut çalışma sarı keseye İO organik nano Fe mineral enjeksiyonunun çıkışta civcivin sarı kesesindeki Fe düzeyini agresif bir şekilde azalttığı gözlenmiştir. Bu sonuç embriyo gelişim döneminde sarı kese Fe metabolizmasına bağlı olarak embriyonun çıkışa doğru sarı keseden Fe emiliminin ve hatta Fe ile ilişkili diğer mineral madde kullanımını embriyonun arttırmasını çıkışta kanda bu uygulamanın etkisi ile artan Fe düzeyine dayandırılarak açıklayabiliriz. Saki vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada kuluçkanın 10. gününde sarı keseye uygulanan farklı formlarda Fe enjeksiyonun değişen dozlarının plazma serum Fe düzeyini artırdığı bildirilmektedir. Organik nano mineral enjeksiyon uygulama grupları bu çalışma ile uyumlu olarak plazma Fe düzeyinde artışa neden olmuş ancak bu artışın daha belirgin olduğu amniyon kese saf su enjeksiyon uygulaması sarı kese mineral düzeylerinde de düşüşe neden olmuştur. Amniyon keseye enjekte edilen saf su Fe mineralinin embriyo tarafından tüketildiğini ve kana iyi bir şekilde geçmesinde katkı sağladığı görülmüştür.

Plazma serum Zn düzeyi üzerinde İO organik nano mineral enjeksiyonlarının önemli bir etkisine rastlanmamıştır. Bu çalışmadan farklı olarak Khalil vd. (2023) tarafından yapılan çalışmada farklı düzeylerde Zn metiyonin İO enjeksiyon uygulaması

incelenen plazma Zn düzeyi her iki uygulama grubunda yüksek bulunduğu bildirilmektedir. Sonuç olarak, Mineral enjeksiyonlarının plazma Zn düzeyi üzerindeki farklı sonuçları bu çalışmada kullanılan mineral formu ve düzeyinin farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Günlük yaştaki civcivlerin tibia kemiklerinde incelenen Ca ve P mineral düzeyleri üzerinde İO organik nano minerallerin önemli bir etkisinin bulunmaması farklı embriyonik keselere uygulanan organik nano Fe ve Zn minerallerinin kuluçka boyunca kemik mineralizasyonu üzerinde etkili olmadığını ortaya koymuştur. Bu çalışma sonuçları benzer olarak $ZnSO_4$ formunda amniyon keseye 18. günde enjekte edilen Zn mineral uygulamasının sonuçları aynı şekilde tibia Ca ve P düzeylerinde Zn mineralinin önemli bir etkisi olmadığını bildirmektedir (Sogunle vd., 2018).

5.7 Karaciğer Glikojen Düzeyi

Günlük yaştaki çıkış yapan etlik civcivlerin karaciğer glikojen düzeyi üzerine kuluçkada her iki embriyonik keseye enjekte edilen in ovo organik nano minerallerin etkisinin önemli bulunması embriyonik keselere mineral enjeksiyonunun çıkışa doğru embriyonun enerji metabolizmasını etkilediğini ortaya koymaktadır. Etlik damızlıklara ait embriyoların amniyon kesesine enjekte edilen çok sayıda farklı besin maddelerinin enjekte edilme nedenlerinin çıkışa doğru, çıkışta ve çıkış sonrası 1 haftalık yaş süresince enerji gereksinimini karşılanması hedeflenmektedir (Uni vd., 2005; Foye vd., 2006; Peebles, 2018). Örneğin, Foye vd. (2006) yumurta akı proteinleri, β-hydroxy-β-methylbutyrate, dekstrin ve maltoz gibi karbonhidratların enjeksiyonlarının amniyon kese enjeksiyonu ile embriyonun çıkış için ihtiyaç duyduğu enerjinin karşılanabilmesi adına gerekli glikojen rezervlerini artırmak üzere karbonhidratlara kıyasla yumurta akı proteinleri ve β-hydroxy-β-methylbutyrate doku glikojen rezervleri üzerine önemli artışlar meydana getirdiklerini bildirmişlerdir (Foye vd., 2006).

Bu çalışmaya benzer olarak mevcut çalışma sonuçları İO organik nano Fe ve Zn kaynağının sarı kese ya da amniyon kese enjekte edilmesi, karaciğer glikojen miktarını artırmıştır. İO organik nano Zn mineralinin her iki kesede yüksek karaciğer glikojen düzeyine neden olmuştur. Bu durum Zn mineralinin çıkış için gerekli olan glikojen düzeyine katkı sağladığı görülmektedir. Glikojenin ilk olarak 6-8 günlük embriyonun

karaciğerinde saptandığı ve kuluçkanın 18. gününe kadar glikojenin sürekli bir sentez halinde olduğu bildirilmektedir (Lee, 1951; O'connor, 1953). Embriyo gelişim döneminin tamamlanmasının ardından sağlıklı bir çıkış enerjisi için gerekli olan glikoz ilgili glikojen kaynaklarından yüksek miktarda karşılanmaktadır (John vd., 1987). Demir mineralinin glikoz homeostazı üzerinde önemli etkilerinin bulunduğu ve eksikliğinde glikoz dengesinin bozulabildiği bildirilmektedir, ayrıca insülin, karaciğer hepatosit hücrelere Fe alımı ile serum Fe düzeyinin hızla düşmesine neden olmaktadır (Doğantekin vd., 2023). Hipoksi koşullarında embriyonun çıkış sonrası metabolizma hızının düşük olduğu bildirilmektedir (Bjonnes vd., 1987), bu da O_2 taşımada görevli olan Fe mineralinin önemini ortaya koymaktadır. Bu çalışmada Fe organik nanoformda İO enjeksiyonunun embriyo metabolizmasında iyileşme sağlayarak çıkış için gerekli olan glikojenin karaciğerde artması ile ilişkilendirilebilir. Aynı zamanda Zn minerali ile birlikte Fe mineralinin glikojen üzerindeki etkisi bu her iki mineralin glikojen sentezindeki önemli görevini ortaya koymaktadır. Alkaladi (2013) kanatlı hayvanlarda Zn eksikliği nedeniyle karaciğerde glikojen düşüklüğü ve insülin direncinin bozulması ile kanda glikoz düzeylerinde artış meydana geldiğini bildirmektedir.

Günlük yaştaki civcivlerin karaciğerinde glikojen düzeyi cinsiyete göre farklılık göstermiştir. Zn grubundaki erkek civcivler diğer tüm gruplarda bulunan erkek ve dişi civcivlerden daha yüksek karaciğer glikojen düzeyine sahip olmuştur. Erkek civcivlerin plazma Zn düzeyi dişi civcivlerden daha yüksek olması karaciğer glikojen düzeyindeki artışın nedeni olabilir (Vallee ve Falchuk, 1993). Karaciğer Zn alımındaki artış amino asitlerin, hormonların, Fe minerali ve diğer metal iyonlarının alımıyla aynı zamanda olduğu bildirilmektedir (Valle ve Falchuk, 1993). Kuluçkanın orta safhasından itibaren glikojen sentezi ve yıkımında görevli en önemli aktif organ olan karaciğer ve sarı kese dokusunun daha yüksek düzeyde glikojen içermesi (Dayan vd., 2023), bu çalışmada Zn grubu embriyolarının çıkışta enerji ihtiyacı için sarı kese glikojen yıkımından faydalandıkları gösterilebilir. Buna bağlı olarak, nano Zn'nin kuluçkanın 14.5. gününde sarı keseye uygulanmasının çıkışta erkek civcivlerin sarı kesedeki biyo-aktif maddelerden daha fazla yararlandığını (Wang vd., 2020), ancak karaciğer glikojen metabolizmasını etkin bir şekilde çalıştıramadığını, buna karşılık nano Fe mineralinin çıkışta karaciğer glikojen metabolizmasını aktive ettiği ve çıkış süresince enerji gerektiren tüm süreçlerde Fe ve kombinasyonunun karaciğer glikojen yıkımında daha etkili olduğunu bu çalışma

sonuçları ortaya koymuştur. Bunun nedeni, karaciğerde Fe metabolizmasının karaciğer enzimleri ve gen ifadeleri üzerindeki etkisi olabilir (Sun vd., 2018; Dayan vd., 2023). Glikojen ilk olarak 6-8 günlük embriyonun karaciğerinde saptandığı ve kuluçkanın 18. gününe kadar glikojenin sürekli bir sentez halinde olduğu bildirilmektedir (Lee, 1951; O'Connor, 1953). Embriyo gelişim döneminin tamamlanmasının ardından sağlıklı bir çıkış enerjisi için gerekli olan glikoz dokulardaki glikojen kaynaklarından yüksek miktarda karşılanmaktadır (John vd., 1987).

Organik Fe ve Zn ve Fe+Zn minerallerin etkisi ile dişi civcivlerin erkek civcivlere göre karaciğer glikojeninden daha etkin yararlandığı gözlenmiştir. Fe, Zn ve Fe+Zn uygulamalarına maruz kalan dişilerin benzer karaciğer glikojen düzeyine sahip olması açıklayabilir.

Bu çalışma sonuçları, çıkışta günlük yaştaki civcivlerin karaciğer glikojen düzeyinin organik nano mineral enjeksiyon uygulaması ile arttığını göstermiştir, bu artışın özellikle nano Zn ve Zn ile Fe kombinasyonunda cinsiyete bağlı olarak gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Dişi civcivlerin çıkış için gerekli enerji ihtiyacını karşılamada karaciğer glikojenini daha etkin kullandığı, erkek civcivlerin ise sarı kese İO nano elementlerin enjeksiyonlarının daha etkin kullandığı saptanmıştır.

5.8 MT ve TFRC Gen Ekspresyonu

Dokularda Zn artışına bağlı olarak MT mRNA gen ekspresyon düzeyi artmaktadır. Bu çalışmada MT mRNA gen ekspresyon düzeyi üzerinde organik nano Zn mineralinin amniyon kese enjeksiyonunun daha etkili olduğu saptanmıştır. Kombine minerallerin sarı kese organik nano Fe+Zn enjeksiyonunun sarı kese organik nano Zn enjeksiyonundan daha etkili olduğu görülmüştür. Bu durumun Fe minerali ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ancak diğer amniyon kese organik nano Fe+Zn minerallerinin MT mRNA gen ekspresyon düzeyi üzerindeki etkisi control ve S_1 gruplarına kıyasla yüksek saptanmış olsa da diğer deney gruplarından düşük bulunmutur.

Etlik piliçlere intravenöz olarak enjekte edilen farklı form ve düzeylerdeki Zn mineralinin pankreas dokusunda MT geninin mRNA gen ekspresyon düzeyini artırdığı bildirilen sonuçlr ile (Shen vd., 2013) uyum gösterdiği saptanmıştır.

Günlük yaştaki civcivlerin karaciğer dokusunda MT geninin mRNA gen ekspresyon düzeyi üzerine İO organik nano minerallerin ve bu minerallere ait kombinasyonların enjeksiyonunun etkisi önemli bulunmuştur (P=0.0001). Metallothionein mRNA gen ekspresyon düzeyi karaciğer dokusunda kuluçkanın 17.5. gününde embriyonun amniyon kesesine enjeksiyon yapılan Zn grubunda oldukça yüksek ekspresyona sahip olması embriyonun çinko mineralini etkin bir şekilde sarı kesedeki enjeksiyonuna göre kullandığına işaret etmektedir.

Sarı kese Zn enjeksiyonu MT mRNA gen ekspresyon düzeyini sarı kese Fe+Zn enjeksiyon grubu kadar artırmamış, ancak kontrol grubu ve sarı kese saf su grubundan oldukça yüksek düzeyde artırması, kuluçkadan önce yumurtanın sarısında bulunan Zn mineralinin düzeyinin çıkışta günlük yaştaki civcivin karaciğerindeki MT mRNA gen ekspresyonun maksimum düzeyi üzerinde oldukça önemli bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Fleet ve McCormick, 1988). Her iki çalışmanın sonucu göstermektedir ki tüm kanatlı türlerinde MT geninin embriyo gelişimi süresince dokulardaki değişimi ve özellikle karaciğer dokusunun sarıdaki artan Zn düzeyine önemli düzeyde tepki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu çalışmada kuluçkadan önce yumurta sarısında ölçülen Zn düzeyine (74.60 ppm) kıyasla çıkışta ölçülen kalıntı sarı kese Zn düzeyinin, özellikle Zn ve Zn kombinasyon gruplarında neredeyse iki kat daha düşük olması, başlangıçtaki Zn düzeyinin çıkışta karaciğer MT gen ekspresyon düzeyini doğrulamaktadır. Bunun yanı sıra Zn formunun bu çalışmada L-Arjinin gibi bir amimo asit aracılığıyla in organik formdan organik forma indirgenmesi de özellikle Zn gruplarında hepatik MT mRNA gen ekspresyonunu yukarı yönlü düzenlemesi bu formunda etkisinden kaynaklanmış olabilir. Bu etki Sun vd. (2018); Huang vd. (2009); Suo vd. (2015) çalışmalarından elde edilen sonuçlarda gösterildiği gibi uygulamalarda kullanılan Zn formlarının yapısal farklılıklarından kaynaklanmış olabilir.

Amniyon keseye enjekte edilen organik nano Zn ve Fe+Zn partikül kombinasyon uygulamaları günlük yaştaki etlik civcivlerde MT geninin hücre içerisine Zn alımını, taşınmasını ve bağlanmasını (Vašák, 2005) embriyonun sarı kesesine enjekte edilen nano Zn partiküllerine göre daha etkin olduğu bununda minerallerin L-arjinin amino asiti ile organik formda, tamamen protein yapısında olan amniyon keseye verilmesinden kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla farklı embriyonik keselere enjekte edilen Zn ve Zn

kombinasyonun etkisinin çıkışta karaciğerde elde edilen MT mRNA gen ekspresyonu üzerindeki etkisi embriyonik keseye spesifik bir sonuç sergilemiştir.

Sarı kese aracılığıyla verilen Fe+Zn organik nano minerallerinde MT mRNA gen ekspresyon düzeyindeki artışın kaynağı Zn mineralinin Fe minerali ile etkileşimi olarak ortaya çıkmaktadır. Bu etkileşim başlangıç yumurta sarı Zn düzeyi ile bağdaştırılabilir (Fleet ve McCormick, 1988), ayrıca Zn'nin MT geni üzerindeki etkisinin Fe mineraline göre çok daha etkili olması bilinmekte (Fleet vd., 1990), ancak sarı keseye bu her iki mineralin karaciğer MT geni üzerinde ortak etki gösterdiği gözlenmektedir. Bu ortak etkinin kaynağı özellikle Zn mineralinin Fe mineralini aktive etmesinden kaynaklanmış olabilir. Bu sonucun tam tersine amniyon kesede Fe+Zn kombinasyonunun MT gen ekspresyonu üzerindeki etkisi karaciğer MT mRNA gen ekspresyonunu azaltma eğilimi şeklinde olmuştur. Kombinasyon gruplarında incelenen tüm sonuçlar ilgili genin ekspresyonu üzerindeki etkilerin keseye spesifik etkiler olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak, çıkışta günlük yaştaki civcivlerin karaciğer dokusunda MT mRNA gen ekspresyon düzeyi organik nano Zn mineral partiküllerinin etkisiyle artmış, bu artış özellikle amniyon kese yoluyla uygulanan Zn grubunda önemli bulunmuştur. MT mRNA gen ekspresyon düzeyinin yüksek bulunduğu diğer grup ise sarı kese kombinasyon grubu olmuştur. Bu çalışmada Zn organik nano minerallerin MT mRNA gen ekspresyonunu amniyon kese enjeksiyonunda artırdığı, sarı kese enjeksiyon guruplarında ise yalnızca İO organik nano Fe+Zn mineral partikül enjeksiyonunda Fe mineralinin etkisiyle artış meydana geldiği saptanmıştır. Bu çalışmada amniyon kese Zn ve sarı kese Fe+Zn İO organik nano minerallerin MT genini aktive ettiği saptanmıştır. Bu sonuçlar MT mRNA gen ekspresyon düzeyleri üzerinde organik nanoformda uygulanan mineral etkilerinin daha fazla araştırılmaya ihtiyaç duyulduğu yönündedir.

Günlük yaştaki civcivlerin karaciğer dokusunda TFRC geninin mRNA gen ekspresyon düzeyi üzerinde İO organik nano minerallerin etkisi önemli bulunmuştur (P=0.003). Bu, enjeksiyon uygulamasının hücresel Fe alımında artışa neden olduğunu göstermiştir. Fe eksikliği durumunda TFRC mRNA gen ekspresyonunun transkripsiyonel düzeyde arttığı, Fe fazlalığı durumunda ise TFRC mRNA gen ekspresyonunun baskılandığı ifade edilmiştir (Pantopoulos vd., 2012). Bu bağlamda, etlik civcivlerin karaciğer dokusunda çıkış ve sonraki dönemlerde Fe homeostazını düzenlemede TFRC geninin önemli bir rol oynadığı ve bu genin Fe alımını uyardığı bu çalışma sonuçları da

desteklemiştir. Ayrıca, TFRC geninin Fe alımını düzenlemede kritik bir rol oynadığı ve TFRC geninin oksidatif stres koşullarında hücresel savunma mekanizmalarını desteklemek için Fe alımını düzenlediği belirtilmiştir (Zhang vd., 2017).

Bu çalışmada, İO organik nano Fe mineral partikülünün sarı ve amniyon keselere enjeksiyonunun karaciğer TFRC gen ekspresyon düzeyinde artışa neden olduğu görülmüştür. Bu artış, enjeksiyon yapılmayan günlük yaştaki civcivlerin Karaciğer dokusundaki TFRC mRNA gen ekspresyon düzeyine göre oldukça önemli düzeyde artışa neden olmuştur. Ayrıca, diğer aracı solüsyon grubu olan saf su enjeksiyon uygulaması ve her iki mineralden oluşan nano partiküllerin enjeksiyon uygulamasından elde edilen günlük civcivlerin karaciğer dokularındaki TFRC gen düzeylerinde de benzer sonuç elde edilmiştir.

Embriyonun sarı kese ve amniyon kesesine Fe mineral enjeksiyonu çıkışta TFRC genini benzer şekilde artırması Fe mineralinin farklı embriyonik yaşlarda uygulanabilirliğini ortaya koymaktadır. Günlük yaştaki civciv tarafından sarı kesedeki Fe mineralinin emilimi karaciğer Fe metabolizmasını etkileyerek TFRC gen ekspresyon düzeyini artırmış olabilir. Bu sonuç Liu vd. (2024) tarafından da benzer şekilde ifade edilmişti. Aynı yazarlar embriyo gelişiminin geç dönemi boyunca emilime uğrayan sarı kesedeki ferroptosis ve Fe homeostazisi arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmada amniyon keseye enjekte ettikleri $FeSO_4$ formunun önemli etkilerini ortaya koymuşlar ve bu etkinin kaynağını çıkışa doğru kalıntı sarı kesede biriken serbest demir kaynaklı olduğu bildirilmektedirler (Liu vd., 2024). Bu serbest Fe birikimi embriyo gelişimi boyunca embriyonun Fe homeostazi ile ilişkili tüm kritik metabolik oluşumları düzenler ve Fe aracılı sarı kesedeki ferroptozisi uyarması ile özellikle sarı kesedeki lipit kaynaklı oksidatif stresi aktive eder (Liu vd., 2024). Bu nedenle kuluçka boyunca embriyo gelişimi boyunca embriyonik keseler ve dokularda bulunan spesifik mineraller çıkışta oksidatif stresi azaltmada etkili olmaktadır, çünkü çıkış başlı başına bir stres faktörüdür (Hedlund ve Jensen, 2021). Dolayısıyla, oksidatif stres koşullarında karaciğerdeki TFRC gen ekspresyon düzeyinde artışın meydana gelmesi oksidatif stresin hücresel Fe alımında etkili olduğunu göstermektedir (Adam vd., 2024). Çünkü, hücresel Fe alımından sorumlu olan transferin reseptörü 1'i kodlayan TFRC geni hücrede oksidatif fosforilasyon sürecinde görev alan bir gendir (Macario vd., 2023). Bu çalışma sonuçlarında da Çinko mineralinin nano partikül şeklinde organik formda enjeksiyonu ile Fe mineralinin civciv

karaciğer dokusunda TFRC genini her iki keseye muamelesi sonucunda benzer şekilde karaciğer TFRC gen ekspresyonunun artırması, Gerçekte, Zn mineralinin çıkışta ROS temizleyicisi olarak görev yaptığı ve oksidatif hasarı önlemesi ile ilişkilendirilebilir (Şahin vd., 2009).

Oksidatif stres koşullarında rasyona Zn ilavesinin TFRC gen ekspresyon düzeyini önemli ölçüde düşürdüğü bildirmektedir (Adam vd., 2024). Bu sonuç bu çalışma sonucu ile uyumlu olmamakla birlikte bunun nedeni uygulama farklılığına ve anneye verilmesine bağlı olabilir.

Bu Çalışma sonuçları ile uyumlu olarak her iki keseye İO organik Fe+Zn kombinasyonunun enjeksiyon uygulaması TFRC gen ekspresyon düzeyini Fe gruplarına kıyasla önemli düzeyde geriletmiştir. Bu gerileme Zn ve Fe mineralleri arasındaki antagonizma ilişkisinden kaynaklanmış olabilir. Hatta Zn mineralinin etkilerini ortaya çıkarmış olabilir. Günlük yaştaki civcivin çıkış sürecinde çıkışın oluşturduğu oksidatif stres etkisi ile ROS (reaktif oksijen türleri) oluşumuna neden olarak oksidatif hasarı Fe ile birlikte gerilettiği bu çalışma sonuçlarına dayandırılarak Han vd., (2022) gibi ifade edilebilir. Kombinasyon gruplarında TFRC gen ekspresyonunun Fe grupları kadar yüksek düzeyde olmamasının sebebi Zn mineralinin ROS oluşumundaki görevi olabilir.

Embriyonun sarı kese ve amniyon kesesine organik formda nano Fe partikül enjeksiyonunun çıkışta karaciğer TFRC gen ekspresyonu oldukça önemli düzeyde arttırmasının nedeni her iki embriyonik yaşta Fe'nin TFRC gen ekspresyonunu aktive ettiğini ortaya koymuştur. Embriyonun gelişimi gibi Fe ihtiyacının yüksek olduğu dönemlerde Fe ile ilişkili genlerin ekspresyonlarının bu nedene bağlı olarak arttığı bildirilmiştir (Leong vd., 2012). Karaciğerde Fe metabolizmasını düzenleyen TFRC gen ekspresyonunu embriyonun amniyon ve sarı keselerine enjekte edilen Fe'nin arttırdığı ve bu artışın çıkışta karaciğerde Fe metabolizmasında görev alan proteinlerin kodlanmasını da (Richardson, 2005) arttırdığı düşünülmektedir. Dolayısıyla, nano Fe enjeksiyonuna bağlı olarak embriyonik keselerde arttırılan Fe minerali karaciğer dokusunda TFRC gen ekspresyonunu dinamik bir şekilde düzenlemiş ve bu durum karaciğerde hücresel düzeyde Fe homeostazını TFRC genini aktive ettiğini ortaya çıkarmıştır (Galy vd., 2024). Bu çalışmada, sarı keseye enjekte edilen Fe etkisi ile TFRC gen ekspresyonundaki değişim bu keseden aktive edilen karaciğer Fe metabolizmasının farkını ortaya koymuştur. Farklı Fe kaynaklarının kuluçkanın 15. gününde sarı keseye enjeksiyonunun

TFRC geninin mRNA gen ekspresyonunu aşağı yönlü azalttığı bildirilmektedir (Liu vd., 2024). Ayrıca, TFRC geninin alt türevi olan TfR1 mRNA gen ekspresyonunun hipoksik koşullarda artış gösterdiği, aşırı Fe yüklenmesinde ise aşağı yönlü azalma gösterdiği bildirilmektedir (Lambert, 2012). Ancak bu çalışmada tüm uygulamalara kıyasla embriyonun sarı kesesine enjekte edilen organik nano Fe partikülünün yapılan çalışma sonuçlarının aksine çıkışta karaciğer TFRC gen ekspresyonunu önemli düzeyde arttırdığı görülmektedir. Etlik embriyoların keselerine enjeksiyonu yapılan nano form Fe mineralinin kuluçkadan çıkış yapan günlük yaştaki etlik civcivlerin metabolizmasından sorumlu doku olan karaciğerde TFRC geninin mRNA ekspresyonunu belirgin şekilde arttırdığı, bu genin ekspresyonunda organik nano Fe+Zn kombinasyonunun ise organik nano Fe partikül enjeksiyonuna göre daha düşük bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Farklı embriyonik keselere enjekte edilen Fe+Zn kombinasyonu aynı keselere enjekte edilen Fe'nin aksine karaciğer TFRC gen ekspresyon düzeyinin daha düşük olmasına yol açmıştır. Bu düşüklüğün nedeni, Zn'nin Fe'nin düzenleyici etkisini baskılayabilmesinden kaynaklı olabilir. Dolayısıyla, organik nano Fe'nin karaciğer TFRC gen ekspresyonunu önemli ölçüde artırdığı, ancak Zn'nin bu artışı baskıladığı (Adam vd., 2024) bu çalışma sonuçları ile ortaya çıkmaktadır.

Sonuç olarak, kuluçkanın ikinci periyodundan sonra farklı embriyonik yaşlarda organik nano Fe'nin etkisinin çıkışta etlik civcivin karaciğerinde TFRC gen ekspresyonunu aktive ettiği, Fe+Zn kombinasyonunun TFRC gen ekspresyon seviyesini Zn minerali etkisiyle Fe'nin TFRC üzerindeki düzenleyici etkisini baskılamasından kaynaklı Fe'ye göre gerilettiği bu çalışmada sonuçlanmıştır. Ayrıca, bu sonuçlar Fe ve Zn elementlerinin birlikte kullanımının TFRC gen ekspresyon düzeyi üzerindeki etkilerinin daha ayrıntılı olarak araştırılmasını ve gen regülasyonu mekanizmalarındaki rollerinin daha kapsamlı bir şekilde ele alınmasını önermektedir.

6. SONUÇ

Kuluçkanın 14.5. gününde organik nano Fe mineral partikülünün embriyonun sarı kesesine in ovo enjeksiyonu 16 günlük yaştaki embriyonun göğüs kas ağırlığını, çıkışta civcivin sağ tibia çapını, serum Fe düzeyini, karaciğer TFRC mRNA gen ekspresyonunu artırmış, kalıntı sarı kese Fe mineral düzeyini düşürmüştür. Kuluçkanın 17.5. gününde amniyon keseye enjekte edilen organik nano Fe mineral enjeksiyonun etkisi ile çıkışta etlik civcivin kalıntı sarı kese ham yağ düzeyi gerilemiş, serum Fe düzeyi ve karaciğer dokusu TFRC mRNA gen ekspresyonu artmıştır.

Kuluçkanın 14.5. gününde organik nano Zn mineral partikülünün sarı keseye in ovo enjeksiyonu günlük yaştaki civcivlerin tüm vücut kuru madde düzeyini geriletmiş, su düzeyini ve ham kül düzeyini artırmış, bununla birlikte karaciğer glikojen düzeyini artırmış, bu artış cinsiyetin önemli etkisi ile dişi civcivlere göre erkek civcivlerde daha fazla olmuştur. Kuluçkanın 17.5. gününde amniyon keseye enjekte edilen organik nano Zn mineral enjeksiyonu kuluçkanın 19. gününde embriyonun gerçek ve oransal karaciğer ağırlığı ile kalp ağırlığını ve çıkışta günlük yaştaki civcivlerin akciğer ağırlığını artırmıştır. Ayrıca, bu uygulama karaciğer glikojen düzeyini ve karaciğer MT mRNA gen ekspresyon düzeylerini artırmıştır.

Embriyonun amniyon kesesine enjekte edilen organik nano Fe+Zn kombine minerallerinin etkisi ile günlük yaştaki civcivlerde çıkışta karaciğer glikojen düzeyinde artış saptanmıştır.

Sonuç olarak organik nano mineral partiküller çıkışta civcivin kloak sıcaklığını etkilememiştir. Organik nano Zn partikülün sarı keseye enjeksiyonunun tüm vücut HK ve erkek civcivler diğer tüm gruplarda bulunan erkek ve dişi civcivlerden daha yüksek karaciğer glikojen düzeyine sahip olmuştur. Amniyon keseye enjeksiyonunun ise günlük civcivlerin metabolizmasından sorumlu organ ağırlıklarına bağlı olarak incelenen metabolik özellikleri artırdığını göstermiştir. Organik nano Zn partikülün sarı keseye enjeksiyonunun kalıntı sarı kese ve serum Fe düzeyindeki artışın tibia kemik çapını artırdığı, amniyon keseye Fe enjeksiyonunun lipid metabolizmasını arttırarak egünlük yaştaki etlik civcivin metabolizmasını artırdığını ortaya koymuştur. Organik nano Fe ve Zn mineralleri farklı embriyonik keselere uygulanmasına kıyasla Fe ve Zn kombinasyonunun çıkışta etlik civcivin gelişimi ve metabolizmasından sorumlu

özellikleri etkilemediğini, bu nedenle minerallerin spesifik olarak embriyonik metabolizma üzerinde daha etkili oldukları bu çalışma ile ortaya çıkmıştır.

KAYNAKLAR

Abd El-Azeem, N. M., Abdel Rahman, S. M. (2022). Impact of in-ovo injectıon with different iron forms on hatchability traıts and post-hatching growth performance of sudany ducklings. *Egyptian Poultry Science Journal,* 42(3), 281-294.

Abd El-Hack, M. E., Ashour, E. A., Aljahdali, N., Zabermawi, N. M., Baset, S. A., Kamal, M., Bassiony, S. S. (2024). Does the dietary supplementation of organic nano-zinc as a growth promoter impact broiler's growth, carcass and meat quality traits, blood metabolites and cecal microbiota. *Poultry Science,* 103(5), 103-120.

Abdel-Rahman, H. G., Alian, H. A., Mahmoud, M. M. (2022). Impacts of dietary supplementation with nano-iron and methionine on growth, blood chemistry, liver biomarkers, and tissue histology of heat-stressed broiler chickens. *Tropical Animal Health and Production,* 54(2), 126-132.

Abdulqader, A. F. A., Olgun, O., Yıldız, A. Ö. (2017). In ovo besleme. *Hayvansal Üretim*, 58(2), 58-65.

Abdulqader, A. F., Olgun, O. (2018). Kuluçkalık bıldırcın yumurtalarına çinko-glisin enjeksiyonunun civciv performansına ve bazı dokularda mineral birikimine etkisi. *Journal of Poultry Research*, 15(2), 28-33.

Adam, S. Y., Muniyappan, M., Huang, H., Ennab, W., Liu, H. Y., Ahmed, A. A., Cai, D. (2024). Dietary organic zinc supplementation modifies the oxidative genes via rory and epigenetic regulations in the ileum of broiler chickens exposed to high-temperature stress. *Antioxidants*, 13(9), 10-79.

Adeyeye, E. I. (2009). Comparative study on the characteristics of egg shells of some bird species. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 23(2), 159-166.

Ahmed, I., Rajput, N., Laghari, I. H., Kaleri, R. R., Shamas, S., Ahmed, Z., Mukhtar, N. (2023). Exploring the confluence of in-ovo mineral supplementation and hatching attributes in broiler chick progeny: A symphony of nutritional enrichment and broiler chicks development: In-ovo mineral supplementation and hatching. *Futuristic Biotechnology*, 3(2), 33-40.

Aisen, P. (2024). Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *In Iron Transport and Storage* (pp. 281-295). CRC Press.

Alkaladi, A. (2013). Effect of zinc deficiency and supplementation on insulin signaling in chickens. *Advances in Environmental Biology*, *7*(1), 104-108.

Al-Obaidi, F. A. (2012). Identification of inorganic elements in egg shell of some wild birds in baghdad. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*, 36(0E), 153-157.

Altan, Ö., (2015). ***Yumurta*** (pp. 29-46). Ege Üniversitesi Basımevi: İzmir, Türkiye.

Anderson, G. J., Frazer, D. M. (2005). Hepatic iron metabolism. *In Seminars in Liver Disease* (Vol. 25, No. 04, pp. 420-432). Copyright© 2005 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.

Andrews, N. C. (2000). Iron metabolism: Iron deficiency and iron overload. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 1(1), 75-98.

Angel, R. (2007). Metabolic disorders: Limitations to growth of and mineral deposition into the broiler skeleton after hatch and potential implications for leg problems. *Journal of Applied Poultry Research*, 16(1), 138-149.

A.O.A.C. (1990). ***Official methods of analysis.*** (2. ed., Vol. 1, pp. 387-388). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

Aoki, S., Kimura, E. (2004). Zinc nucleic acid interaction. *Chemical Reviews*, 104(2), 769-788.

Ateş, M. (2018). Nanoparçacıkların ölçme ve inceleme teknikleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 11(1), 63-69.

Babacanoğlu, E. (2018). Effects of antioxidants via in ovo injection on chick development and developmental stability of bilateral morphological traits induced maternal hypoxia in daily hatched quail chicks. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 5(3), 285-290.

Babacanoğlu, E. (2018). Responses of developmental and physiological traits to manipulated incubation conditions in broiler embryos at hypoxic high altitude. *Archives Animal Breeding*, 61(3), 337-349.

Babacanoğlu, E., Güler, H. C. (2018). High temperature and oxygen supplementation can mitigate the effects of hypoxia on developmental stability of bilateral traits during incubation of broiler breeder eggs. *Animal*, 12(8), 1584-1593.

Babacanoğlu, E., Yalçin, S. U. Z. A. N. (2014). Hormone-mediated maternal stress affects embryonic development during incubation without adverse effect on chick weight and body composition. *British Poultry Science*, 55(2), 186-193.

Babacanoğlu, E., (2010). *Etlik damızlık dişilere kortikosteron verilerek oluşturulan maternal stresin yumurta kortikosteron düzeyine, embriyo ve civcivlerde gelişme ve fizyolojik parametreler üzerine etkileri,* Doktora Tezi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye.

Bahrampour, K., Ziaei, N., Esmaeilipour, O. A. (2021). Feeding nano particles of vitamin C and zinc oxide: Effect on growth performance, immune response, intestinal morphology and blood constituents in heat stressed broiler chickens. *Livestock Science*, 253, 104-120.

Bai, S., Luo, W., Liu, H., Zhang, K., Wang, J., Ding, X., Su, Z. (2021). Effects of high dietary iron on the lipid metabolism in the liver and adipose tissue of male broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 282, 115-131.

Bai, S., Peng, J., Zhang, K., Ding, X., Wang, J., Zeng, Q., Su, Z. (2020). Effects of dietary iron on manganese utilization in broilers fed with corn-soybean meal diet. *Biological Trace Element Research*, 194, 514-524.

Bakyaraj, S., Bhanja, S. K., Majumdar, S., Dash, B. (2012). Modulation of post-hatch growth and immunity through in ovo supplemented nutrients in broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(2), 313-320.

Baltaci, A. K., Yuce, K., Mogulkoc, R. (2018). Zinc metabolism and metallothioneins. *Biological Trace Element Research*, 183, 22-31.

Bao, Y. M., Choct, M. (2009). Trace mineral nutrition for broiler chickens and prospects of application of organically complexed trace minerals: a review. *Animal Production Science*, 49(4), 269-282.

Bao, Y. M., Choct, M., Iji, P. A., Bruerton, K. (2007). Effect of organically complexed copper, iron, manganese, and zinc on broiler performance, mineral excretion, and accumulation in tissues. *Journal of Applied Poultry Research*, 16(3), 448-455.

Barak, P., Helmke, P. A. (1993). The chemistry of zinc. **In Zinc in Soils and Plants: Proceedings of the International Symposium on 'Zinc in Soils and Plants' held at The University of Western Australia,** Springer, Netherlands.

Baumgartner, S., Brown, D. J., Salevsky Jr, E., Leach Jr, R. M. (1978). Copper deficiency in the laying hen. *The Journal of Nutrition*, 108(5), 804-811.

Bennett, C., Pettikiriarachchi, A., McLean, A. R., Harding, R., Blewitt, M. E., Seillet, C., Pasricha, S. R. (2024). Serum iron and transferrin saturation variation are circadian regulated and linked to the harmonic circadian oscillations of erythropoiesis and

hepatic tfrc expression in mice. *American Journal of Hematology*, 99(11), 2075-2083.
Besharati, M., Fathi, L., Amirdahri, S., Nemati, Z., Palangi, V., Lorenzo, J. M., Centoducati, G. (2023). Reserves of calcium, copper, iron, potassium, magnesium, manganese, sodium, phosphorus, strontium and zinc in goose egg yolk during embryo development. *Animals*, 13(12), 19-25.
Bhagwat, V. G., Balamurugan, E., Rangesh, P. (2021). Cocktail of chelated minerals and phytogenic feed additives in the poultry industry: A review. *Veterinary World*, 14(2), 364-365.
Biesek, J. (2023). The physicochemical features of eggshell, thick albumen, amniotic fluid, and yolk during chicken embryogenesis. *Poultry Science*, 102(12), 103-119.
Bjønnes, P. O., Aulie, A. R. N. F. I. N. N., Høiby, M. A. R. T. I. N. (1987). Effects of hypoxia on the metabolism of embryos and chicks of domestic fowl. *The Journal of Experimental Zoology. Supplement: Published Under Auspices of the American Society of Zoologists and the Division of Comparative Physiology and Biochemistry*, 1, 209-212.
Blamberg, D. L., Blackwood, U. B., Supplee, W. C., Combs, G. F. (1960). Effect of zinc deficiency in hens on hatchability and embryonic development. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 104(2), 217-220.
Bogdan, A. R., Miyazawa, M., Hashimoto, K., Tsuji, Y. (2016). Regulators of iron homeostasis: New players in metabolism, cell death, and disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 274-286.
Bortoluzzi, C., Vieira, B. S., Lumpkins, B., Mathis, G. F., King, W. D., Graugnard, D., Applegate, T. J. (2019). Can dietary zinc diminish the impact of necrotic enteritis on growth performance of broiler chickens by modulating the intestinal immune-system and microbiota. *Poultry Science*, 98(8), 3181-3193.
Buckner, G. D., Martin, J. H., Peter, A. M. (1925). Concerning the mode of transference of calcium from the shell of the hen's egg to the embryo during incubation. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 72(2), 253-255.
Buratti, P., Gammella, E., Rybinska, I., Cairo, G., Recalcati, S. (2015). Recent advances in iron metabolism: relevance for health, exercise, and performance. *Med Sci Sports Exerc*, 47(8), 1596-1604.
Chakraborty, T., Maiti, I. B., Biswas, B. B. (1987). A single form of metallothionein is present in both heavy metal induced and neonatal chicken liver. *Journal of Biosciences*, 11, 379-390.
Chattaraj, S., Thatoi, H., Das Mohapatra, P. K. (2025). Nanomodified Biochar for Heavy Metal Removal from Wastewaters: An Overview. *Recent Advances in Bioremediation and Phytoremediation*, 353-373.
Chen, B. J., Sun, X. W., Xu, C. X., Tay, B. K. (2004). Growth and characterization of zinc oxide nano/micro-fibers by thermal chemical reactions and vapor transport deposition in air. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 21(1), 103-107.
Chen, X. Y., Wei, P. P., Xu, S. Y., Geng, Z. Y., Jiang, R. S. (2013). Rectal temperature as an indicator for heat tolerance in chickens. *Animal Science Journal*, 84(11), 737-739.
Cherayil, B. J. (2010). Iron and immunity: Immunological consequences of iron deficiency and overload. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 58, 407-415.

Chimienti, F., Seve, M., Richard, S., Mathieu, J., Favier, A. (2001). Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases, and cleavage of Sp family transcription factors. *Biochemical Pharmacology*, 62(1), 51-62.

Choi, S., Liu, X., Pan, Z. (2018). Zinc deficiency and cellular oxidative stress: prognostic implications in cardiovascular diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 39(7), 1120-1132.

Chua, AC, Graham, RM, Trinder, D., Olynyk, JK (2007). Hücresel demir metabolizmasının düzenlenmesi. *Klinik Laboratuvar Bilimlerinde Kritik İncelemeler*, 68(3), 133-147.

Conway, D., Henderson, M. A. (2022). Iron metabolism. *Anaesthesia Intensive Care Medicine*, 23(2), 123-125.

Cook, F. (1977). Nutritive value of eggs. *Egg Science and Technology*, 65(3), 92-108.

Cousins, R. J., Swerdel, M. R. (1985). Ceruloplasmin and metallothionein induction by zinc and 13-cis-retinoic acid in rats with adjuvant inflammation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 179(2), 168-172.

Cummings, J. E., Kovacic, J. P. (2009). The ubiquitous role of zinc in health and disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 19(3), 215-240.

Dağlıoglu, Y. (2018). Nanopartikül karakterizasyon yöntemleri ve ekotoksisite deneylerindeki önemi. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*, 30(1), 1-17.

Dayan, J., Melkman-Zehavi, T., Reicher, N., Braun, U., Inhuber, V., Mabjeesh, S. J., Uni, Z. (2023). Supply and demand of creatine and glycogen in broiler chicken embryos. *Frontiers in Physiology*, 14(1), 107-112.

De Oliveira, J. E., Uni, Z., Ferket, P. R. (2008). Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. *World's Poultry Science Journal*, 64(4), 488-499.

Den Hartog, L. A., Sijtsma, R. (2013, October). Challenges and opportunities in animal feed and nutrition. *In Eleventh World Conference on Animal Production*.

Doğantekin, A., Gürel, A., Gözel, N. (2023). İnsülin direncinin serum çinko ve demir düzeylerine etkisi. *Firat Universitesi Saglik Bilimleri Tip Dergisi*, 37(2), 152-156.

Ealia, S. A. M., Saravanakumar, M. P. (2017). A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. **In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, Tamil Nadu, India.

El-Gogary, M. R., El-Said, E. A. (2019). Effect of in-ovo injection with iron–methionine chelates or iron nano-particles and post hatch dietary folic acid on growth performance and physiological responses of broiler chickens. *Egyptian Poultry Science Journal*, 39(4), 753-770.

Elvehjem, C. A., Kemmerer, A. R., Hart, E. B., Halpin, J. G. (1929). The effect of the diet of the hen on the iron and copper content of the egg. *Journal of Biological Chemistry*, 85(1), 89-96.

Emerich, D. F., Thanos, C. G. (2003). Nanotechnology and medicine. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 3(4), 655-663.

Fairbanks, V. F., Beutler, E. R. N. E. S. T. (1995). Iron metabolism. Erişim tarihi: 03 Ocak 2025. Erişim adresi: https://psi-cro.com/therapeutic-areas/hematology/?utm_source=googleads&utm_medium=paid&utm_term=awareness&utm_content=hematology&utm_campaign=awareness_googleads_2025&gad_source=1&gad_campaignid=21883728884&gbraid=0AAAAAobujOuzPyhzVzFs3SCg9gupsmLbp&gclid=Cj0KCQjwzOvEBhDVARIsADHfJJSDBctt0l3oDcn5m8kf8HUrnoLIZSusFPQZ8kTgDHVrw3Omc_UFq7QaAgWqEALw_wcB

Favier, M., Hininger-Favier, I. (2005). Zinc and pregnancy. *Gynecologie, Obstetrique Fertilite*, 33(4), 253-258.
Fechheimer, N. S. (1981). Origins of heteroploidy in chicken embryos. *Poultry Science*, 60(7), 1365-1371.
Fillebeen, C., Charlebois, E., Wagner, J., Katsarou, A., Mui, J., Vali, H., Pantopoulos, K. (2019). Transferrin receptor 1 controls systemic iron homeostasis by fine-tuning hepcidin expression to hepatocellular iron load. *Blood The Journal of the American Society of Hematology*, 133(4), 344-355.
Fleet, J. C., McCormick, C. C. (1988). The ontogeny and induction by zinc of hepatic chick embryo metallothionein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 188(1), 52-60.
Fleet, J. C., Andrews, G. K., McCormick, C. C. (1990). Iron-induced metallothionein in chick liver: a rapid, route-dependent effect independent of zinc status. *The Journal of Nutrition*, 120(10), 1214-1222.
Flis, M., Gugała, D., Muszyński, S., Dobrowolski, P., Kwiecień, M., Grela, E. R., Tomaszewska, E. (2019). The influence of the partial replacing of inorganic salts of calcium, zinc, iron, and copper with amino acid complexes on bone development in male pheasants from aviary breeding. *Animals*, 9(5), 237-238.
Formigari, A., Irato, P., Santon, A. (2007). Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology*, 146(4), 443-459.
Foye, O. T., Uni, Z., Ferket, P. R. (2006). Effect of in ovo feeding egg white protein, β-hydroxy-β-methylbutyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys. *Poultry Science*, 85(7), 1185-1192.
Frey, P. A., Reed, G. H. (2012). The ubiquity of iron. *ACS Chem Biol,* 7(1), 1477–1481.
Fukai, T., Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants Redox Signaling*, 15(6), 1583-1606.
Fukai, T. (2009). Extracellular SOD and aged blood vessels. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 297(1), 10-12.
Furukawa, T., Naitoh, Y., Kohno, H., Tokunaga, R., Taketani, S. (1992). Iron deprivation decreases ribonucleotide reductase activity and DNA synthesis. *Life Sciences*, 50(26), 2059-2065.
Gabrielli, M. G., Cox, J. V., Materazzi, G., Menghi, G. (2004). Cell type-specific and developmentally regulated expression of the AE1 anion exchanger in the chicken chorioallantoic membrane. *Histochemistry and Cell Biology*, 121, 189-199.
Galy, B., Conrad, M., Muckenthaler, M. (2024). Mechanisms controlling cellular and systemic iron homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 25(2), 133-155.
Ganz, T. (2011). Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 117(17), 4425-4433.
Gao, R., Zhou, D., Qiu, X., Zhang, J., Luo, D., Yang, X., Liu, Z. (2024). Cancer therapeutic potential and prognostic value of the SLC25 mitochondrial carrier family: A review. *Cancer Control*, 23(31), 10-17.
Gao, W., Huang, L., Zhang, X., Ma, X., Wang, W., Zheng, Y., Zhu, Y. (2021). Effect of maternal marginal zinc deficiency on development, redox status, and gene expression related to oxidation and apoptosis in an avian embryo model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 6(1), 5-8.
Gelişiyor, H. (2012). Nanoteknoloji. *Ekonomik Forum,* 35(1), 34-39.

Ghane-Khoshkebijari, F., Seidavi, A., Bouyeh, M. (2024). In ovo injection of organic zinc effects on hatching rate of broiler breeder hen eggs and productivity of broilers. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 75(3), 7857-7870.

Ghosh, P., Dey, T., Chattopadhyay, A., Bandyopadhyay, D. (2021). An insight into the ameliorative effects of melatonin against chromium induced oxidative stress and DNA damage: a review. *Melatonin Research*, 4(3), 377-407.

Ghosh, A., Mitchell, D. A., Chanda, A., Ryabov, A. D., Popescu, D. L., Upham, E. C., Collins, T. J. (2008). Catalase− peroxidase activity of Iron (III)− TAML activators of hydrogen peroxide. *Journal of the American Chemical Society*, 130(45), 15116-15126.

Goel, A., Bhanja, S. K., Mehra, M., Majumdar, S., Pande, V. (2013). Effect of in ovo copper and iron feeding on post-hatch growth and differential expression of growth or immunity related genes in broiler chickens. *Indian Journal of Poultry Science*, 48(3), 279-285.

Goel, A., Bhanja, S. K., Mehra, M., Mandal, A., Pande, V. (2016). In ovo trace element supplementation enhances expression of growth genes in embryo and immune genes in post-hatch broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(8), 2737-2745.

Gour, A., Jain, N. K. (2019). Advances in green synthesis of nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 844-851.

Greenwood, N. N., Earnshaw, A. (1997). **Chemistry of the elements.** Elsevier: Leeds, UK.

Halgrain, M., Bernardet, N., Crepeau, M., Même, N., Narcy, A., Hincke, M., Réhault-Godbert, S. (2022). Eggshell decalcification and skeletal mineralization during chicken embryonic development: defining candidate genes in the chorioallantoic membrane. *Poultry Science*, 101(2), 101-106.

Halon-Golabek, M., Borkowska, A., Herman-Antosiewicz, A., Antosiewicz, J. (2019). Iron metabolism of the skeletal muscle and neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience*, 13(1), 165-166.

Han, M., Fu, X., Xin, X., Dong, Y., Miao, Z., Li, J. (2022). High dietary organic iron supplementation decreases growth performance and induces oxidative stress in broilers. *Animals*, 12(13), 1604-1605.

Hassan, S., Hassan, F. U., Rehman, M. S. U. (2020). Nano-particles of trace minerals in poultry nutrition: potential applications and future prospects. *Biological Trace Element Research*, 195, 591-612.

Hedges, D. M., Yorgason, J. T., Perez, A. W., Schilaty, N. D., Williams, B. M., Watt, R. K., Steffensen, S. C. (2020). Spontaneous formation of melanin from dopamine in the presence of iron. *Antioxidants*, 9(12), 1285-1286.

Hedlund, L., Jensen, P. (2021). Incubation and hatching conditions of laying hen chicks explain a large part of the stress effects from commercial large-scale hatcheries. *Poultry Science*, 100(1), 1-8.

Hidayat, C., Wina, E., Jayanegara, A. (2021). The effect of nano Zn fitogenik addition on broiler diet to carcass traits, relative organ weights and haematological response. **The 3rd International Conference of Animal Science and Technology,** Bogor, Indonesia.

Hill, C. H. (1989). Effect of Salmonella gallinarum infection on zinc metabolism in chicks. *Poultry Science*, *68*(2), 297-305.

Hira, F. (2012). *Yumurta Tavuklarinda İnorganik ve Organik Bakır, Çinko, Manganin Farkli Düzeylerinin Yumurta Verim ve Kalitesine Etkileri,* Yüksek Lisans tezi. Sağlık Bilileri Enstitüsü, Erzurum, Türkiye.

Hopcroft, R. L., Cowieson, A. J., Muir, W. I., Groves, P. J. (2019). Changes to mineral levels in the yolk of meat chicken embryos during incubation. *Poultry Science*, 98(3), 1511-1516.

Huang, L., Tepaamorndech, S. (2013). The SLC30 family of zinc transporters–a review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2-3), 548-560.

Huang, X., Zeng, Y., Fu, H., Zhong, L., Qi, B., Chen, D., Lee, S. S. (2025). Simultaneous Removal of Phosphorus, Chromium (VI), and Antimony (V) from Textile Dye Wastewater by Electrocoagulation. *Journal of Hazardous Materials*, 5(1), 137-140.

Huang, Y. L., Lu, L., Li, S. F., Luo, X. G., Liu, B. (2009). Relative bioavailabilities of organic zinc sources with different chelation strengths for broilers fed a conventional corn-soybean meal diet. *Journal of Animal Science*, 87(6), 2038-2046.

Iordanova, N., Dupuis, M., Rosso, K. M. (2005). Charge transport in metal oxides: A theoretical study of hematite α-Fe2O3. *The Journal of Chemical Physics*, 122(14), 10-20.

Jafari, F., Mohammadi, H., Amani, R. (2021). The effect of zinc supplementation on brain derived neurotrophic factor: A meta-analysis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 66(1), 12-18.

Jarosz, Ł., Kwiecień, M., Marek, A., Grądzki, Z., Winiarska-Mieczan, A., Kalinowski, M., Laskowska, E. (2016). Effects of feed supplementation with glycine chelate and iron sulfate on selected parameters of cell-mediated immune response in broiler chickens. *Research in Veterinary Science*, 107(1), 68-74.

John, T. M., George, J. C., Moran Jr, E. T. (1987). Pre-and post-hatch ultrastructural and metabolic changes in the hatching muscle of turkey embryos from antibiotic and glucose treated eggs. *Cytobios*, 49(198), 197-210.

Jose, N., Elangovan, A. V., Awachat, V. B., Shet, D., Ghosh, J., David, C. G. (2018). Response of in ovo administration of zinc on egg hatchability and immune response of commercial broiler chicken. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(2), 591-595.

Joshua, P. P., Valli, C., Balakrishnan, V. (2016). Effect of in ovo supplementation of nano forms of zinc, copper, and selenium on post-hatch performance of broiler chicken. *Veterinary World*, 9(3), 287-288.

Karaca, C., Alagoz, S., Alan, A. M., Keskin, B. N. A., Usakli, S., Kantarci, M., Trabulus, S. (2023). Impact of Altitude on Anemia, Erythropoietin-Stimulating Agent, and Intravenous Iron Requirement in Hemodialysis Patients. *Eastern Journal of Medicine*, 28(4), 10-15.

Karatas, Y., Gülcan, M., Zahmakiran, M. (2020). Silica supported ternary NiRuPt alloy nanoparticles: highly efficient heterogeneous catalyst for H2 generation via selective decomposition of hydrous hydrazine in alkaline solution. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(51), 27-39.

Khalil, H., El-Wediny, F. G., Abou-El-Soud, S. B., Eid, Y. (2023). Effect of ın-ovo organic zinc ınjected and high temperature during the late stage of chicken eggs ıncubation on post hatch performance. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*, 54(7), 131-138.

Khoobbakht, Z., Mohammadi, M., Mehr, M. R. A., Mohammadghasemi, F., Sohani, M. M. (2018). Comparative effects of zinc oxide, zinc oxide nanoparticle and zinc-methionine on hatchability and reproductive variables in male Japanese quail. *Animal Reproduction Science*, 192(1), 84-90.

Kiczorowska, B., Samolinska, W., Kwiecien, M., Winiarska-Mieczan, A., Rusinek-Prystupa, E., Al-Yasiry, A. R. M. (2015). Nutritional value and the content of minerals in eggs produced in large-scale, courtyard and organic systems. *Journal of Elementology*, 20(4) 23-29.

Kidd, M. T., Ferket, P. R., Qureshi, M. A. (1996). Zinc metabolism with special reference to its role in immunity. *World's Poultry Science Journal*, *52*(3), 309-324.

Kim, H. J., Kang, H. K. (2022). Effects of in ovo injection of zinc or diet supplementation of zinc on performance, serum biochemical profiles, and meat quality in broilers. *Animals*, 12(5), 630-631.

Kulandaisamy, A. J., Rayappan, J. B. B. (2018). Significance of nanoparticles and the role of amino acids in structuring them a review. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 18(8), 5222-5233.

Krężel, A., Maret, W. (2016). The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 611(1), 3-19.

Kwiecień, M., Winiarska-Mieczan, A., Milczarek, A., Tomaszewska, E., Matras, J. (2016). Effects of zinc glycine chelate on growth performance, carcass characteristics, bone quality, and mineral content in bone of broiler chicken. *Livestock Science*, 191(1), 43-50.

Lambert, L. A. (2012). Molecular evolution of the transferrin family and associated receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(3), 244-255.

Lau, C. K., Krewulak, K. D., Vogel, H. J. (2016). Bacterial ferrous iron transport: The feo system. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(2), 273-298.

Lee, W. H. (1951). The glycogen content of various tissues of the chick embryo. *Anatomical Record*, 110(1), 465-474

Lemos, M. Z., Jaerger, S., Balaba, N., Horsth, D. F., Villalba, J. C., Stefenon, F. L., Anaissi, F. J. (2024). Synthesis and characterization of iron oxides and their application as inorganic pigments in white paint. *Coloration Technology*, 140(5), 769-781.

Leong, W. I. (2012). Iron nutrition weng-ın leong and bo lönnerdal. *Iron Physiology and Pathophysiology in Humans*, 81(1), 21-33.

Li, H., Deng, J., Jia, Q., Zhu, L., Huang, L. Z. (2024). Enhanced Fe (OH) 2-driven reductive dechlorination via shortened Fe-O bonds and colloidal medium. *Water Research*, 256(1), 121-132.

Li, Z., Lei, H., Luo, M., Wang, Y., Dong, L., Ma, Y., Yu, J. (2015). DNA methylation downregulated mir-10b acts as a tumor suppressor in gastric cancer. *Gastric Cancer*, 18(1), 43-54.

Lillie, R. J., Olsen, M. W., Bird, H. R. (1951). Variation in reproductive response of hens to dietary deficiency. *Poultry Science*, 30(1), 92-97.

Lin, X., Gou, Z., Wang, Y., Li, L., Fan, Q., Ding, F., Jiang, S. (2020). Effects of dietary iron level on growth performance, immune organ indices and meat quality in chinese yellow broilers. *Animals*, 10(4), 670-671.

Liu, C., Yang, Y., Wang, M., Jiang, W., Du, Y., Hao, Z., Zhu, L. (2024). Effects of L-arginine on gut microbiota and muscle metabolism in fattening pigs based on omics analysis. *Frontiers in Microbiology*, 15(1), 54-61.

Liu, H., Song, Z., He, X., Zhang, H. (2024). Free iron accumulation and oxidative stress burden induce ferroptotic atrophy of chicken yolk sac during the late embryogenesis. *Animal Research and One Health*, 2(3), 285-299.

Liu, Z. H., Lu, L., Li, S. F., Zhang, L. Y., Xi, L., Zhang, K. Y., Luo, X. G. (2011). Effects of supplemental zinc source and level on growth performance, carcass traits, and meat quality of broilers. *Poultry Science*, 90(8), 1782-1790.

Liu, Z. H., Lu, L., Li, S. F., Zhang, L. Y., Xi, L., Zhang, K. Y., Luo, X. G. (2011). Effects of supplemental zinc source and level on growth performance, carcass traits, and meat quality of broilers. *Poultry Science*, 90(8), 1782-1790.

Liu, Z. H., Lu, L., Wang, R. L., Lei, H. L., Li, S. F., Zhang, L. Y., Luo, X. G. (2015). Effects of supplemental zinc source and level on antioxidant ability and fat metabolism-related enzymes of broilers. *Poultry Science*, 94(11), 2686-2694.

Liu, Z., Huang, X. (2023). A model based on eight iron metabolism-related genes accurately predicts acute myeloid leukemia prognosis. *Biocell*, 47(3), 34-45.

Lu, L., Dong, X., Ma, X., Zhang, L., Li, S., Luo, X., Liao, X. (2022). Metabolic utilization of intravenously injected iron from different iron sources in target tissues of broiler chickens. *Animal Nutrition*, 9(1), 74-83.

Łukasiewicz, M., Łozicki, A., Casey, N. H., Chwalibog, A., Niemiec, J., Matuszewski, A., Sawosz, E. (2020). Effect of zinc nanoparticles on embryo and chicken growth, and the content of zinc in tissues and faeces. *South African Journal of Animal Science*, 50(1), 109-119.

Lynch, S., Pfeiffer, C. M., Georgieff, M. K., Brittenham, G., Fairweather-Tait, S., Hurrell, R. F., Raiten, D. J. (2018). Biomarkers of Nutrition for Development (BOND) iron review. *The Journal of Nutrition*, 148(1), 1001-1067.

Ma, L., Cui, Z., Wei, S., Huo, J., Dong, S., Li, S. (2025). Study on yolk iron transportation in chick embryo eggs based on transcriptomics. *Poultry Science*, 104(4), 104-115.

Macario, M. D. S., Nascimento, C. S., Sousa, F. C. B., Oliveira, I. R. S., Vesco, A. P. D., Barbosa, L. T., Sousa, K. R. S. (2023). Identification of reference genes for studies of quantitative gene expression in male and female quail tissues. *Animal Biotechnology*, 34(7), 2400-2413.

Mahmoud, U. T., Abdel-Mohsein, H. S., Mahmoud, M. A., Amen, O. A., Hassan, R. I., Abd-El-Malek, A. M., Osman, M. A. (2020). Effect of zinc oxide nanoparticles on broilers' performance and health status. *Tropical Animal Health and Production*, 52(1), 2043-2054.

Maina, J. N. (2003). Developmental dynamics of the bronchial (airway) and air sac systems of the avian respiratory system from day 3 to day 26 of life: a scanning electron microscopic study of the domestic fowl, Gallus gallus variant domesticus. *Anatomy and Embryology*, 207(1), 119-134.

Marion, W. W., Nordskog, A. W., Tolman, H. S., Forsythe, R. H. (1964). Egg composition as influenced by breeding, egg size, age and season. *Poultry Science*, 43(1), 255-264.

Mas, A., Arola, L. L. (1985). Cadmium and lead toxicity effects on zinc, copper, nickel and iron distribution in the developing chick embryo. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 80(1), 185-188.

Matuszewski, A., Łukasiewicz, M., Niemiec, J., Kamaszewski, M., Jaworski, S., Domino, M., Sawosz, E. (2021). Calcium carbonate nanoparticles toxicity and effect of in ovo

inoculation on chicken embryo development, broiler performance and bone status. *Animals*, 11(4), 932-933.
McNeil, S. E. (2005). Nanotechnology for the biologist. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(3), 585-594.
Meng, Z., Liu, X., Wu, J., Zhou, W., Wang, K., Jing, Z., Zhang, X. (2019). Mechanisms of compound kushen injection for the treatment of lung cancer based on network pharmacology. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019(1), 463-472.
Millett, F., Havens, J., Yuan, Q., Yang, S., Yu, C. A., Yu, L., Durham, B. (2012). Ruthenium photoinitiation of electron transfer in the Rb. Sphaeroides cytochrome bc1 complex: Rotational dynamics of the iron-sulfur protein, diffusion of quinone between the Qo and Qi sites, and linkage between the two monomers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(1), 149-150.
Mohammadi, V., Ghazanfari, S., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Nazaran, M. H. (2015). Comparative effects of zinc-nano complexes, zinc-sulphate and zinc-methionine on performance in broiler chickens. *British Poultry Science*, 56(4), 486-493.
Mongillo, J. F. (Ed.). (2007). ***Nanotechnology 101***. Bloomsbury Publishing, Dublin, Ireland.
Mroczek-Sosnowska, N., Łukasiewicz, M., Wnuk, A., Sawosz, E., Niemiec, J., Skot, A., Chwalibog, A. (2016). In ovo administration of copper nanoparticles and copper sulfate positively influences chicken performance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 3058-3062.
Mueller, W. J., Maw, A. J. G., Buss, E. G. (1960). The influence of season and the age of layers on egg weight, shape index, albumen quality and shell thickness. *Poultry Science*, 39(4), 854-860.
Musić, S., Krehula, S., Popović, S., Skoko, Ž. (2003). Some factors influencing forced hydrolysis of FeCl3 solutions. *Materials Letters*, 57(5-6), 1096-1102.
Mwangi, S., Timmons, J., Ao, T., Paul, M., Macalintal, L., Pescatore, A., Dawson, K. A. (2017). Effect of zinc imprinting and replacing inorganic zinc with organic zinc on early performance of broiler chicks. *Poultry Science*, 96(4), 861-868.
Naber, E. C. "The effect of nutrition on the composition of eggs." *Poultry Science*, 58(3), 518-528.
National Medicine Of Library, (2025) Zinc Methionine. Erişim tarihi: 07 Mayıs 2025. Erişim adresi: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Zinc-methionine.
Nawab, A., An, L., Wu, J., Li, G., Liu, W., Zhao, Y., Xiao, M. (2019). Chicken toll-like receptors and their significance in immune response and disease resistance. *International Reviews of Immunology*, 38(6), 284-306.
Nechitailo, K. S., Sizova, E. A., Lebedev, S. V., Miroshnikov, S. A., Ryazantseva, K. V., Yausheva, E. V., Fisinin, V. I. (2025). Modern approaches to the use of ultrafine and nanoparticles as components of feed additives in poultry farming. *World's Poultry Science Journal*, 1(1), 40-41.
Nemeth, E., Ganz, T. (2021). Hepcidin-ferroportin interaction controls systemic iron homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6493-6494.
Ngo, T. (2025). Polymer nanocomposites in the oil and gas and defense industry. *In Polymers and Two-Dimensional Nanocomposites*. 4(1), 457-479.
Nisbet, A. D., Saundry, R. H., Moir, A. J., Fothergill, L. A., Fothergill, J. E. (1981). The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin. *European Journal of Biochemistry*, 115(2), 335-345.

Nisianakis, P., Giannenas, I., Gavriil, A., Kontopidis, G., Kyriazakis, I. (2009). Variation in trace element contents among chicken, turkey, duck, goose, and pigeon eggs analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Biological Trace Element Research*, 128, 62-71.

Nollet, L., Huyghebaert, G., Spring, P. (2008). Effect of different levels of dietary organic (Bioplex) trace minerals on live performance of broiler chickens by growth phases. *Journal of Applied Poultry Research*, 17(1), 109-115.

Nollet, L., Van der Klis, J. D., Lensing, M., Spring, P. (2007). The effect of replacing inorganic with organic trace minerals in broiler diets on productive performance and mineral excretion. *Journal of Applied Poultry Research*, 16(4), 592-597.

Núñez, M. T. (2010). Regulatory mechanisms of intestinal iron absorption Uncovering of a fast-response mechanism based on DMT1 and ferroportin endocytosis. *Biofactors*, 36(2), 88-97.

O'connor, R. J. (1953). *Metabolism and glycogen formation in the liver of the chicken embryo. Development,* 1(2), 105-114.

Oliveira, T. F. B., Bertechini, A. G., Bricka, R. M., Kim, E. J., Gerard, P. D., Peebles, E. D. (2015). Effects of in ovo injection of organic zinc, manganese, and copper on the hatchability and bone parameters of broiler hatchlings. *Poultry Science*, 94(10), 2488-2494.

Oteiza, P. I. (2012). Zinc and the modulation of redox homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(9), 1748-1759.

Ozyildirim, S., Baltaci, S. B. (2023). Cardiovascular diseases and zinc. *Biological Trace Element Research*, 201(4), 1615-1626.

Önalan, Ş. (2019). Expression differences of stress and immunity genes in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, walbaum 1792) with different bacterial fish diseases. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 71(1) 124-135.

Özdoğan, E., Demir, A., Seventekin, N. (2006). Nanoteknoloji ve tekstil uygulamalari. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 16(3), 160-168.

Palmiter, R. D., Huang, L. (2004). Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflügers Archiv*, 447(1), 744-751.

Pantopoulos, K. (2024). Oral iron supplementation: new formulations, old questions. *Haematologica*, 109(9), 2790-2791.

Pantopoulos, K., Porwal, S. K., Tartakoff, A., Devireddy, L. (2012). Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*, 51(29), 5705-5724.

Papanikolaou, G., Pantopoulos, K. (2005). Iron metabolism and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202(2), 199-211.

Pappas, A. C., Zoidis, E., Georgiou, C. A., Demiris, N., Surai, P. F., Fegeros, K. (2011). Influence of organic selenium supplementation on the accumulation of toxic and essential trace elements involved in the antioxidant system of chicken. *Food Additives and Contaminants*, 28(4), 446-454.

Pearson, S. A., Wachnowsky, C., Cowan, J. A. (2020). Defining the mechanism of the mitochondrial Atm1p [2Fe–2S] cluster exporter. *Metallomics*, 12(6), 902-915.

Peebles, E. D. (2018). In ovo applications in poultry: a review. *Poultry Science*, 97(7), 2322-2338.

Peebles, E. D., Li, L., Miller, S. H. E. R. M. A. N., Pansky, T. O. M. A. S., Whitmarsh, S. H. A. R. O. N., Latour, M. A., Gerard, P. D. (1999). Embryo and yolk compositional relationships in broiler hatching eggs during incubation. *Poultry Science*, 78(10), 1435-1442.

Perálvarez-Marín, A., Baranowski, E., Bierge, P., Pich, O. Q., Lebrette, H. (2021). Metal utilization in genome-reduced bacteria: Do human mycoplasmas rely on iron?. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19(1), 5752-5761.

Prasad, A. S. (2008). Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Experimental Gerontology*, 43(5), 370-377.

Qiu, J., Lu, X., Ma, L., Hou, C., He, J., Liu, B., Xu, J. (2020). Low-dose of organic trace minerals reduced fecal mineral excretion without compromising performance of laying hens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 33(4), 588-589.

Qudsieh, R. I., Smith, D. P., Brake, J. (2018). Effect of elevated dietary inorganic zinc on live performance, carcass yield, and quality of male and female broilers. *Poultry Science*, 97(11), 4122-4130.

Rahn, H., Ar, A., Paganelli, C. V. (1979). How bird eggs breathe. *Scientific American*, 240(2), 46-55.

Rajendran, D. (2013). Application of nano minerals in animal production system. *Research Journal of Biotechnology*, 8(3), 1-3.

Reddy, P. M., Reddy, V. R., Reddy, C. V., Rao, P. S. P. (1979). Egg weight, shape index and hatchability in Khaki Campbell duck eggs. *Indian Journal of Poultry Science.* 14(1), 26-31.

Richards, M. P. (1991). Mineral metabolism in the developing turkey embryo I. The effects of developmental age and shell-less culture on trace element contents of selected tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 100(4), 1009-1016.

Richards, M. P. (1997). Trace mineral metabolism in the avian embryo. *Poultry Science*, 76(1), 152-164.

Richards, M. P., Steele, N. C. (1987). Trace element metabolism in the developing avian embryo: a review. *The Journal of Experimental Zoology. Supplement: Published Under Auspices of the American Society of Zoologists and the Division of Comparative Physiology and Biochemistry*, 1, 39-51.

Richards, M., Packard, M. (1996). Mineral metabolism in avian embryos. *Poultry Biology,*1(1), 1-10.

Richardson, D. R. (2005). Molecular mechanisms of iron uptake by cells and the use of iron chelators for the treatment of cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 12(23), 2711-2729.

Rink, L., Kirchner, H. (2000). Zinc-altered immune function and cytokine production. *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1407-1411.

Robach, P., Cairo, G., Gelfi, C., Bernuzzi, F., Pilegaard, H., Vigano, A., Lundby, C. (2007). Strong iron demand during hypoxia-induced erythropoiesis is associated with down-regulation of iron-related proteins and myoglobin in human skeletal muscle. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 109(11), 4724-4731.

Romanoff, A. L. (1960). ***The avian embryo***. Structural and functional development: New York, USA.

Romanoff, A. L., Romanoff, A. J. (1949). ***The avian egg***. The Avian Egg: New York, USA.

Ronis, M. J., Chen, Y., Shankar, K., Gomez-Acevedo, H., Cleves, M. A., Badeaux, J., Badger, T. M. (2011). Formula feeding alters hepatic gene expression signature, iron and cholesterol homeostasis in the neonatal pig. *Physiological Genomics*, 43(23), 1281-1293.

Rossi, P., Rutz, F., Anciuti, M. A., Rech, J. L., Zauk, N. H. F. (2007). Influence of graded levels of organic zinc on growth performance and carcass traits of broilers. *Journal of Applied Poultry Research*, 16(2), 219-225.

Sahin, K., Sahin, N., Kucuk, O., Hayirli, A., Prasad, A. S. (2009). Role of dietary zinc in heat-stressed poultry: A review. *Poultry Science*, 88(10), 2176-2183.

Sahr, W. B., Odutayo, O. J., Sogunle, O. M., Ayo-Ajasa, O. Y., Fafiolu, A. O., Fatunmbi, F. A. (2020). Effects of in ovo injection of inorganic salts of Zn, Cu and Mn on hatching traits and post-hatch performance of broiler chickens in the tropics. *Nigerian Journal of Animal Science*, 22(1), 113-125.

SAS, P., Procedures, R. E. G. R. E. S. S. I. O. N. (2017). The center for statistical training. Erişim tarihi: 13 Şubat 2025. Erişim adresi: https://centerstat.org/?gad_source=1&gad_campaignid=22633982065&gbraid=0AAAAA_yapPelAbTHZaeYUJklP_xiDkRTP&gclid=Cj0KCQjwzOvEBhDVARIsADHfJJTkyrX81g8Y4Gc05-9H4aSf2K7x_5snRJHHYxXoDZk91-sBGuTieWEaAqFIEALw_wcB

Sahraei, M., Janmmohamdi, H., Taghizadeh, A., Cheraghi, S. (2012). Effect of different zinc sources on tibia bone morphology and ash content of broiler chickens. *Advances in Biological Research*, 6(3), 128-132.

Sajadifar, S., Shirani, M. (2013). Effect of different levels of zinc on some aspects of immune system in broiler chicks vaccinated against coccidiosis. *International Journal of Agronomy and Plant Production.* 4(12), 3192-3196.

Saki, A. A., Abbasinezhad, M., Ahmadi, A. (2014). Effect of iron nanoparticles and liquid methionine (Alimet) in ovo feeding and diet on broiler chicken performance. *Animal Science,* 3(1), 57-71.

Salem, S. S., Hammad, E. N., Mohamed, A. A., El-Dougdoug, W. (2022). A comprehensive review of nanomaterials: Types, synthesis, characterization, and applications. *Biointerface Res. Appl. Chem*, 13(1), 41-42.

Salim, H. M., Lee, H. R., Jo, C., Lee, S. K., Lee, B. D. (2012). Effect of dietary zinc proteinate supplementation on growth performance, and skin and meat quality of male and female broiler chicks. *British Poultry Science*, 53(1), 116-124.

Samaraweera, H., Zhang, W. G., Lee, E. J., Ahn, D. U. (2011). Egg yolk phosvitin and functional phosphopeptides. *Journal of Food Science*, 76(7), 143-150.

Schaafsma, A., Pakan, I., Hofstede, G. J. H., Muskiet, F. A., Van Der Veer, E., De Vries, P. J. F. (2000). Mineral, amino acid, and hormonal composition of chicken eggshell powder and the evaluation of its use in human nutrition. *Poultry Science*, 79(12), 1833-1838.

Schwartz, M., Shnayder, M., Nachshon, A., Arazi, T., Kitsberg, Y., Levi Samia, R., Stern-Ginossar, N. (2023). Molecular characterization of human cytomegalovirus infection with single-cell transcriptomics. *Nature Microbiology*, 8(3), 455-468.

Seo HyunJu, S. H., Cho YoungEun, C. Y., Kim TaeWan, K. T., Shin HongIn, S. H., Kwun InSook, K. I. (2010). Zinc may increase bone formation through stimulating cell proliferation, alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Pubmed Central*, 4(5), 356-361.

Sevieri, M. (2024). *Nanotechnological approaches for cancer diagnosis, treatment and management: implementation of Ferritin protein nanoparticles for tumor targeting. Ph.D. thesis.* Universita Degli Studi Di Milano, Milan, Italy.

Sevim, B., Olgun, O. (2021). Effect of supplementation of nano zinc in male quail diets on performance, some blood parameters, testis morphology and meat colour properties. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 58(6), 14-24.

Shen, S. F., Wang, R. L., Lu, L., Li, S. F., Liu, S. B., Xie, J. J., Luo, X. G. (2013). Effect of intravenously injected zinc on tissue zinc and metallothionein gene expression of broilers. *British Poultry Science*, 54(3), 381-390.

Shen, Y., Li, X., Dong, D., Zhang, B., Xue, Y., Shang, P. (2018). Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy. *American Journal of Cancer Research*, 8(6), 916-917.

Sidgwick, N. V. (1950). The chemical elements and their compounds. *Digital Library of India,* 2(1), 1526-1527.

Silva, B., Faustino, P. (2015). An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1852(7), 1347-1359.

Sogunle, O. M., Elangovan, A. V., David, C. G., Ghosh, J., Awachat, V. B. (2018). Response of broiler chicken to in ovo administration of inorganic salts of zinc, selenium and copper or their combination. *Slovak Journal of Animal Science*, 51(1), 8-19.

Song, X., Xiao, L., Xu, L., Jiang, Y., Fu, W., Chen, B., Yu, Y. (2025). Fe3O4@ Bi2S3 nanoparticles mediated mrı-guided precision radiosensitization for orthotopic glioblastoma via external magnetism. *ACS Applied Materials Interfaces*, 17(14), 21478-21490.

Stamoulis, I., Kouraklis, G., Theocharis, S. (2007). Zinc and the liver: An active interaction. *Digestive Diseases and Sciences*, 52(1), 1595-1612.

Star, L., Van der Klis, J. D., Rapp, C., Ward, T. L. (2012). Bioavailability of organic and inorganic zinc sources in male broilers. *Poultry Science*, 91(12), 3115-3120.

Sugino, H., Ishikawa, M., Nitoda, T., Koketsu, M., Juneja, L. R., Kim, M., Yamamoto, T. (1997). Antioxidative activity of egg yolk phospholipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3), 551-554.

Sun, X. M., Liao, X. D., Lin, L. U., Zhang, L. Y., Lin, X. I., LUO, X. G. (2018). Effect of in ovo zinc injection on the embryonic development, tissue zinc contents, antioxidation, and related gene expressions of broiler breeder eggs. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(3), 648-656.

Sunatkari, A. L., Talwatkar, S. S., Tamgadge, Y. S., Muley, G. G. (2015). Synthesis, characterization and optical properties of L-arginine stabilized gold nanocolloids. *Nanosci. Nanotechnol*, 5(2), 30-35.

Sunder, G. S., Panda, A. K., Gopinath, N. C. S., Rao, S. R., Raju, M. V. L. N., Reddy, M. R., Kumar, C. V. (2008). Effects of higher levels of zinc supplementation on performance, mineral availability, and immune competence in broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research*, 17(1), 79-86.

Suo, H., Lu, L., Zhang, L., Zhang, X., Li, H., Lu, Y., Luo, X. (2015). Relative bioavailability of zinc-methionine chelate for broilers fed a conventional corn soybean meal diet. *Biological Trace Element Research*, 165, 206-213.

Surai, P. F. (2002). Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. *Nottingham University Press.*1(1), 87-89.

Şahan, U., Ipek, A. Y. D. I. N., Sozcu, A. R. D. A. (2014). Yolk sac fatty acid composition, yolk absorption, embryo development, and chick quality during incubation in eggs from young and old broiler breeders. *Poultry Science*, 93(8), 2069-2077.

Şentürk, E. T. (2019). *Damızlık bıldırcın yumurtalarına in ovo organik çinko, manganez ve bakır enjeksiyonunun kuluçka parametreleri ve bazı doku özelliklerine etkisi.* Yüksek lisans tezi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, Türkiye.

Tako, E., Glahn, R. P. (2011). Iron status of the late term broiler (Gallus gallus) embryo and hatchling. *Int J Poul Sci*, 10(1), 42-48.

Talebi, A. R., Khorsandi, L., Moridian, M. (2013). The effect of zinc oxide nanoparticles on mouse spermatogenesis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(1), 1203-1209.

Tatlı, O., Sevim, Ö., Karaarslan, S., Kuter, E., Kaya, M., Khamseh, E. K., Uçan, U., Köksal, B.H., Cengiz, Ö., Önol, A. G. (2019). Damızlık bıldırcın rasyonlarına katılan nano çinkonun performans, yumurta özellikleri, sperm kalitesi ve kuluçka parametreleri üzerine etkisi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 9(4), 2390-2397.

Teschke, R. (2024). Hemochromatosis: ferroptosis, ROS, gut microbiome, and clinical challenges with alcohol as confounding variable. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5), 2668-2669.

Thirumoorthy, N., Kumar, K. M., Sundar, A. S., Panayappan, L., Chatterjee, M. (2007). Metallothionein: an overview. *World journal of Gastroenterology: WJG*, 13(7), 993-994.

Trziszka, T., Dobrzański, Z., Chojnacka, K., Bubel, A., Beń, H., Korczyński, M., ... Tronina, W. (2021). Assessment of macro-, micro-, trace, and ultratrace element concentration in green-legged partridge hens' eggs from a free-range system. *Agriculture*, 11(6), 473-474.

Tüylek, Z. (2019). Nanotıp alanında kullanılan sistemler. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 28(2), 119-129.

Tüylek, Z. (2021). Biyolojik sistemlerde gelecekteki nano/biyosensör ürünlerine hazırlık. *Uluslararası Biyosistem Mühendisliği Dergisi*, 2(1), 17-39.

Ulger, İ., Fidan, H. (2021). Organik, inorganik ve nano minerallerin etlik piliçlerde etkinlikleri. *Erciyes Tarım Ve Hayvan Bilimleri Dergisi*, 4(1), 20-26.

Uni, Z., Ferket, P. R. (2003). *U.S. Patent No. 6,592,878*. Washington, DC: U.S. *Patent and Trademark Office.*

Uni, Z., Ferket, P. R., Tako, E., Kedar, O. (2005). In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. *Poultry Science*, 84(5), 764-770.

Ülger, I., Mahmood, S. S. (2023). Comparison of plant extract-derived nano-zinc particles with different zinc sources and effects of different Zn sources on egg yield and quality traits. *Animal Science Journal*, 94(1), 13903-13904.

Vallee, B. L., Auld, D. S. (1990). Active-site zinc ligands and activated H2O of zinc enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(1), 220-224.

Vallee, B. L., Falchuk, K. H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews*, 73(1), 79-118.

Van Cleave, C., Crans, D. C. (2019). The first-row transition metals in the periodic table of medicine. *Inorganics*, 7(9), 111-112.

Van Der Wagt, I., de Jong, I. C., Mitchell, M. A., Molenaar, R., van Den Brand, H. (2020). A review on yolk sac utilization in poultry. *Poultry Science*, 99(4), 2162-2175.

Vašák, M. (2005). Advances in metallothionein structure and functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19(1), 13-17.

Vašák, M. ve Meloni, G. (2017). Memeli metalotiyonin-3: yeni işlevsel ve yapısal içgörüler. *Uluslararası Moleküler Bilimler Dergisi*, 18(6), 1117-1118.

Verma, V. K., Yadav, S. K., Haldar, C. (2017). Influence of environmental factors on avian immunity: an overview. *J Immun Res*, 4(1), 1028-1033.
Viarengo, A., Burlando, B., Dondero, F., Marro, A., Fabbri, R. (1999). Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers*, 4(6), 455-466.
Vieira, S. L. (2007). Chicken embryo utilization of egg micronutrients. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 9(1), 1-8.
Vieira, S. L. (2008). Chelated minerals for poultry. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 10(1), 73-79.
Virden, W. S., Yeatman, J. B., Barber, S. J., Willeford, K. O., Ward, T. L., Fakler, T. M., Kidd, M. T. (2004). Immune system and cardiac functions of progeny chicks from dams fed diets differing in zinc and manganese level and source. *Poultry Science*, 83(3), 344-351.
Vladimir, L. (2024). Discovery of element zero with quarks for Mendeleev's periodic table of chemical elements. *ResearchGate,* 1(1), 1-10.
Von Engelhardt, N. K., Groothuis, T. G. (2005). Measuring steroid hormones in avian eggs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046(1), 181-192.
Wallace, J., Trabal, A. (2024). Administration of ıntravenous ferric carboxymaltose in a patient with ıron deficiency anemia and allergy to oral ıron. *Journal of Research in Medicak Sciences*. 13(7), 2970-2979.
Wang, G., Liu, L. J., Tao, W. J., Xiao, Z. P., Pei, X., Liu, B. J., ... Ao, T. Y. (2019). Effects of replacing inorganic trace minerals with organic trace minerals on the production performance, blood profiles, and antioxidant status of broiler breeders. *Poultry Science*, 98(7), 2888-2895.
Wang, L. F., Yang, G. Y., Yang, G. Q., Zhu, H. S., Wang, Y. Y., Han, L. Q., He, C. T. (2014). Effect of zinc source on the expression of ZIPII transporter genes in guanzhong dairy goats. *Animal Feed Science and Technology*, 195(1), 129-135.
Wang, S. F., Tian, G. R., Zhang, W. Z., Jin, J. Y. (2009). Characterization of α-nitromethyl ketone as a new zinc-binding group based on structural analysis of its complex with carboxypeptidase A. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 19(17), 5009-5011.
Wang, Y., Buyse, J., Courousse, N., Tesseraud, S., Métayer-Coustard, S., Berri, C., Collin, A. (2020). Effects of sex and fasting/refeeding on hepatic AMPK signaling in chickens (Gallus gallus). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology*, 240(1), 110-117.
Waqas, M., Niaz, S., Batoo, K. M., Xu, Y. B., Noor, H., Ahmad, N., Riaz, S. (2024). Exploring the microwave assisted sol-gel synthesized multivalent doped thin films of iron oxide for detailed impedance and magnetodielectric response. *Solid State Sciences*, 149(1), 107-116.
Watts, D. L. (1990). Nutrient interrelationships: minerals, vitamins, endocrines. *Journal of Orthomolecular Medicine*, 5(1), 11-19.
Wienk, K. J. H., Marx, J. J. M., Beynen, A. C. (1999). The concept of iron bioavailability and its assessment. *European Journal of Nutrition*, 38(1), 51-75.
Willemsen, H., Everaert, N., Witters, A., De Smit, L., Debonne, M., Verschuere, F., Bruggeman, V. (2008). Critical assessment of chick quality measurements as an indicator of posthatch performance. *Poultry Science*, 87(11), 2358-2366.
Wilson, H. R. (1997). Effects of maternal nutrition on hatchability. *Poultry Science*, 76(1), 134-143.

Wilson, J. X., Lui, E. M., Del Maestro, R. F. (1992). Developmental profiles of antioxidant enzymes and trace metals in chick embryo. *Mechanisms of Ageing and Development*, 65(1), 51-64.

Winiarska-Mieczan, A., Kwiecień, M., Mieczan, T., Kwiatkowska, K., Jachimowicz, K. (2021). The effect of Cu, Zn and Fe chelates on the antioxidative status of thigh meat of broiler chickens. *Animal*, 15(10), 100-117.

Xiao, C., Kong, L., Pan, X., Zhu, Q., Song, Z., Everaert, N. (2022). High temperature-induced oxidative stress affects systemic zinc homeostasis in broilers by regulating zinc transporters and metallothionein in the liver and jejunum. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 97(5), 2114-2124.

Xu, H., Qiu, Y., Sun, A., Liu, F., He, Y., Xu, J., Liu, J. (2024). Interfacial modification of NiSe by controllable nanoscale amorphous phase Fe (OH) 3 layers to achieve efficient water-splitting performance. *International Journal of Hydrogen Energy*, 90(1), 498-507.

Xu, L., Mortola, J. P. (1989). Effects of hypoxia or hyperoxia on the lung of the chick embryo. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 67(5), 515-519.

Xu, Z., Ye, L., Yu, Y., Gong, H., Xiao, Z., Ming, L., Ou, X. (2025). A Green and efficient recycling strategy for spent lithium-ıon batteries in neutral solution environment. *Angewandte Chemie*, 137(17), 14899-14900.

Yahia, M. B., Knani, S., Hsan, L. B. H., Yahia, M. B., Nasri, H., Lamine, A. B. (2017). Statistical studies of adsorption isotherms of iron nitrate and iron chloride on a thin layer of porphyrin. *Journal of Molecular Liquids*, 248(1), 235-245.

Yair, R., Uni, Z. (2011). Content and uptake of minerals in the yolk of broiler embryos during incubation and effect of nutrient enrichment. *Poultry Science*, 90(7), 1523-1531.

Yakar Z. (2018). Nanoteknolojinin Gelişim, *Nanoteknoloji* 1(1), 31-46.

Yakut, M., Kum, M., Şendoğdular Topçu, S. ve Şendoğdular, L. (2022). ***Nanoteknolojide Karakterizasyon Teknikleri.*** İksad Yayın Evi: Ankara, Türkiye.

Yanatori, I., Richardson, D. R., Toyokuni, S., Kishi, F. (2020). The new role of poly (rC)-binding proteins as iron transport chaperones: Proteins that could couple with inter-organelle interactions to safely traffic iron. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1864(11), 685-686.

Yang, C., Li, J., Guo, Y., Gan, D., Zhang, C., Wang, R., Su, H. (2022). Role of TFRC as a novel prognostic biomarker and in immunotherapy for pancreatic carcinoma. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9(1), 756-895.

Yang, W., Chen, Y., Cheng, W. (2014). Properties of DNA-capped nanoparticles. *Handbook of Nanomaterials Properties*, 1(1), 1227-1262.

Yonar, M. E., Sağlam, N., İspir, Ü. (2010). Effect of sulfamerazine on plasma ceruloplasmin levels in rainbow trout. *Turkish Journal of Science Technology*, 5(2), 79-84.

Yuan, F. (2018). Study on kinetics of Fe (II) oxidized by air in FeSO4-H2SO4 solutions. *Minerals Engineering*, 121(1), 164-168.

Zalewski, P. D. (1996). Zinc and immunity: implications for growth, survival and function of lymphoid cells. *Journal of Nutritional Immunology*, 4(3), 39-101.

Zeidan, R. S., Han, S. M., Leeuwenburgh, C., Xiao, R. (2021). Iron homeostasis and organismal aging. *Ageing Research Reviews*, 72(1), 510-520.

Zeidan, R. S., Martenson, M., Tamargo, J. A., McLaren, C., Ezzati, A., Lin, Y., Anton, S. (2024). Iron homeostasis in older adults: balancing nutritional requirements and health risks. *The Journal of Nutrition, Health and Aging*, 28(5), 100-212.

Zhang, R., Bai, X., Shao, J., Chen, A., Wu, H., Luo, S. (2020). Effects of zero-valent iron nanoparticles and quinclorac coexposure on the growth and antioxidant system of rice (Oryza sativa L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 203(1), 11-105.

Zhang, S., Lin, L., Huang, X., Lu, Y. G., Zheng, D. L., Feng, Y. (2022). Antimicrobial properties of metal nanoparticles and their oxide materials and their applications in oral biology. *Journal of Nanomaterials*, 2022(1), 63-65.

Zhen, C., Zhang, G., Wang, S., Wang, J., Fang, Y., Shang, P. (2024). Electromagnetic fields regulate iron metabolism in living organisms: a review of effects and mechanism. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 188(1), 43-54.

Zhou, X., Ding, X., Shen, J., Yang, D., Hudson, L. G., Liu, K. J. (2019). Peroxynitrite contributes to arsenic-induced PARP-1 inhibition through ROS/RNS generation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 378(1), 114-134.

Zhou, S., Yan, J., Song, K., Ge, R. L. (2023). High-altitude hypoxia induces excessive erythrocytosis in mice via upregulation of the intestinal HIF2a/iron-metabolism pathway. *Biomedicines*, 11(11), 29-92.

ÖZ GEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Jiyan TUNÇ

Eğitim Bilgileri

Lisans

Üniversite : Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Fakülte : Ziraat Fakültesi
Bölüm : Zootekni Bölümü
Mezuniyet Yılı : 2021

Yüksek Lisans

Üniversite : Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Enstitü : Ziraat Fakültesi
Anabilim Dalı : Zootekni
Mezuniyet Yılı : 2025

Evrak Tarih ve Sayısı: 20.08.2025-32454

VAN YÜHADYEK
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

ARAŞTIRMA KESİN SONUÇ ONAY BELGESİ

VAN YUZUNCUYILUNIVERSITY (TURKEY)
ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE
RESEARCH FINAL REPORT APPROVAL CERTIFICATE

AraştırmanınAdı *Research Title*	Etlik Damızlıklarda Yumurtalara Demir ve Çinko Nano Partiküllerinin *in ovo* Enjeksiyonunun Embriyonun Metabolizmasına Etkisi The Effect Of *in ovo* Injection Nanopartıculus Iron and Zınc Into Eggs Of Broıler Breeders On Embrıyo Metabolısm	
Araştırıcı(lar) *Investigator(s)*	**Yürütücü** / *Chief investigator :*	Doç. Dr. Elif BABACANOĞLU ÇAKIR
	YardımcıAraştırıcı(lar) / *Co-investigator(s):*	Jiyan TUNÇ
Araştırmanın BaşlamaTarihi / *Research Starting Date:15.08.2023*		
Araştırmanın BitişTarihi / *Research Completion Date:15.06.2025*		
ProjeSüresi / *Total Time of Project:12 ay+10 AY*		
Proje No / *Project Number:* 10706		
AraştırmayıDestekleyenKuruluş (varsa)/ *Funding institution(s) (if available):* Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP)		
Destek Şekli ve Miktarı / *Type and amount of funding: Yüksek Lisans Tez Projesi/ 45.000 TL*		

Karar:
Yukarıda bilgileri verilen araştırma projesinin kesin sonuç raporu Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 18/08/2025 tarih ve 2025/08-01 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.
Decision:
Final report of the research project detailed above was approved by Van Yuzuncu Yil University Animal Researches Local Ethic Committee in the session held on 18/08/2025 (decision number2025/08-01)

	BAŞKAN /CHAIR Prof. Dr. Semiha DEDE	
ÜYE Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL	**ÜYE** Prof. Dr. Sıddık KESKİN	**ÜYE** Prof. Dr. Atilla DURMUŞ
ÜYE Prof. Dr. Nalan ÖZDAL	**ÜYE** Prof. Dr. Yıldıray BAŞBUĞAN	**ÜYE** Prof. Dr. Canser Yılmaz DEMİR
ÜYE Prof. Dr. Abdulahad DOĞAN	**ÜYE** Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ	**ÜYE** Doç. Dr. Dicle ALTINDAL
ÜYE Doç. Dr. Şükrü ÖNALAN	**ÜYE** Dr. Öğr. Üyesi Meryem ÇALİŞİR	**ÜYE** Vet. Hek. Ferhat İŞİK
ÜYE Vet. Hek. Ümit IŞIK	**ÜYE** Yasin DEMİRHAN	

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrak sorgulaması https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=4575&eD=BSR7F610E3&eS=32454 adresinden yapılabilir.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORİJİNALLİK RAPORU

Tarih 09/07/2025

Tez Başlığı: Etlik Damızlıklarda Yumurtalara Demir ve Çinko Nano Partiküllerinin İn Ovo Enjeksiyonunun Embriyonun Metabolizmasına Etkisi

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışmamın, kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç bölümlerinden oluşan toplam 136 sayfalık kısmına ilişkin, 07/07/2025 tarihinde Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre tezimin benzerlik oranı %3 dır.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

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

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Jiyan TUNÇ
Öğrenci No: 21910001180
Anabilim Dalı: Zootekni Anabilim Dalı
Programı: Hayvan Yetiştiriciliği ve Islahı Anabilim Dalı
Statüsü: (X) Yüksek lisans ( ) Doktora

DANIŞMAN	**ENSTİTÜ ONAYI**
UYGUNDUR	UYGUNDUR