

Özge ALTAN<sup>1</sup>  
Zümrüt AÇIKGÖZ<sup>1</sup>  
Özer Hakan BAYRAKTAR<sup>1</sup>  
Fadime AYDIN KÖSE<sup>2</sup>  
Çiğdem ŞEREMET TUĞALAY<sup>1</sup>  
Omid POURDOLAT<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, 35100, İzmir / Türkiye

<sup>2</sup> Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, 35100, İzmir / Türkiye

sorumlu yazar: ozge.altan@ege.edu.tr

## ***In ovo* Vitamin C ve E Enjeksiyonunun Isı Stresine Maruz Kalan Etlik Piliçlerde Gelişme Performansı ve Oksidatif Stabilite Üzerine Etkileri**

The Effects of *In Ovo* Injection of Vitamin C and E on Growth Performance and Oxidative Stability in Broilers Exposed to Heat Stress

Alınış (Received): 13.01.2017

Kabul tarihi (Accepted): 03.03.2017

### Anahtar Sözcükler:

Etlik piliç, *in ovo* vitamin enjeksiyonu, performans, oksidatif stres, lipid peroksidasyonu

### Key Words:

Broiler, *in ovo* vitamin injection, performance, oxidative stress, lipid peroxidation.

### ÖZET

**B**u çalışma, *in ovo* vitamin C ve E enjeksiyonunun çıkıştan kaynaklanan oksidatif strese karşı civcivleri koruma olasılığını değerlendirmek ve *in ovo* vitamin C ve E enjekte edilen yumurtalardan elde edilen etlik civcivlerde erken dönem ısı stresinin performans ve oksidatif stabilite üzerine etkilerini belirlemek için yürütülmüştür. Bu amaçla, kontrol grubu dışındaki dömlü yumurtalara kuluçkanın 17. gününde 20 IU vitamin E, 3 mg vitamin C ve 20 IU vitamin E+3 mg vitamin C enjekte edilmiştir. Çıkıştan sonra kontrol grubu civcivleri 2 gruba (kontrol ve ısı stresi) ayrılmış ve her biri 4 tekerrürlü (18 civciv) 5 grup (kontrol, ısı stresi, ısı stresi+vitamin C, ısı stresi+vitamin E ve ısı stresi+vitamin C+E) oluşturulmuştur. Isı stresi uygulanan gruplar 1-7. günler arasında her gün 4 saat  $38\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklığa maruz kalmışlardır. Erken yaşlarda ısı stresi uygulaması etlik piliçlerde 42. gün canlı ağırlığını, yem tüketimini ve yemden yararlanmayı önemli düzeyde etkilememiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, *in ovo* vitamin C ve E enjekte edilen yumurtalardan çıkan civcivlerde daha düşük malondialdehit (MDA) düzeyi ve daha yüksek süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi saptanmıştır. Çıkıştan 1 gün sonra, daha düşük kreatin kinaz (CK) ve MDA düzeyleri ancak daha yüksek trolox eşdeğer antioksidan kapasite (TEAK) değeri belirlenmiştir. *In ovo* vitamin C ve E enjeksiyonunun yeni çıkan civcivleri lipid peroksidasyonundan ve yaşamın erken döneminde ısı stresinin olumsuz etkilerinden koruyan etkili bir yöntem olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

### ABSTRACT

**T**his study was conducted to evaluate the protection probability of *in ovo* injection of vitamin C and E against oxidative stress to chicks due to hatching and to determine the effects of early age heat stress on performance and oxidative stability of broilers obtained from *in ovo* vitamin C and E injected eggs. For this purpose, fertile eggs except control group were injected with 20 IU vitamin E, 3 mg vitamin C and 20 IU vitamin E+3 mg vitamin C on the 17<sup>th</sup> day of incubation. The control chicks were assigned to 2 groups after hatching (control and heat stress) and 5 groups (control, heat stress, heat stress+vitamin C, heat stress+vitamin E and heat stress+vitamin C+E) were created each with 4 replicates (18 chicks). Heat stress groups were exposed to  $38\pm 1^{\circ}\text{C}$  for 4 h every day at ages of 1 to 7 d. Exposing chicks to heat stress at an early age did not significantly affect body weight, feed intake and feed conversion ratio at 42 d. It was determined lower malondialdehyde (MDA) levels and higher superoxide dismutase (SOD) activity in chicks hatched from *in ovo* vitamin C and E injected eggs compared to the control group. After 1 day, it was observed lower creatine kinase (CK) and MDA levels but higher trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) value. It was concluded that *in ovo* injection of vitamin C and E is an effective mean of protection from lipid peroxidation in newly hatched chicks and from adverse effects of heat stress early in life.

## GİRİŞ

Yüksek çevre sıcaklığı tavukçulukta en önemli stresörlerden biridir. Hızlı gelişme yönünde yapılan uzun süreli seleksiyon sonucunda etlik piliçlerin ısı stresine duyarlılığı artmıştır (Cahaner and Leenstra, 1992; Cahaner et al., 1995; Berrong and Washburn, 1998). Isı stresi etlik piliç performansında gerilemeye dolayısıyla önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Donkoh, 1989; Sandercock et al., 2001; St-Pierre et al., 2003). Bununla birlikte, hücre yapısı ve fizyolojisini olumsuz etkileyen ısı stresi serbest radikal üretimini artırarak lipid peroksidasyonuna ve oksidatif hasara neden olmaktadır (Etches et al., 1995; Yu, 1994; Altan ve ark., 2000, 2003, Lin et al., 2000, 2006).

Oksidatif stres, organizmadaki antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki dengenin antioksidanlar aleyhine bozulması sonucunda ortaya çıkar. Bu nedenle, antioksidan kapasiteyi güçlendirmek amacıyla çeşitli antioksidanlar kullanılmaktadır. Böylece oksidatif stresin doku ve organlara verdiği hasar önlenabilir. Bu amaçla antioksidan vitamin ve minerallerin yeme veya içme suyuna ilavesi yaygın uygulamalardır. Antioksidanların kuluçkalık yumurtalara in-ovo enjeksiyon yoluyla verilmesi ise oldukça yeni bir yöntemdir.

Damızlık yumurtalara çeşitli amino asit, karbonhidrat, mineral ve vitaminlerin *in ovo* enjeksiyonunun çıkış gücü, civciv kalitesi ve ileriki yaşlardaki performansı olumlu etkilediği saptanmıştır (İpek ve ark., 2004; Zakaria and Al-Anezi, 1996; Ohta et al., 2001; Uni et al., 2005; Hajati et al., 2013).

Embriyo, kuluçka döneminde oksidatif strese maruz kalabilir. Çünkü yumurta sarısı embriyo gelişimini sağlamak ve embriyonun enerji ihtiyacını karşılamak için yüksek düzeyde yağ ve çoklu doymamış yağ asitleri içerir. Bu durum, yumurta sarısının lipid peroksidasyonuna duyarlılığını artırır. Kuluçkanın 3. haftasında embriyonun yağ asidi tüketimi artar, dolayısıyla oksidatif stres riski artar (Noble and Cocchi, 1990; Latour et al., 2000). Oksidatif stres riskinin yüksek olduğu bir diğer dönem embriyonun O<sub>2</sub> kullanımının arttığı kabukaltı zararlı deldiği (internal pipping) dönemdir. Ayrıca, çıkış sonrası civcivin çevredeki yüksek oksijen konsantrasyonuna maruz kalması da lipid peroksidasyonu riskini artırır.

Diğer taraftan, kuluçkanın 2. yarısından itibaren aşırı metabolik ısı üretimi nedeniyle de embriyolar ısı stresine maruz kalabilir (Tullet, 1990). Dolayısıyla endojen veya anadan sarı kesesine aktarılan doğal antioksidanlar, özellikle kuluçkanın 2. yarısından itibaren embriyoyu ve civcivi serbest radikallerin olumsuz etkisine karşı korumada yetersiz kalabilir. Nitekim Tsunekage and Ricklefs (2015) embriyonik

gelişim sırasında lipid peroksidasyonunun arttığını ve embriyo gelişim hızı, oksidatif metabolizma ve oksidatif hasarın birbirine paralel geliştiğini bildirmişlerdir. Bu nedenlerle, özellikle kuluçkanın 2. yarısından itibaren embriyonun antioksidanlar ile desteklenmesi, stres koşullarında antioksidan savunma sistemini güçlendirmenin etkin bir yolu olarak görülmektedir.

Vitamin E, hücre ve dokuları serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna karşı koruyan güçlü bir antioksidandır. Dolayısıyla, antioksidan savunma sistemini güçlendirmek için yeme vitamin E ilavesi önerilmektedir (Surai, 2003). Vitamin E yemden yumurta sarısına ve oradan embriyo dokularına aktarılır. Damızlık tavukların yemine vitamin E ilavesi, yumurta sarısında ve embriyo dokularında vitamin E düzeyinin artması sonucu lipid peroksidasyonuna karşı direnci artırır (Surai et al., 1996, Surai, 1999). Nitekim Lin et al. (2005) yeme vitamin E ilavesinin civcivlerde antioksidan kapasiteyi arttırdığını ve oksidatif stresi baskıladığını bildirmişlerdir. Maternal antioksidanlar yanında embriyoyu antioksidanlarla desteklemenin bir diğer yolu antioksidanların damızlık yumurtalara *in ovo* enjeksiyon ile verilmesidir.

Hossain et al. (1998), *in ovo* vitamin E enjekte edilen yumurtalardan çıkan civcivlerde 42. gün canlı ağırlık, yem tüketimi ve yemden yararlanmanın kontrol grubuna göre daha iyi olduğunu saptamışlardır. Schaal (2008), kuluçkanın 14. gününde vitamin E enjeksiyonunun, özellikle beyinde vitamin E ve lipid içeriğini artırdığını, antioksidan kapasiteyi güçlendirerek civcivleri oksidatif strese karşı koruyabildiğini bildirmiştir. Ayrıca, vitamin E enjeksiyonunun ROS'un (reaktif oksijen türleri) zararlı etkilerini azaltarak embriyo ölümlerini azaltabileceğini ve daha sağlıklı civciv üretiminin mümkün olacağını belirtmiştir. Salary et al. (2014) ise *in ovo* vitamin E enjeksiyonunun çıkış gücünü arttırdığını, çıkış sonrası civcivlerde bağışıklık sistemini güçlendirdiğini fakat etlik piliç performansını etkilemediğini saptamışlardır.

Sahin et al. (2001), etlik piliçlerde ısı stresinin sebep olduğu performans kayıplarının önlenmesinde yeme vitamin E ilavesinin etkili bir yöntem olduğunu, karaciğerde MDA (malondialdehit) üretimini azaltarak lipid peroksidasyonuna karşı koruduğunu bildirmişlerdir. Puthongsiriporn et al. (2001) yumurta tavuklarının yemine vitamin E ilavesinin ısı stresinin olumsuz etkilerini azalttığını, yumurta verim ve kalitesini arttırdığını saptamışlardır. Ayrıca, ısı stresinin yumurta sarısı ve plazmada neden olduğu lipid peroksidasyonunu azalttığı ve vitamin E ile birlikte vitamin C ilavesinin bu olumlu etkiyi güçlendirdiği belirtilmiştir.

Vitamin C hem güçlü bir antioksidandır hem de okside vitamin E'yi yeniden aktif vitamin E formuna dönüştürerek oksidatif kapasiteyi artırır (Surai, 2003). Tavuklar genelde kendilerine yeterli miktardaki vitamin C'yi böbreklerinde sentezlerler ancak bunu yumurtaya aktarmazlar. Dolayısıyla yumurtada vitamin C yoktur. Diğer taraftan yoğun yetiştirme sistemlerinde ve stres koşullarında vitamin C ihtiyacı artar ve endojen vitamin C sentezi ihtiyacı karşılayamaz. Embriyonik dönemin başlarında (kuluçkanın 3-4. günlerinde) vitamin C sarı kesesi tarafından sentezlenir. Fakat erken embriyonik dönemde üretilen vitamin C miktarı özellikle stres koşullarında embriyoyu korumak için yeterli olmayabilir. *In ovo* enjeksiyon yöntemi ile vitamin C verilmesi embriyoyu olumsuz kuluçka koşullarına ve çıkış stresine karşı korur, çıkış performansını artırır (Nowaczewski et al., 2012; Elibol ve ark., 2001; İpek ve ark., 2004; Zakaria and Al-Anezi, 1996).

Bu literatür bilgileri ışığı altında, embriyonik dönemde *in ovo* vitamin C ve E enjeksiyonu ile civcivlerin çıkış stresi ile başa çıkma yetenekleri güçlendirilerek civcivlerin yaşama gücü ve verim performansının artırılması beklenmektedir. Bu çalışmanın ilk amacı, kuluçka döneminde vitamin C ve E enjeksiyonunun civcivlerde gelişen oksidatif stresi önleme olasılığının saptanmasıdır. İkinci amacı ise, embriyonik dönemde *in ovo* vitamin C ve E enjekte edilerek antioksidan kapasitesi güçlendirilmiş civcivlerin erken yaşlarda maruz kaldığı ısı stresi ile baş edebilme yeteneklerinin belirlenmesi ve ileri yaşlardaki performansları üzerine etkilerinin saptanmasıdır.

## **MATERYAL ve YÖNTEM**

### **Hayvan Materyali**

Bu çalışma için Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'undan onay (77/2012) alınmıştır.

Çalışmada 31 haftalık yaştaki Ross-308 genotipine ait etlik damızlık tavuklardan elde edilen 465 adet kuluçkalık yumurta kullanılmıştır. Standart koşullarda kuluçkalanan bu yumurtalar arasından 17. günde döllülük kontrolü ile seçilen 430 adet döllü yumurta 4 muamele grubuna ayrılmıştır. Kontrol grubundaki yumurtalara (172 adet) hiçbir uygulama yapılmazken, diğer deneme gruplarındaki yumurtaların (86 adet) hava kesesine 1 ml'lik insülin enjektörleri kullanılarak 0.5 ml de-iyonize su çözeltisi içinde 3 mg vitamin C (Sigma-Aldrich®), 20 IU vitamin E (Sigma-Aldrich®) veya 3 mg Vitamin C ile birlikte 20 IU vitamin E enjekte edilmiştir. Enjeksiyon işlemi sonrasında kabukta oluşan delik daksil sıvısı ile kapatılıp yumurtalar tekrar kuluçka makinasına yerleştirilmiş ve tüm yumurtalara standart kuluçka koşulları sağlanmıştır.

### **Deneme Düzeni**

Kuluçkadan çıkan civcivler çalışmanın hayvan materyalini oluşturmuştur. Her deneme grubundaki civcivlere kanat numarası takılarak bireysel olarak tartılmış ve her biri 4 tekerrürlü (18 civciv) 5 muamele grubuna ayrılmıştır. Bu gruplar:

**Kontrol (K):** Kuluçkada kontrol grubundan elde edilen civcivler deneme süresince standart büyütme koşullarında yetiştirilmişlerdir.

**Isı Stresi (IS):** Kuluçkada kontrol grubundan elde edilen civcivlere denemenin ilk haftası (1-7. günler arası) her gün 4 saat (12:00-16:00) yüksek sıcaklık (38±1°C) uygulanmıştır.

**Vitamin C (ISC):** Kuluçkada *in-ovo* vitamin C uygulanan yumurtalardan çıkan civcivlere denemenin 1-7. günleri arası her gün 4 saat (12:00-16:00) yüksek sıcaklık (38±1°C) uygulanmıştır.

**Vitamin E (ISE):** Kuluçkada *in-ovo* vitamin E uygulanan yumurtalardan çıkan civcivlere denemenin 1-7. günleri arası her gün 4 saat (12:00-16:00) yüksek sıcaklık (38±1°C) uygulanmıştır.

**Vitamin C+E (ISCE):** Kuluçkada *in-ovo* vitamin C+E uygulanan yumurtalardan çıkan civcivlere denemenin 1-7. günleri arası her gün 4 saat (12:00-16:00) yüksek sıcaklık (38±1°C) uygulanmıştır.

Deneme tam çevre denetimli kümede gerçekleştirilmiştir. Deneme süresince kümede 23 saat aydınlık ve 1 saat karanlık döngüsü uygulanmış ve hayvanlar bir ticari firmadan temin edilen başlatma (0-21.günler arası) ve büyütme (22-42. günler arası) yemleri ile beslenmişlerdir (Çizelge 1). Piliçlerin canlı ağırlıkları bireysel olarak ve yem tüketimleri tekerrür düzeyinde belirlenmiştir. Ölümler günlük olarak kaydedilmiştir. Yemden yararlanma ise canlı ağırlık artışı, yem tüketimi ve ölümler dikkate alınarak hesaplanmıştır.

**Çizelge 1.** Deneme yemlerinin besin madde kompozisyonu  
**Table 1.** Nutrient composition of experimental diets

Besin maddeleri, g/kg	Başlatma yemi	Büyütme yemi
Kuru madde	906.18	896.96
Ham protein	231.95	208.88
Ham yağ	35.71	80.76
Ham selüloz	38.91	42.88
Kalsiyum	9.44	7.44
Toplam fosfor	6.74	6.13
Metabolik enerji, kcal/kg	3034	3244

### **Yem ve Kan Analizleri**

Yemlerin kimyasal analizleri Weende analiz yöntemlerine göre belirlenmiştir (Bulgurlu ve Ergül, 1978). Nişasta ve şeker içerikleri saptanan yemlerin

(Naumann and Bassler, 1993), metabolik enerji değerleri hesaplanmıştır (Anonim, 2004). Cıvıv çıkışında, çıkıştan 24 s sonra ve ısı uygulamasının 7. gününde her gruptan rastgele 7'şer cıvıv seçilerek servikal dislokasyon uygulanmış ve kan örnekleri alınmıştır. Plazmada CK ve SOD enzimlerinin aktiviteleri ticari kitler (CK kiti-Biovision Kat No: K777-100 ve SOD kiti-Sigma Kat. No: 19160) kullanılarak ölçülmüştür. Örneklerin MDA düzeyleri, Draper and Hadley'in (1990) çift ısıtma yöntemine göre belirlenmiştir. TEAK düzeyi 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilik asit'e (Troloks) eşdeğer total antioksidan kapasiteyi gösteren bir yöntemle saptanmıştır (Re et al., 1999).

### İstatistik Analizler

İstatistiksel analizlerde SAS paket programı kullanılmış ve önem düzeyi 0.05 olarak kabul edilmiştir (SAS, 1998). Ölüm oranı dışındaki verilere "Doğrusal Model" kullanılarak ANOVA testi uygulanmış, ortalamaların karşılaştırılmasında DUNCAN testi kullanılmıştır. Ölüm oranları khi-kare testi ile analiz edilmiştir.

### ARAŞTIRMA BULGULARI

*In ovo* antioksidan enjeksiyonu ve ısı uygulamasının etlik piliç performansı üzerine etkisi Çizelge 2'de sunulmuştur.

Deneme gruplarının 7., 21. ve 42. günlerde saptanan canlı ağırlıkları arasında istatistiki olarak önemli düzeyde farklılık saptanmamıştır ( $P>0.05$ ). Yem tüketimi ise sadece ilk 3 haftalık dönemde *in ovo* antioksidan enjekte edilen ve ısı uygulanan IS, ISC, ISE ve ISCE gruplarında (1126.45, 1173.91, 1177.56 ve 1134.45g) K grubuna (1231.88g) göre önemli düzeyde azalmıştır ( $P<0.05$ ). Benzer şekilde, deneme grupları arasında yemden yararlanma bakımından da sadece 0-21.günler arasında önemli düzeyde farklılıklar saptanmıştır ( $P<0.05$ ). K grubuna (1.49) kıyasla IS, ISC, ISE ve ISCE gruplarında (1.35, 1.40, 1.41 ve 1.38) yemden yararlanma önemli düzeyde iyileşmiştir. *In ovo* vitamin enjekte edilen ve yüksek sıcaklık uygulanan grupların ölüm oranındaki azalmanın istatistiki olarak önemli olmadığı belirlenmiştir.

**Çizelge 2.** *In ovo* antioksidan (vitamin C ve E) enjeksiyonu ve ısı uygulamasının etlik piliçlerin performansı üzerine etkileri ( $\bar{x}\pm SE$ )

**Table 2.** The effects of *in ovo* antioxidant injection (vitamin C and E) and heat treatment on performance of broiler

Parametreler	Deneme grupları					Önemlilik (P değeri)
	K	IS	ISC	ISE	ISCE	
<b>Canlı ağırlık, g/piliç</b>						
7.gün	165.06± 1.64	168.32± 1.33	162.27± 1.65	165.67± 1.59	164.38± 1.53	0.0892
21.gün	868.63± 11.87	873.76± 9.53	876.13± 9.62	875.43± 9.79	861.35± 11.39	0.8430
42.gün	3071.57±48.06	2981.59±44.29	2914.87±40.68	3012.96±43.03	3074.39±47.92	0.0669
<b>Yem tüketimi, g/piliç</b>						
0-21.günler arası	1231.88 <sup>a</sup> ±7.80	1126.45 <sup>c</sup> ±17.57	1173.91 <sup>b</sup> ±13.67	1177.56 <sup>b</sup> ±10.91	1134.45 <sup>c</sup> ±4.08	0.0001
22-42.günler arası	3676.13±111.29	3652.45±42.96	3508.86±108.60	3806.18±79.40	3759.35±132.23	0.3103
0-42.günler arası	4908.01±111.91	4778.90±29.50	4682.77±108.18	4983.74±74.28	4893.80±134.31	0.2682
<b>Yemden yararlanma, g/g</b>						
0-21.günler arası	1.49 <sup>a</sup> ±0.01	1.35 <sup>c</sup> ±0.01	1.40 <sup>b</sup> ±0.01	1.41 <sup>b</sup> ±0.01	1.38 <sup>bc</sup> ±0.01	<0.0001
22-42.günler arası	1.67±0.03	1.73±0.05	1.72±0.04	1.78±0.03	1.69±0.03	0.2510
0-42.günler arası	1.60± 0.02	1.60± 0.03	1.61± 0.03	1.66± 0.02	1.59± 0.02	0.4234
<b>Ölüm oranı, %</b>						
0-42.günler arası	7.95±2.05	3.41±2.05	3.41±2.05	2.27±2.05	2.27±2.05	0.2630

a-c: Aynı satırda farklı harflerle işaretlenen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p<0.05$ )

Cıvıvlerden çıkış günü, 1. ve 7. günlerde alınan kan örneklerinde saptanan CK, MDA, TEAK ve SOD değerleri Çizelge 3'de görülmektedir. Çıkış günü ve 1 gün (24 s) sonra saptanan değerler *in ovo* vitamin C ve E enjeksiyonunun cıvıvlerdeki oksidatif stabilite üzerine etkilerinin belirlenmesi amacı ile yorumlanmıştır. Çıkış sonrası 7. günde saptanan değerler ise, deneme gruplarındaki oksidatif hasarın karşılaştırılması amacı ile değerlendirilmiştir.

Çıkış günü ve 1. günde belirlenen CK değerleri üzerinde kuluçka döneminde vitamin C ve E enjeksiyonunun etkisinin istatistik olarak önemli olduğu saptanmıştır ( $P<0.05$ ). Çıkışta ISE grubunda ve 1 gün sonra ISE ile ISCE gruplarında CK değerleri diğer deneme gruplarına göre önemli düzeyde azalmıştır. Ancak, ısı uygulamasının sonunda (7. günde) gruplar arasında CK değeri bakımından gözlenen farklılıkların istatistiki olarak önemli olmadığı belirlenmiştir.

*In ovo* vitamin C ve E enjeksiyonu civcivlerde SOD enzimi aktivitesini önemli düzeyde etkilemiştir. Çıkış günü SOD düzeyi ISC ve ISE gruplarında artma eğilimi gösterirken ISCE grubunda önemli düzeyde yükselmiştir ( $P<0.05$ ). Isı uygulaması öncesi (1. gün) deneme gruplarının SOD düzeyi ise birbirine benzerlik göstermiş ve 30.03 ile 38.85 U/ml arasında değişmiştir. Benzer şekilde, ısı uygulaması sonunda da SOD enzimi aktivitesi bakımından önemli düzeyde farklılık saptanmamıştır. Denemenin 7. gününde en yüksek SOD değeri ISE grubunda ( $82.86\pm 7.33$  U/ml), en düşük SOD değeri K grubunda ( $55.20\pm 8.25$  U/ml) belirlenmiş ve muhtemelen bireysel varyasyonlar nedeniyle bu fark istatistik olarak önemli bulunmamıştır.

MDA düzeyi 0., 1. ve 7. günlerde deneme grupları arasında önemli düzeyde farklılık göstermiştir ( $P<0.05$ ). Çıkışta ve 1.günde MDA düzeyi *in ovo* vitamin C ve E uygulanan gruplarda K grubuna göre azalmıştır. Isı uygulaması sonunda 7. günde MDA düzeyi K grubuna

göre IS grubunda yükselmiştir ( $P<0.05$ ). Sıcak stresinin bu olumsuz etkisi ISE grubunda nispeten giderilirken ISC ve ISCE gruplarında tamamen önlenmiştir. Dolayısıyla, ISC ve ISCE gruplarında (0.73 ve 0.65 nmol/ml) K grubuna (0.69 nmol/ml) oldukça yakın MDA düzeyleri belirlenmiştir.

Kuluçka döneminde vitamin C ve E enjeksiyonu çıkışta TEAK düzeyini önemli düzeyde etkilememiş ve civcivlerin TEAK düzeyleri 1.83 ile 2.00 mM arasında değişmiştir. Civcivlerin 1.gün TEAK değerleri ise gruplar arasında önemli düzeyde farklılık göstermiştir ( $P<0.05$ ). K grubuna (2.08 mM) göre ISC ve ISE gruplarında (2.27 ve 2.32 mM) TEAK düzeyleri önemli düzeyde yükselmiştir. Isı uygulamasının sonunda da (7. gün) civcivlerin TEAK düzeyleri bakımından önemli düzeyde farklılıklar belirlenmiştir. Civcivlerin 7. gün TEAK düzeyleri K, IS ve ISCE gruplarında birbirine benzerlik gösterirken ISE grubunda nispeten ve ISC grubunda önemli düzeyde artmıştır.

**Çizelge 3.** *In ovo* antioksidan (vitamin C ve E) enjeksiyonu ve ısı uygulamasının lipid peroksidasyonu ve antioksidan savunma sistemi üzerine etkileri ( $\bar{x}\pm SE$ )

**Table 3.** The effects of *in ovo* antioxidant injection (vitamin C and E) and heat treatment on lipid peroxidation and antioxidant defence system

Parametreler	Deneme grupları					Önemlilik (P değeri)
	K	IS	ISC	ISE	ISCE	
<b>Çıkış</b>						
CK, U/L	3134.33 <sup>a</sup> ±103.45	-	3211.64 <sup>a</sup> ±48.01	2736 <sup>b</sup> .37±62.58	3222.78 <sup>a</sup> ±70.25	0.0001
SOD, U/ml	22.31 <sup>b</sup> ±3.89	-	30.73 <sup>ab</sup> ±4.71	35.98 <sup>ab</sup> ±5.63	41.89 <sup>a</sup> ±3.19	0.0348
MDA, nmol/ml	0.59 <sup>a</sup> ±0.06	-	0.46 <sup>b</sup> ±0.02	0.55 <sup>ab</sup> ±0.05	0.43 <sup>b</sup> ±0.02	0.0315
TEAK, mM	1.83±0.13	-	1.98±0.04	2.00±0.04	1.97±0.07	0.4345
<b>1.gün</b>						
CK, U/L	3086.71 <sup>a</sup> ±81.63	-	2942.12 <sup>a</sup> ±80.40	1702.28 <sup>b</sup> ±35.62	1373.77 <sup>c</sup> ±161.77	<0.0001
SOD, U/ml	30.68±0.83	-	30.98±7.28	30.03±2.63	38.85±2.39	0.3518
MDA, nmol/ml	1.19 <sup>a</sup> ±0.08	-	0.59 <sup>b</sup> ±0.09	0.61 <sup>b</sup> ±0.02	0.38 <sup>c</sup> ±0.01	<0.0001
TEAK, mM	2.08 <sup>b</sup> ±0.05	-	2.27 <sup>a</sup> ±0.06	2.32 <sup>a</sup> ±0.03	2.16 <sup>ab</sup> ±0.10	0.0412
<b>7.gün</b>						
CK, U/L	870.53±114.34	794.34±110.23	673.59±22.01	830.24±108.33	632.69±34.96	0.2719
SOD, U/ml	55.20±8.25	56.76±10.84	62.39±13.03	82.86±7.33	71.07±9.67	0.2905
MDA, nmol/ml	0.69 <sup>bc</sup> ±0.06	0.92 <sup>a</sup> ±0.08	0.73 <sup>bc</sup> ±0.05	0.85 <sup>ab</sup> ±0.05	0.65 <sup>c</sup> ±0.05	0.0117
TEAK, mM	2.19 <sup>b</sup> ±0.03	2.27 <sup>b</sup> ±0.05	2.45 <sup>a</sup> ±0.07	2.33 <sup>ab</sup> ±0.06	2.25 <sup>b</sup> ±0.06	0.0250

a-c: Aynı satırda farklı harflerle işaretlenen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $p<0.05$ )

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, *in ovo* vitamin C ve E enjeksiyonunun çıkıştan kaynaklanan oksidatif strese karşı civcivleri koruma olasılığı ile *in ovo* vitamin C ve E enjekte edilen yumurtalardan elde edilen etlik civcivlerde erken dönem ısı stresinin performans ve oksidatif stabilite üzerine olumsuz etkilerini önleme olanakları irdelenmiştir.

K ve IS grupları arasında 1., 3. ve 6. hafta canlı ağırlığı bakımından önemli bir fark görülmemesi erken yaşlarda

uygulanan sıcak stresinin kesim yaşına kadar önemli bir ağırlık kaybına neden olmadığını göstermektedir. Ayrıca kuluçka döneminde vitamin C ve E enjeksiyonunun, erken dönemde (1-7. günler arası) ısı stresine maruz kalan civcivlerin (ISC, ISE, ISCE grupları) ilerideki büyüme performansı üzerinde olumlu/olumsuz bir etkisi olmadığı saptanmıştır. Ancak istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte, erken dönemde uygulanan ısı stresi (IS grubu) K grubuna göre 6. hafta canlı ağırlığında

90 g'lık bir azalmaya neden olmuştur. Kuluçka döneminde vitamin C+E uygulaması ısı stresinin neden olduğu canlı ağırlıktaki bu azalmayı telafi etmiştir. IS ile ISCE gruplarının 6. hafta canlı ağırlıkları arasında yaklaşık 93 g'lık fark, bunu ifade etmektedir.

Bir hafta boyunca ısı stresine maruz kalan civcivlerin kontrollerine göre yem tüketimleri önemli düzeyde azalmıştır. Kuluçka döneminde vitamin C ve E enjeksiyonu uygulanan grupta 0-3 haftalık dönemde yem tüketimindeki bu azalmanın kısmen telafi edildiği görülmüştür. Isı stresinin yem tüketimi üzerindeki olumsuz etkisi 4. haftadan itibaren telafi edilmiş ve 6. haftada grupların yem tüketimleri benzerlik göstermiştir.

Isı stresi uygulaması civcivlerin 1. ve 3. haftalardaki canlı ağırlıklarında önemli bir kayba neden olmamış, yem tüketimlerini azaltmış ve diğer deneme grupları ile karşılaştırıldığında IS grubu 0-3 haftalık dönemde yemi daha iyi değerlendirmiştir. Ancak bu olumlu etki kesim yaşına kadar sürdürülememiştir. Erken yaşlarda ısı stresi uygulaması ve *in ovo* vitamin C ve E enjeksiyonu deneme boyunca (0-6. haftalar arası) yemden yararlanma değerlerini etkilememiştir.

Ölüm oranları bakımından muamele grupları arasında önemli bir fark olmaması, uygulanan ısı stresinin civciv ölümlerine neden olmadığını göstermiştir.

Bulgularımızla uyumlu olarak, ısı stresi altında yetiştirilen etik piliçlerde ve japon bildirincinlerinde yeme vitamin E (Niu et al., 2009), vitamin C (Kutlu ve Forbes, 1994) veya vitamin C+E ilavesinin (Sahin et al., 2003) performans üzerinde önemli bir etki yaratmadığı bildirilmektedir.

Organizmada prooksidan/antioksidan dengesinin devamlılığında yemin antioksidan vitaminlerle (örneğin vitamin C ve E) desteklenmesi özellikle stres koşullarında antioksidan savunmanın güçlendirilmesinde etkin bir yoldur. Dişi ebeveynin antioksidan kapasitesi yumurta sarısının antioksidan düzeyini belirlemektedir. Dolayısıyla embriyonun antioksidan kapasitesini etkilemektedir (Surai et al., 1996; Lin et al., 2005).

Çevresel stres, antioksidan/prooksidan dengesini bozarak oksidatif strese neden olur (Halliwell et al., 1992). Isı stresi, organ ve dokularda MDA artışına (Altan ve ark., 2000, 2003) plazma vitamin C ve E gibi antioksidanların düzeyinde azalmaya, kortikosteron hormonu düzeyinde artışa neden olur (Etches et al., 1995). Çalışmamızda yumurtadan henüz çıkan kontrol grubu civcivlerde MDA düzeyinin *in ovo* vitamin enjekte edilen civcivlere göre daha yüksek olması, kontrol grubu civcivlerin lipid peroksidasyonuna maruz kaldığı şeklinde yorumlanmıştır. Çıkiştan 1 gün sonra kontrol grubunda MDA düzeyinin daha fazla artması ve diğer

gruplardan yüksek olması, lipid peroksidasyonunun artarak devam ettiğini göstermektedir.

Yeni çıkan civcivlerde antioksidan savunma sisteminin henüz tam gelişmemiş olması, yeterli düzeyde antioksidan sentezlenememesi veya yumurta sarısından gelen maternal antioksidanların yetersiz kalması sonucu kontrol grubu civcivleri çıkış stresini tolere edememiş, oksidatif stres baskılanamamıştır. Yani, kontrol grubu civcivleri serbest radikalleri nötralize edememiş, lipid peroksidasyonu gelişmiştir.

Kuluçkanın 17. gününde antioksidan vitamin enjekte edilen (ISC, ISE, ISCE) gruplarda MDA düzeyinin daha düşük olması, antioksidan vitamin enjeksiyonunun civcivleri ROS'un zararlı etkilerine karşı daha etkin olarak koruduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Bu sonuçlar, Schaal (2008) ve Salary et al. (2014)'ün vitamin E *in-ovo* enjeksiyonunun antioksidan kapasiteyi arttırarak, embriyoyu oksidatif strese karşı koruduğu bulgularıyla uyumludur. Yumurtadan henüz çıkan kontrol grubundaki civcivlerde SOD aktivitesi, *in ovo* vitamin C+E enjekte edilen civcivlerden önemli düzeyde, *in ovo* vitamin C veya vitamin E enjekte edilen civcivlerden kısmen daha düşüktür. Enzimatik antioksidanlar (SOD, CAT-katalaz, GSH-Px-glutasyon peroksidaz) hücrenin serbest radikallere karşı ilk aşama savunma sistemidir (Surai, 2003). Kontrol grubunda SOD aktivitesinin diğer gruplardan daha düşük olması, bu civcivlerde lipid peroksidasyonunu önlemede ilk düzey savunma sisteminin yeterli olmadığını göstermektedir. Ancak çıkıştan 24 saat sonra kontrol grubunda SOD aktivitesinin arttığı ve deneme grupları arasında SOD aktivitesi bakımından önemli bir fark kalmadığı saptanmıştır.

Yumurtadan henüz çıkan civcivlerde toplam antioksidan kapasitesi bakımından önemli bir fark olmadığı görülmüştür. Ancak çıkıştan 24 saat sonra vitamin C ve E *in ovo* enjeksiyonu yapılan gruplarda TEAK düzeyinin kontrol grubu civcivlerine göre önemli düzeyde yüksek olması, bu civcivlerde antioksidanlar lehine antioksidan/prooksidan dengesinin değiştiği ve civcivlerin oksidatif strese toleransının arttığı şeklinde yorumlanmıştır. Hücrelerin oksidatif strese karşı korunmasında, antioksidan düzeyleri kadar, antioksidanlar arasındaki etkileşimler de önemlidir. Vitamin C, okside vitamin E'i, yeniden aktif vitamin E formuna dönüştürebildiği için bazen düşük vitamin E düzeylerinde bile güçlü bir antioksidan savunma sağlanabilmektedir (Surai, 2003). Nitekim yeni çıkan civcivlerde vitamin C+E kombinasyonunda SOD aktivitesinin en yüksek, MDA düzeyinin en düşük olduğu, dolayısıyla oksidatif savunmanın en güçlü olduğu görülmektedir.

Çıkış sonrası 7. gün ısı stresi uygulanan civcivlerde kontrol grubuna göre MDA düzeyinin önemli düzeyde yüksek olması, ısı stresinin lipid peroksidasyonuna neden olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bu sonuçlarla uyumlu olarak Altan ve ark. (2000, 2003) çalışmalarında ısı stresinin MDA düzeyini artırarak oksidatif strese neden olduğunu bildirmişlerdir.

Kuluçka döneminde antioksidan vitamin enjekte edilen ve daha sonra ısı stresi uygulanan civcivlerde MDA düzeyleri, ısı stresi uygulanmayan kontrol grubuna benzer veya daha düşük düzeylerde saptanmıştır. Bu sonuç, kuluçka döneminde antioksidan vitamin enjeksiyonunun civcivleri erken yaşlarda ısı stresinden kaynaklanan lipid peroksidasyonu riskine karşı koruduğunu göstermektedir. Kuluçka dönemde vitamin C+E enjeksiyonu yapılan ve erken yaşlarda ısı stresine maruz kalan civcivlerde en düşük MDA düzeyinin ölçülmesi, vitamin C+E birlikte uygulanmasının lipid peroksidasyonuna karşı savunma kapasitesinin arttırılmasında vitamin C ve E'nin bireysel uygulanmasına göre çok daha etkin olduğunu göstermektedir.

K ve IS grupları arasında TEAK ve SOD aktivitesi bakımından önemli farklar olmaması, çıkış sonrası ısı stresi uygulamasının antioksidan kapasite üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığını göstermektedir. Kuluçka döneminde vitamin C enjeksiyonu yapılan civcivlerde daha sonra ısı stresine maruz kaldıklarında TEAK kapasiteleri artmış, dolayısıyla oksidatif strese tolerans güçlenmiştir. Bu olumlu etki kısmen *in ovo* vitamin E uygulanan civcivlerde de görülmüştür.

CK testi, kandaki kreatin kinaz veya diğer adıyla kreatin fosfokinaz enzim düzeyinin bir ölçütüdür. Kalp, iskelet kası, beyin gibi bazı doku ve organlarda hasar meydana geldiğinde ve stres durumunda, hasarlı hücrelerden salgılanarak kana karışır ve dolayısıyla kandaki CK düzeyi yükselir. Bu bağlamda, kan CK

düzeyindeki artış genelde kalp, beyin ve iskelet kası hasarlarının bir indikatörü olarak değerlendirilir. Nitekim tavuklarda plazma CK düzeyindeki artış, sıcak stresinin (Mitchell and Sandercock, 1995; Sandercock et al., 2001) ve taşımanın neden olduğu fizyolojik stresin (Mitchell and Kettlewell, 1998) bir indikatörü olarak yorumlanmaktadır.

Çıkış gününde, vitamin E enjekte edilen grupta (ISE) CK düzeyinin diğer gruplardan daha düşük olması, çıkış stresinin bu grupta daha az kas hasarına neden olduğunu ifade etmektedir. Çıkıştan 24 saat sonra kontrol ve *in ovo* vitamin C enjekte edilen gruplarda CK düzeylerinin *in ovo* vitamin E ve vitamin C+E enjekte edilen gruplara göre yüksek olması bu gruplarda doku hasarlarının halen daha yüksek olduğunu göstermektedir. Yedi günlük civcivlerde, ısı stresi sonrasında gruplar arasında CK düzeyleri bakımından önemli bir fark saptanmamıştır. Dolayısıyla, ısı stresi civcivlerde önemli doku ve organ hasarına neden olmamıştır.

Sonuç olarak, erken yaşlarda uygulanan ısı stresi ileriki yaşlarda etlik piliç performansında önemli bir olumsuz etki yaratmamıştır. İlk üç haftada görülen yem tüketimindeki azalma daha sonraki üç haftalık dönemde telafi edilmiştir. *In ovo* vitamin C ve E enjeksiyonu antioksidan savunma sistemini güçlendirerek çıkış gününde civcivleri lipid peroksidasyonuna karşı korumuştur. Nitekim, *in ovo* vitamin C ve E enjekte edilen civcivlerde SOD aktivitesinin daha yüksek olması bu bulguyu desteklemiştir. Bununla birlikte ISCE grubundaki civcivlerde 7. günde en düşük MDA düzeyinin saptanması, kuluçka döneminde *in ovo* vitamin C ve E uygulamasının erken yaşlarda ısı stresinin neden olduğu lipid peroksidasyonu riskini azalttığını göstermektedir.

## KAYNAKLAR

- Altan Ö., A. Pabuçcuoğlu, A. Altan, S. Konyalıoğlu ve H. Bayraktar. 2003. Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers. *British Poultry Science*, 44(4): 545-550.
- Altan, Ö., A. Altan, I. Oğuz, A. Pabuçcuoğlu ve S. Konyalıoğlu. 2000. Effects of heat stress on growth, some blood variables and lipid oxidation in broilers exposed to high temperature at an early age. *British Poultry Science*, 41(4): 489-493.
- Anonim. 2004. Yem Analiz Metodları (Tebliğ no:2004/33). Resmi Gazete, 02.09.2004, Ankara, Sayı: 25571.
- Berrong, S.L. and K.W. Washburn. 1998. Effects of genetic variation on total plasma protein, body weight gains, and body temperature responses to heat stress. *Poultry Science*, 77(3): 379-385.
- Bulgurlu, Ş. ve M. Ergül. 1978. Yemlerin Fiziksel, Kimyasal ve Biyolojik Analiz Metodları, E.Ü.Z.F. Yayınları No:127.
- Cahaner, A. and F. Leenstra. 1992. Effects of high temperature on growth and efficiency of male and female broilers from lines selected for high weight gain, favorable feed conversion, and high or low fat content. *Poultry Science*, 71(8):1237-1250.
- Cahaner, A., Y. Pinchasov, I. Nir and Z. Nitsan. 1995. Effects of dietary protein under high ambient temperature on body weight, breast meat yield, and abdominal fat deposition of broiler stocks differing in growth rate and fatness. *Poultry Science*, 74(6): 968-975.
- Donkoh, A. 1989. Ambient temperature: a factor affecting performance and physiological response of broiler chickens. *International Journal Biometeorology*, 33(4): 259-265.
- Draper, H.H. and M. Hadley. 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 186: 421-431.
- Elibol, O., M. Türkoğlu, M. Akan ve H. Erol. 2001. İnkubasyon sırasında ağır yumurtalara askorbik asit enjeksiyonunun kuluçka

- özelliklerine etkisi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 25 (3): 245-248.
- Etches, R.J., J.M. Jhon and A.M.V. Gibbins. 1995. Behavioural, physiological, neuroendocrine and molecular responses to heat stress. In Dagher, N.J. (Ed) *Poultry Production in Hot Climates*, pp.31-65, CAN International.
- Hajati, H., A. Hassanabadi and M. Rezaei. 2013. The effect of in ovo feeding of nano-multi vitamin on hatchability and performance of broiler chicks during starter period. *Ulusal Kuzey İnan Hayvancılık Sempozyumu, Sari Üniversitesi Ziraat Fakültesi, 1748-1752* pp.
- Halliwell, B., J.M.C. Gutteridge and C.E. Cross. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease; Where are we now? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119(6): 598-620.
- Hossain, S.M, S.L. Barreto, A.G. Bertechini, A.M. Rios and C.G. Silva. 1998. Influence of dietary vitamin E level on egg production of broiler breeders, and on the growth and immune response of progeny in comparison with the progeny from eggs injected with vitamin E. *Animal Feed Science and Technology*, 73: 307-317.
- İpek, A., Ü. Şahan ve B. Yılmaz. 2004. The effect of in ovo ascorbic acid and glucose injection in broiler breeder eggs on hatchability and chick weight. *Archiv fur Geflügelkunde*, 68(3): 132-135.
- Kutlu, H.R. and J.M. Forbes. 1994. Responses of broiler chicks to dietary ascorbic acid and corticosterone. *British Poultry Science*, 35(1): 184-186.
- Latour, M.A., A.A. Devitt, R.A. Meunier, J.J. Stewart and B.A. Watkins. 2000. Effects of conjugated linolic acid. 2. Embryonic and neonatal growth and circulating lipids. *Poultry Science*, 79(6): 822-826.
- Lin, H., E. Decuypere and J. Buyse. 2006. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. *Comperative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 141(1):11-175.
- Lin, H., R. Du and Z.Y. Zhang. 2000. The peroxidation in tissues of heat-stressed broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 13:1373-1376.
- Lin, Y.F., H.L. Tsai, Y.C. Lee and S.J. Chang. 2005. Maternal vitamin E supplementation affects the antioxidant capability and oxidative status of hatching chicks. *The Journal of Nutrition*, 135(10): 2457-2461.
- Mitchell, M.A. and D.A. Sandercock. 1995. Creatine kinase isoenzyme profiles in the plasma of domestic fowl (*Gallus domesticus*): effects of acute heat stress. *Research in Veterinary Science*, 59(1): 30-34.
- Mitchell, M.A. and P.J. Kettlewell. 1998. Physiological stress and welfare of broiler chickens in transit: Solutions not problems! *Poultry Science*, 77(12): 1803-1814.
- Naumann, C. and R. Bassler. 1993. *Methodenbuch, Band III. Die Chemische Untersuchung von Futtermitteln*. VDLUFA-Verlag, Darmstadt, Germany.
- Niu, Z.Y., V. Liu, Q.L. Yan and W.C. Li. 2009. Effects of different levels of vitamin E on growth performance and immune responses of broilers under heat stress. *Poultry Science*, 88 (10): 2101-2107.
- Noble R.C. and M. Cocchi. 1990. Lipid metabolism and the neonatal chicken. *Progress in Lipid Research*, 29(2): 107-140.
- Nowaczewski, S., H. Kontecka and S. Krystianiak. 2012. Effect of in-ovo injection of vitamin C during incubation on hatchability of chickens and ducks. *Folia Biologica (Krakow)*, 60(1-2): 93-97.
- Ohta, Y., M.T. Kidd and T. Ishibashi. 2001. Embryo growth and amino acid concentration profiles of broiler breeder eggs, embryos, and chicks after in-ovo administration of amino acids. *Poultry Science*, 80 (10): 1430-1436.
- Puthongsiriporn, U., S.E. Scheideler, J.L. Sell and M.M. Beck. 2001. Effects of vitamin E and c Supplementation on performance, in vitro lymphocyte proliferation, and antioxidant status of laying hens during heat stress. *Poultry Science*, 80(8): 1190-1200.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9-10): 1231-1237.
- Sahin K, N. Sahin, M. Onderci, M.F. Gursu and M. Issi. 2003. Vitamin C and E can alleviate negative effects of heat stress in Japanese Ouail. *Food, Agriculture & Environment*, 1(2): 244-249.
- Sahin, K., N. Sahin, M. Onderci, S. Yaralioglu ve O. Kucuk. 2001. Protective role of supplemental vitamin E on lipid peroxidation, vitamins E, A and some mineral concentrations of broilers reared under heat stress. *Veterinárni medicína*, 46: 140-144.
- Salary, J., F.S. Ala, M. Kalantar and H.R.H. Matim. 2014. In ovo injection of vitamin E on post-hatch immunological parameters and broilers chicken performance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4 (2): S616-S619.
- Sandercock, D.A., R.R. Hunter, G.R. Nute, M.A. Mitchell and P.M. Hocking. 2001. Acute heat stress-induced alterations in blood acid-base status and skeletal muscle membrane integrity in broiler chickens at two ages: implications for meat quality. *Poultry Science*, 80(4): 418-425.
- SAS Institute. 1998. *PC SAS User's Guide: Statistics*. SAS Inst. Cary.
- Schaal, T.P. 2008. The effects of in ovo feeding of fatty acids and antioxidants on broiler chicken hatchability and chick tissue lipids. Thesis for degree of Honors Baccalaureate of Science in Animal Sciences. Oregon State University, University Honors College.
- St-Pierre N.R., B. Cobanov and G. Schnitkey. 2003. Economic losses from heat stress by US livestock industries. *Journal of Dairy Science*, 86 (E. Suppl.): E52-E77.
- Surai, P.F. 1999. Tissue-specific changes in the activities of antioxidant enzymes during the development of the chicken embryo. *British Poultry Science*, 40(3): 397-405.
- Surai, P.F. 2003. Natural antioxidants in avian nutrition and reproduction. Nottingham University, Nottingham.
- Surai, P.F., R.C. Noble and B.K. Speake. 1996. Tissue-specific differences in antioxidant distribution and susceptibility to lipid peroxidation during development of the chick embryo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1304 (1):1-10.
- Tsunekage, T. and R.E Ricklefs. 2015. Increased lipid peroxidation occurs during development in Japanese quail (*Coturnix japonica*) embryos. *British Poultry Science*, 56(2): 262-266.
- Tullet, S.G. 1990. Science and the art of incubation. *Poultry Science*, 69 (1): 1-15.
- Uni, Z., P.R. Ferket, E. Tako and O. Kedar. 2005. In-ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. *Poultry Science*, 84(5): 764-770.
- Yu, B.P. 1994. Cellular defences against damage from react oxygen species. *Physiological Reviews*, 74(1): 139-16, 1994.
- Zakaria, A.H. and M.A. Al-Anezi. 1996. Effect of ascorbic acid and cooling during egg incubation on hatchability, culling, mortality, and the body weights of broiler chickens. *Poultry Science*, 75(10): 1204-1209.