T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ERKEN DÖNEMDE YUMURTAYA ENJEKTE EDİLEN FLUNİKSİN MEGLUMİN'İN EMBRİYOTOKSİK VE TERATOJENİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Murat ÖZNURLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Enver YAZAR

KONYA 2016

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde yakın ilgi, destek ve yardımlarını gördüğüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Emrah Sur'a, Doç. Dr. Yasemin Öznurlu'ya, Doç. Dr. Tuğba Özaydın'a ve Arş. Gör. Banu Kandil'e, Arş. Gör. İlknur Tekdemir'e, çalışmada kullanılan yumurtaların temin edilmesinde emeği geçen Veteriner Hekim Hakan Konya'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR iv

1. GİRİŞ 1

1.1. Fluniksin Meglumin 1

1.2.Embriyolu Tavuk Yumurtasının Embriyotoksisite Testlerinde Kullanımı 2

1.2.1. In Ovo Testlerde Enjeksiyon Bölgesi 4

1.2. 2. In Ovo Testlerde Enjeksiyon Zamanı 4

1.2.3. In Ovo Testlerde Test Solüsyonunun Hacmi 5

1.2.4. In Ovo Testlerde Etken Maddenin Dozu 5

1.2.5. In Ovo Testlerde Kullanılan Yumurta Sayıs 6

1.2.6. Açılan Embriyoların Değerlendirilmesi 6

1.3. Kanatlı Embriyoları ile Yapılan Embriyotoksisite ve Teratojenite Çalışmaları 7

2. GEREÇ VE YÖNTEM 11

2.1. Yumurta materyali 11

2.2. Fluniksin Meglumin 11

2.3. Yöntem 11

2.3.1. Fluniksin Meglumin'in Hazırlanması 11

2.3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Fluniksin Meglumin'in Yumurtalara Enjeksiyonu 11

2.3.3. Yumurtaların Açılması ve Doku Örneklerinin Alınması 12

2.3.4. İstatistiksel Analizler 15

3. BULGULAR 16

4. TARTIŞMA 25

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 33

6. KAYNAKLAR 34

7. EKLER 39

EK-A: Etik Kurul Onayı 39

8. ÖZGEÇMİŞ 40

SİMGELER VE KISALTMAR

ACV: Asiklovir

AFB_1: Aflatoksin B_1

CHEST: Tavuk Embriyotoksisite Belirleme Testi

CRL: Tepe-kıç mesafesi

EMEA: Avrupa İlaç Ajansı

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FM: Fluniksin Meglumin

HH: Hamburger ve Hamilton

HET : Tavuk Yumurtası Testi

HEST: Döllü Tavuk Yumurtası Belirleme Testi

HET-CAM: İrritant Etki için Tavuk Yumurtası Korioallantoik Membran Testi

HET-MN: Mikronukleus İndüksiyonu için Tavuk Yumurtası Testi

LEV: Levetirasetamın

PG: Prostaglandin

VPA: Valproik asit

ÖZET

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Erken Dönemde Yumurtaya Enjekte Edilen Fluniksin Meglumin'in Embriyotoksik ve Teratojenik Etkilerinin Belirlenmesi

Murat Öznurlu
Farmakoloji Ve Toksikoloji (Vet) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/ KONYA-2016

Bu çalışmada, yaygın olarak kullanılan güçlü anti-inflamatuar, analjezik ve antipiretik etkilere sahip olan fluniksin meglumin (FM)'in yumurtaya enjekte edilerek, embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada 300 adet kuluçkalık yumurta kullanıldı. Yumurtalar aşağıdaki gruplara ayrıldı: 1. Grup: Kontrol grubu, 2. Grup: 2.2 mg/kg FM grubu, 3. Grup: 5.5 mg/kg FM grubu ve 4. Grup: 11 mg/kg FM grubu. İnkübasyonun hemen öncesinde test solüsyonu hava kamarası yoluyla enjekte edildi. Embriyonik dönemin farklı günlerinde açılan yumurtalardan elde edilen embriyoların gelişme evreleri Hamburger-Hamilton skalasına göre tespit edilerek, embriyonik ölümlerin bu skalaya göre dağılımları belirlendi. Grupların ölü ve anormal embriyo sayıları, malformasyon tipleri, canlı ve nispî embriyo ağırlıkları ile embriyoların tepe-kıç boyları (Crown-Rump Length, CRL) belirlendi. Elde edilen sayısal veriler istatistiksel yöntemlerle analiz edildi.

FM verilen gruplarda mortalitelerin kontrol grubuna göre önemli derecede ($P<0.05$) yüksek olduğu tespit edildi. FM 'in yüksek doz gruplarında canlı ve rölatif embriyo ağırlıkları ile embriyoların CRL değerlerinin kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde azalma gösterdiği belirlendi ($P<0.05$). FM'in farklı doz gruplarında embriyonik gelişme geriliği ve farklı yapısal anomaliler gözlendi.

Sonuç olarak, kuluçka başlangıcında yumurtalara uygulanan farklı dozlarda FM embriyoların gelişimini olumsuz yönde etkileyebileceği ve iskelet sistemi bozuklukları ile çeşitli malformasyonlara neden olabileceği ifade edilebilir.

Anahtar Sözcükler: Embriyotoksisite; Fluniksin Meglumin; Tavuk Embriyosu

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Determination of embryotoxic and teratogenic effects of flunixin meglumine given early stage in ovo

Murat Öznurlu
Department of Pharmacology and Toxicology (Vet)

MASTER THESIS/KONYA-2016

The aim of this study was to determine embryotoxic and teratogenic effects of FM, a non-steroid anti-inflammatory drug used for analgesic and antipyretic, given early stage in ovo.

For this purpose, 300 eggs were used. The eggs were divided into the groups as follows: 1. Group: Control group, 2. Group: 2.2 mg/kg FM group, 3. Group: 5.5 mg/kg FM group and 4 Group: 11 mg/kg FM group. Test solutions were injected via air-sac just prior to the settlement of the eggs into the incubator. Eggs from each group were opened on various days of the incubation and developmental stages of embryos were determined according to the Hamburger-Hamilton scale. Numbers of dead embryos from each group were determined and mean embryonic mortalities of the groups were calculated. Dead and abnormal embryo numbers, malformation types, both live and relative embryo weights and crown-rump lengths (CRL) were determined. Data was analysed by using statistical methods.

The mortality in the treated FM groups was found to be significantly ($<P<0.05$) higher than control. The live and relative embryo weights and embryo CRL values of the FM groups were significantly lower than that of the control group ($<P<0.05$). In the treated FM groups showed embryonic growth retardation and various structural abnormalities.

As a result, it may be stated that in ovo administrated FM adversely affects the embryonic development, and consequently, causes the skeletal system disorders and various malformations.

Key Words: Chick embryo; Embryotoxicity; Flunixine Meglumine

1. GİRİŞ

İlaçlar, gıda katkı maddeleri, endüstriyel bileşikler, ağır metaller, mikotoksinler ve pestisitlerin embriyotoksik, teratojenik, mutajenik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan testlerde kanatlı embriyoları sıklıkla tercih edilen materyallerden biridir. Tavuk embriyosunun gelişim safhalarının çok iyi bilinmesi, çok sayıda tavuk embriyosunun kullanılabilmesi, toksisitenin istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde memeli türlerle yapılacak çalışmalara karşı bir avantaj sağlaması nedeniyle döllü tavuk yumurtası prenetal toksisitenin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Tavuk embriyoları üzerinde yapılan embriyotoksisite çalışmasıyla (CHEST), farklı maddelerin emriyotoksik doz sınırlarıyla oluşturdukları teratojenik etkiler hakkında, hem kalitatif hem de kantitatif veriler elde edilmektedir.

Fluniksin meglumin (FM) güçlü anti-inflamatuar, analjezik ve antipiretik etkilere sahiptir, ancak steroid ve narkotik özelliklerde olmayan bir bileşiktir. FM veteriner sahada sıklıkla kullanılan bir ilaçtır. FM'nin gebe hayvanlarda kullanımı ile ilgili herhangi bir çalışma olmaması, kanatlı embriyosu ile yapılacak embriyotoksisisite testi ile elde edilecek sonuçların memelilere de uyarlanabilmesi açısından son derece önemlidir.

1.1. Fluniksin Meglumin

Fluniksin meglumin (FM, 3 pridin karboksilik asit) kuvvetli anti-inflamatuvar, analjezik, antipiretik ve antiprostaglandin etkilere sahip olan; buna karşın steroid ve narkotik özelliklerde olmayan bir bileşiktir (Traş ve ark 1995, Lee ve Maxwell 2014). FM, araşidonik asitin prostaglandin (PG)'e dönüşümünü katalizleyen siklooksijenaz enzimi inhibe ederek etkisini gösterir. Prostaglandinler dokularda normal olarak bulunan kimyasal maddelerdir, ancak yangısal olaylarda seviyeleri artar ve organizmada istenmeyen durumlar (yangı, ateş, ağrı vs) ortaya çıkar. FM yangının belli başlı belirtilerinin ortaya çıkmasından sorumlu prostaglandinlerin sentezini baskılar. Böylece ağrı, yangı ve ateş semptomlarını azaltır veya tamamen yok eder (Traş ve ark 1995, Königsson ve ark 2003).

FM, FDA (U.S. Food and Drug Administration, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) ve EMEA (European Medicines Agency, Avrupa İlaç Ajansı) tarafından at, sığır, domuz, köpek ve kedide kullanımı tavsiye edilmiştir (Booth ve McDonald

1988, Traş ve ark 1995, EMEA 2000). FM hayvanlarda osteoartritis, intervertebral disk sendromu, spondylosis, musko-skeletal ve viseral ağrılar, endotoksik şok, gastrointestinal kanal kolikleri, intraoküler operasyonlardan sonra, romatoid artrit, tendinitis, tendosinovitis, fibromiyozis, belağrısı, travmatik sinovitis, laminitis, koliform mikroorganizmaların neden olduğu mastitis, sinovyal sıvının vizkozitesini azaltmak ve katarak gelişimini önlemek gibi birçok amaç için kullanılabilmektedir (Kelly 1988, Lees ve Higgins 1984, Traş ve ark 1995, EMEA 2000). FM hayvanlarda (at, sığır, köpek, kedi, tavşan, hamster, kobay, gerbil, şinşilla, rat) genel olarak 1.1-2.2 mg/kg (SID, IM, IV) dozunda kullanılmaktadır (Yazar 2010, Traş ve Elmas 2012). Kas içi, damar içi uygulamalarında plazma yarılanma ömrü 1,6 saat olarak bulunmuş, plazmada 8 saat, idrarda 48 saat süreyle ölçülebilmiştir. Vücuttan ağırlıklı olarak idrarla (%14 kadarı), az olarak da gaita ile atılmaktadır (Lee ve Maxwell 2013).

1.2. Embriyolu Tavuk Yumurtasının Embriyotoksisite Testlerinde Kullanımı

İlaçlar, gıda katkı maddeleri, endüstriyel bileşikler, ağır metaller, mikotoksinler ve pestisitlerin embriyotoksik, teratojenik, mutajenik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan testlerde kanatlı embriyoları sıklıkla tercih edilen materyallerden biridir. Prenatal toksisitenin belirlenmesinde basit, hızlı ve ucuz testler geliştirilmeye çalışılmıştır. Jelinek ve ark (1985) kısa süreli bir embriyotoksisite testi için bazı özelliklerin olması gerektiğini vurgulamışlardır.

- Kullanılacak olan nesne, epigenetik doku etkileşimleri olan morfogenetik bir sistem olmalıdır.
- Test kabul edilebilir embriyotoksik güç ölçümlerini sağlayabilmeli, kantitatif sonuçlar elde edilebilmeli ve pozitif doz-yanıt ilişkisini ortaya koyabilmelidir.
- İkinci sınıf teratojenlerin metabolik aktivasyonlarını belirleyebilmelidir.

İn vitro sistemlerden tavuk embriyosu gibi *in ovo* sistemlere geçince ilk iki prensip elde edilmiş olmakla beraber üçüncüsü sınırlı kalmıştır. Buna rağmen teratolojik testlerde bu metoda karşı bir takım itirazlar gelmeye başlamıştır. Memelilerdeki maternal-fötal ilişkinin olmayışı, tavuk yumurtasının doğasında var olan farklılıkların neden olduğu farmakokinetik ayrılıklar ve yüksek oranda non-

spesifik duyarlılıktan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçların olabilmesi, söz konusu itirazların başında gelmektedir. Ancak yinede bu teknik, basit laboratuvar şartlarında, çok fazla beceri gerektirmeyen uygulamalarla, zamandan ve paradan tasarruf sağlaması sayesinde gelişmiştir. Embriyolu tavuk yumurtası kullanılarak gerçekleştirilen bu testin sonuçları memelilere de uygulanabilmektedir. Çünkü embriyotoksisite çalışmasıyla (Chicken Embryotoxicity Screening Test, CHEST) belirlenen toksik dozun sulandırma konsantrasyonunun 10^{-2} ile çarpılmasıyla elde edilen değer, gebe memelilerde annenin canlı ağırlığının kg başına alması gereken toksik doz olarak kabul edilmektedir (Jelinek 1977). CHEST kolay, ucuz, tekrarlanabilir sonuçlar vermekte ve kısa sürede gerçekleştirilebilmektedir. Aynı zamanda memelilerdeki toksikolojik çalışmalarda kullanılacak olan denek sayısı ile deneme sayısını azaltmakta; canlı bir organizmaya verilebilecek ağrı ve acıyı da en aza indirgeyerek, etik kurallara ve yasal kısıtlamalar ile Hayvan Haklarını Koruma Kanununa da aykırı düşmemektedir (Jelinek ve ark. 1985, Vesely ve Vesela 1995). Her ne kadar CHEST'in sonuçlarının memelilere ve özellikle insana uygulanmasında tür farklılığı karşımıza çıkarsa da, bütün türlerde morfogenetik olaylar ve bunların seyri ortaktır. Diğer embriyotoksisite testlerinde de insan harici memeliler kullanılmaktadır (Jelinek 1977).

Tavuk embriyoları üzerinde yapılan embriyotoksisite çalışmasıyla (CHEST), farklı maddelerin emriyotoksik doz sınırlarıyla oluşturdukları teratojenik etkiler hakkında, hem kalitatif hem de kantitatif veriler elde edilmektedir (Jelinek ve ark 1985, Kemper ve Luepke 1986). Eğer toksikolojik doz sınırlarının belirlenmesi amaçlanıyorsa, çok erken embriyonik dönemdeki enjeksiyonlar tercih edilmekte; eğer teratolojik etki tipleri belirlenecekse, karaciğer ve böbreklerin gelişmelerini tamamladıkları daha geç dönemler tercih edilmektedir (Kemper ve Luepke 1986). Bu nedenle, Jelinek ve ark (1985) iki aşamalı tavuk embriyotoksisite testi (CHEST I ve II) geliştirmişlerdir. Bu testin ilk bölümünde (CHEST-I), söz konusu maddenin metabolize olmamış haldeki embriyotoksik doz sınırları, o maddenin geometrik dizi halinde hazırlanan konsantrasyonları, erken dönemde döllü yumurtalara verilmek suretiyle belirlenmektedir. CHEST-II'de ise CHEST-I ile embriyotoksik doz sınırları saptanan bir maddenin teratojenik etkileri belirlenmektedir ve bu ikinci test CHEST-I'i tamamlamaktadır. Embriyotoksik parametre olarak embriyotoksisite ranjının başlaması, doz-yanıt ve safha-yanıt arasındaki ilişkiler, ölüm oranı, gelişme geriliği

ile yaşayan embriyolarda ortaya çıkan malformasyonlar değerlendirilmiştir.

CHEST'in yanı sıra döllü tavuk yumurtası kullanılarak çeşitli modifikasyonlarla, Kemper ve Luepke (1986) Tavuk Yumurtası Testini (Hen's Eggs Test, HET), Nishigori ve ark. (1992) Döllü Tavuk Yumurtası Belirleme Testini (Hen's Fertile Egg Screening Test, HEST), Wolf ve Luepke (1997) ise Mikronukleus İndüksiyonu için Tavuk Yumurtası Testini (Hen's Egg Test for Micronucleus Induction, HET-MN) geliştirmişlerdir. Bütün bu testler kolay, ucuz, tekrarlanabilir sonuçlar vermekte ve kısa sürede gerçekleştirilebilmektedir.

1.2.1. In Ovo Testlerde Enjeksiyon Bölgesi

In ovo embriyotoksisite çalışmalarında, test edilecek maddelerin yumurtaya verilme yollarının güvenilirliği üzerinde farklı görüşler bulunmaktadır. Enjeksiyon bölgesi olarak hava kamarasına (Stoloff ve ark. 1972, Kemper ve Leupke 1986, Çelik ve ark 2000, Sur ve Çelik 2003, Öznurlu ve ark 2012), embriyonun kaudal bölgesine, albümine 45^0'lik açı ile ya da ekvator bölgesinden (Prelusky ve ark 1987), yumurta sarısına (Verret ve ark 1964) ve koryo-allantoik membrana (Pal ve ark 2005) enjeksiyon yöntemleri uygulanmaktadır.

1.2. 2. In Ovo Testlerde Enjeksiyon Zamanı

Enjeksiyon zamanı için test edilecek maddenin doğal (intact, native) formunun embriyotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanıyorsa çok erken embriyonik dönem, test edilen maddenin karaciğerde metabolize edilmesi sonucu oluşacak metabolitlerinin etkilerinin belirlenmesi amaçlanıyorsa daha geç dönemde yapılacak enjeksiyonun tercih edilmesi gerektiği bildirilmiştir (Jelinek ve ark 1985, Prelusky ve ark 1987). Kucera ve Burmond (1987) kanatlı embriyosunun, insan embriyosunun fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı en duyarlı olduğu 2-5. haftalar arasına karşılık gelen ilk 3 günlük periyodunun toksisite çalışmaları için uygun bir dönem olacağını bildirirlerken, Jelinek ve ark (1985) ile Prelusky ve ark (1987) ise test edilen maddenin karaciğerde metabolize edilmesi sonucu oluşacak metabolitlerinin etkilerinin de belirlenmesinin amaçlandığı durumlarda daha geç dönemlerdeki embriyoların kullanılması gerektiğine dikkati çekmektedirler. Özcan (1992) gıda katkı maddeleri ve pestisitlerin teratojenik etkilerini belirlemek için kuluçka başlangıcında hava kamarasına veya yumurta sarısına enjeksiyonu, ilaçların

teratojenik etkilerini belirlemek için ise kuluçkanın 3. ve 4. gününde enjeksiyon yapılması gerektiğini vurgulamıştır. Tavuk embriyosunda karaciğer farklılaşması embriyonik dönemin 4. gününde şekillenmekte ve karaciğer bu günden itibaren fonksiyonel bir organ olarak detoksifikasyon mekanizmaları devreye girmektedir (Hamilton ve ark 1983). Wolf ve Leupke (1997), kanatlılarda karaciğerin erken farklılaşmasına bağlı olarak, memeli embriyosunun aksine kanatlı embriyosunun gelişiminin erken evrelerinde de yoğun bir metabolik aktivasyon bulunduğunu vurgulamış, promutajenler ile yaptıkları genotoksisite çalışmalarında enjeksiyonları kuluçkanın 8. gününde gerçekleştirmişlerdir.

1.2.3. In Ovo Testlerde Test Solüsyonunun Hacmi

Enjekte edilecek solüsyon için farklı çalışmalarda 3-100 µL/yumurta arasında değişen solüsyon hacimleri kullanılmaktadır. Döllü tavuk yumurtalarına test solüsyonlarını hava kamarası yoluyla Wyttenbach ve Thompson (1985) kuluçkanın 24., 48. ve 72. saatlerinde 50 µL hacminde, Varga ve ark (2002) kuluçka başlangıcında ve kuluçkanın 12. gününde 100 µL hacminde, Varga ve ark (1999), Varnagy (1999), Varnagy ve ark (2001), Budai ve ark (2001, 2002) ve Fejes ve ark (2002) kuluçkanın 12. gününde 100 µL hacminde gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca Wolf ve ark (2002) kuluçkanın 8. gününde hava kamarası ile enjeksiyon yönteminde hidrofilik karakterdeki test maddesi için 100 µL solüsyon hacmini, hidrofobik karakterdeki test maddesi için ise 50 µL solüsyon hacmini kullanmışlardır. Sonuç olarak mekanik hasarların daha az etkili olduğu kuluçkanın ilerleyen günlerinde çok daha yüksek solüsyon hacimleri tercih edilmiştir.

1.2.4. In Ovo Testlerde Etken Maddenin Dozu

Bir maddenin embriyotoksisitesinin belirlenmesi amacıyla yapılacak olan çalışmalarda test edilecek maddenin farklı dozları denenmelidir. Verret ve ark (1964) en az 2 farklı doz uygularken, Brown ve ark (1986) en az 3 farklı dozun denenmesi gerektiğine işaret etmektedirler. Jelinek (1977) ise etkili dozun belirlenmesinde etkisiz en yüksek doz ile etkili en düşük doz arasındaki dozların denenmesi gerektiğini ileri sürmektedir.

1.2.5. In Ovo Testlerde Kullanılan Yumurta Sayısı

Jelinek ve ark (1985) tavuk yumurtası ile yaptıkları embriyotoksisite çalışmalarında her grup için 6-10 yumurta kullanırken, Kemper ve Luepke (1986) ve Prelusky ve ark (1987) sonuçların güvenirliği açısından her grup için en az 20 adet yumurta kullanılmasını önermişlerdir. Çelik ve ark (2000) 56, Jelinek ve ark (1985) 120, Kucera ve Burnand (1987) 150, Sur ve Çelik (2003) 80-120 ve Öznurlu ve ark (2012) ise 45-150 arasında yumurta kullanmışlardır.

1.2.6. Açılan Embriyoların Değerlendirilmesi

Canlı ve ölü embriyoların gelişme evrelerinin belirlenmesinde Hamburger ve Hamilton (1951) skalası (HH skalası) esas alınmaktadır. Tavuk embriyosunun gelişme evreleri kuluçka günlerine göre aşağıdaki gibi belirtilmiştir (Hamburger ve Hamilton 1951);

Evre 1 (Sulkus Primitivus Öncesi Evre): 0-6. saatler
Evre 2 (Baslangıç Sulkus Primitivus Evresi): 6-7. saatler
Evre 3 (Ara Sulkus Primitivus Evresi): 12-13. saatler
Evre 4 (Belirgin Sulkus Primitivus Evresi): 18-19. saatler
Evre 5 (Bas Çıkıntısının Gelistigi Evre): 19-22. saatler
Evre 6 (Bas Kıvrımının Olustugu Evre): 23-25. saatler
Evre 7 (Bir Somitli Evre): 23-26. saatler
Evre 8 (Dört Somitli Evre): 26-29. saatler
Evre 9 (Yedi Somitli Evre): 29-33. saatler
Evre 10 (On Somitli Evre): 33-38. saatler
Evre 11 (On üç Somitli Evre): 40-45. saatler
Evre 12 (On altı Somitli Evre): 45-49. saatler
Evre 13 (On dokuz Somitli Evre): 48-52. saatler
Evre 14 (Yirmi iki Somitli Evre): 50-53. saatler
Evre 15: 50-55. saatler
Evre 16: 51-56. saatler
Evre 17: 52-64. saatler
Evre 18: 65-69. saatler
Evre 19: 68-72. saatler

Evre 20: 70-72. saatler

Evre 21: Ortalama 3½ gün

Evre 22: 3 ½ gün

Evre 23: 3½-4. günler

Evre 24: 4. gün

Evre 25: 4½ gün

Evre 26: 4½-5. günler

Evre 27: 5. gün

Evre 28: 5½ gün

Evre 29: 6. gün

Evre 30: 6½ gün

Evre 31: 7. gün

Evre 32: 7½ gün

Evre 33: 7½-8. günler

Evre 34: 8. gün

Evre 35: 8. ve 9. günler

Evre 39: 13. gün

Evre 40: 14. gün

Evre 41: 15. gün

Evre 42: 16. gün

Evre 43: 17. gün

Evre 44: 18. gün

Evre 45: 19-20. günler

Evre 46: 20-21. günler

1.3. Kanatlı Embriyoları ile Yapılan Embriyotoksisite ve Teratojenite Çalışmaları

Kanatlı embriyoları kullanılarak çeşitli mikotoksinlerin (Cilievici ve ark 1980, Vesely ve ark 1982, Prelusky ve ark 1987, Vesely ve Vesela 1995, Çelik ve ark 2000, Henry ve Wyatt 2001, Sur ve Çelik 2003, Öznurlu ve ark 2012), metaller ve alaşımlarının (Mas ve Arola 1985, Gilani ve Alibhai 1990, Kaya ve ark 1995, Yılmaz 1997, Durmuş ve ark 2005), ilaçların (Heinrich-Hirsch ve Neubert 1991, Peterka ve ark 1992, Nishigori ve ark 1992, Julian ve Abbott 1998), herbisitlerin

(Ahmed ve ark 1988, Varnagy ve ark 2002), fungusitlerin (Maci ve Arias 1987), endüstriyel bileşiklerin (Elovaara ve ark 1979, Korhonen ve ark. 1982; 1983, Chibber ve Gilani 1986, Özcan 1992), çözücülerin (Ameenuddin ve Sunde 1984, Özparlak ve ark 2008) ve diğer bazı bileşiklerin (Kury ve Craig 1967, Verret ve ark 1980, Jelinek ve ark 1985, Harold ve ark 1987, Brunström ve ark 1990, Becker ve Shipley 1998, Zhang ve ark 2002) embriyotoksik ve teratojenik etkileri ile ilgili yapılmış çok sayıda araştırma mevcuttur.

Organik fosforlu insektisit olan metathion, teratojenik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, söz konusu maddenin iki farklı dozu eşit ağırlığa sahip döllü tavuk yumurtalarının sarısına kuluçkanın 2. günü steril şartlarda enjekte edilmiştir. İnkübasyonun 14., 18. ve 21. günlerinde iskelet sisteminde meydana gelen anomaliler incelenmiş, papağan tipi gaga, bacaklarda kısalma ve kalınlaşma, ağırlık kaybı, total ve kısmi ödem ile tüylenmede bozukluklar tespit edilmiştir (Rashev ve Vasilev 1982).

Yine bir organik fosforlu insektisit olan %50 metilparationun test edildiği bir başka çalışmada ise etken madde metylparathion iki farklı dozda kuluçkanın 12. gününde döllü tavuk ve sülün yumurtalarına hava kamarası yoluyla enjekte edilmiş ve bu maddenin vücut ağırlığında önemli oranda azalmaya, gelişim geriliklerine ve yüksek doz grubunda da embriyonik ölümlere sebep olduğu saptanmıştır (Varnagy ve Deli 1985).

Garrison ve Wyttenbach (1985)'un organik fosforlu bir insektisit olan dikrotophosun notokord gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları bir çalışmada da etken madde farklı dozlarda döllü tavuk yumurtalarına kuluçkanın 8. saatinden itibaren 96. saatine kadar belli aralıklarla enjekte edilmiş ve kuluçkaya 48 saat daha devam edilmiştir. Özellikle 48. saatteki dikrotophos enjeksiyonunun notokortda boyun bölgesinde şiddetli katlanmaya sebep olduğu görülmüştür.

Organik klorlu insektisitler p,p`-DDT ve o,p`-DDT farklı dozlarda kuluçkanın 1. gününde döllü bıldırcın yumurtalarında albümin içine enjekte edilmiş, yumurtadan çıkma oranı ve yumurtadan çıkan civcivler üzerinde bu insektisitlerin uzun süreli etkileri incelenmiştir. Söz konusu DDT izomerlerinin yumurtadan çıkıştan sonraki 5

hafta içinde canlılık oranını, üreme davranışlarını ve yumurtlama sayısını azalttığı, yumurta kabuğu bozukluklarını artırdığı ve tüy morfolojisini etkilediği gözlenmiştir (Bryan ve ark 1989).

Kitin sentez inhibitörü flufenoksuron kuluçkanın 48. saatinde döllü tavuk yumurtalarına enjekte edilmiş, farklı günlerde açılan embriyolarda vücut ağırlığının ve uzunluğunun önemli düzeyde azaldığı ve teratojenik etkiye işaret eden göz ve boyun anormallikleri gözlendiği bildirilmiştir (El-Sayyad ve ark 1996).

Bir başka organik fosforlu bir insektisit olan dimekron iki doz şeklinde kuluçka başlangıcında döllü tavuk yumurtalarının sarısına uygulanmıştır. İnsektisit ile muamele edilen embriyolarda büyümede gerileme ve organ oluşumunda önemli anormallikler, ayrıca karaciğer ve böbrekte her iki dozda da önemli histopatolojik değişiklikler gözlenmiştir (Sahu ve Ghatak 2002).

Özparlak ve Ünsal (2006) fipronilin saf ve ticari formülasyonlarının tavuk yumurtası testiyle LD50 tayini ve embriyotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada, hem saf hem de ticari fipronilin tavuk embriyoları üzerinde önemli embriyotoksik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Cilievici ve ark (1980) tavuk embriyosu gelişiminde aflatoksin B_1'in toksik ve teratojenik etkilerine baktıkları çalışmada, yüksek doz AFB_1'in uygulandığı gruplarda çok sayıda malformasyon ve iskelet sistemi gelişiminde gerilemelerin olduğu bildirilmiştir.

Vesely ve Vesela (1995) yaptıkları çalışmada 3 günlük inkübasyondan sonra zearalenon ve vomitoksin ile her ikisinin kombinasyonunu farklı dozlarda amniyon sıvısına enjekte etmişler, zearalenonun tek başına teratojenik etkisinin olmadığını, vomitoksinin kalpte defektlere neden olduğunu ve ikili kombinasyonun embriyotoksik etkilerinin olduğu ve özellikle kalbin interventriküler septumunda defektlere sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Çelik ve ark (2000) farklı dozlarda AF ve AFB_1 enjekte ettikleri yumurtalarda gelişen embriyolarda, diskus embriyonalisin area pellucidasının dışa doğru fıtıklaşmasıyla karakterize bir anomali tespit etmişlerdir. Bu bulgulara dayanarak araştırıcılar AFB_1 molekülünün, embriyonik hücrelerin diferensiyasyonunu bozmak

suretiyle söz konusu anomaliye neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Sur ve Çelik (2003) in ovo olarak farklı dozlarda enjekte ettikleri AFB_1'in yüksek doz gruplarında erken embriyonik ölümlere neden olduğunu ve immunsupresif etkilerinin olduğunu tespit ederlerken, Öznurlu ve ark (2012)'da yaptıkları benzer bir çalışmada kuluçkanın başlangıcında hava kamarasına enjekte ettikleri farklı dozlardaki AFB_1'in iskelet sistemi üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Araştırıcılar, verilen doza bağlı olarak embriyolarda gelişme geriliğinin olduğunu ve iskelet sisteminin gelişiminde anormalitelere rastlandığını bildirmektedirler.

Hassan ve ark (2012) in ovo olarak farklı dozlarda okratoksin A'yı (OTA) hava kamarasına enjekte etmişler, yüksek doz gruplarında teratojenik defektlerin ve embriyonik mortalitenin yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Günaydın ve ark (2001), yaşları 1-3 gün arasında değişen meningomyeloselli 6 yenidoğan ile bunların annelerinden aseptik şartlarda aldıkları serumu döllü tavuk yumurtalarına inkübasyondan hemen önce hava kamarası yoluyla enjekte etmişler, deney serumuna maruz bırakılan tavuk embriyolarında kontrol grubuna kıyasla embriyo ölümü ve büyük anomali (nöral tüp, gastrointestinal sistem anomalileri, göğüs defektleri ile kas iskelet sistemi defekti ve anoftalmus) sıklığının arttığını gözlemlemişlerdir.

Bu çalışmada, yaygın olarak kullanılan güçlü anti-inflamatuar, analjezik ve antipiretik etkilere sahip olan FM'in kuluçka başlangıcında yumurtaya enjekte edilerek, tavuk embriyosunun gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. FM'in neden olduğu embriyonik ölüm oranları ve oluşan yapısal kusurlarla, rölatif embriyo ağırlıkları üzerindeki etkilerinin belirlenmesi de amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Yumurta materyali

Çalışmada yumurtacı anaçlardan elde edilen 300 adet kuluçkalık yumurta kullanıldı. Yumurtalar tartılarak kuluçka başlangıç ağırlıkları kaydedildi.

2.2. Fluniksin Meglumin

FM (Finadyne® Enj. Çöz., İntervet Veteriner İlaçları, İstanbul, Türkiye) kuluçka başlangıcında hava kamarasına üç farklı dozda enjekte edildi.

2.3. Yöntem

2.3.1. Fluniksin Meglumin'in Hazırlanması

FM hayvanlarda (at, sığır, köpek, kedi, tavşan, hamster, kobay, gerbil, şinşilla, rat) genel olarak 1.1-2.2 mg/kg (SID, IM, IV) dozunda kullanılmaktadır (Yazar 2010, Traş ve Elmas 2012). Araştırmada FM 2.2, 5.5 ve 11 mg/kg dozunda ortalama 55-60 gram döllü yumurtaya distile su içinde 50 µL'lik bir hacimde enjekte edildi.

2.3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Fluniksin Meglumin'in Yumurtalara Enjeksiyonu

Yumurtalar enjeksiyondan önce tartıldı ve kapalı bir kabinde 21 g potasyum permanganat + 42 mL formaldehit/m^3 karışımıyla elde edilen buharla 15 dakika dezenfekte edildi. Dezenfekte olan yumurtalar 4 gruba ayrıldı. Kuluçka başlangıcında, hava kamarasına üç farklı dozda FM solüsyonu 50 µL çözücü içinde enjekte edildi. Dozlar belirlenirken herbir yumurtanın 55-60 g ağırlığında bir canlı olduğu kabul edildi.

Grup I (Kontrol): Bu gruptaki yumurtalara (35 adet) hiçbir işlem uygulanmadı.
Grup II (F1): Bu gruptaki yumurtalara (75 adet) hava kamarası yoluyla FM 2.2 mg/kg dozunda enjekte edildi.
Grup III (F2): Bu gruptaki yumurtalara (90 adet) hava kamarası yoluyla FM 5.5 mg/kg dozunda enjekte edildi.
Grup IV (F3): Bu gruptaki yumurtalara (100 adet) hava kamarası yoluyla FM 11

mg/kg dozunda enjekte edildi.

Enjeksiyonlar Prelusky ve ark (1987) ile Çelik ve ark (2000)'nın bildirdikleri yönteme göre hava kamarası yoluyla yapıldı. Bu amaçla steril uçlu özel mikropipet (Sealpette, Jencons) kullanıldı. Yumurtanın küt ucunun dezenfeksiyonunu takiben özel yumurta delicisi ile açılan delikten girilerek 50 µL'lik test solüsyonu hava kamarasına enjekte edildi ve delik derhal sıvı parafinle kapatıldı (Şekil 2.1.). Bu işlemlerden sonra yumurtalar Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalındaki kuluçka makinesinde (VGS, 108 Kap) optimal koşullarda (37.8°C sıcaklık ve % 65 nispi nem) kuluçka işlemine tabi tutuldu.



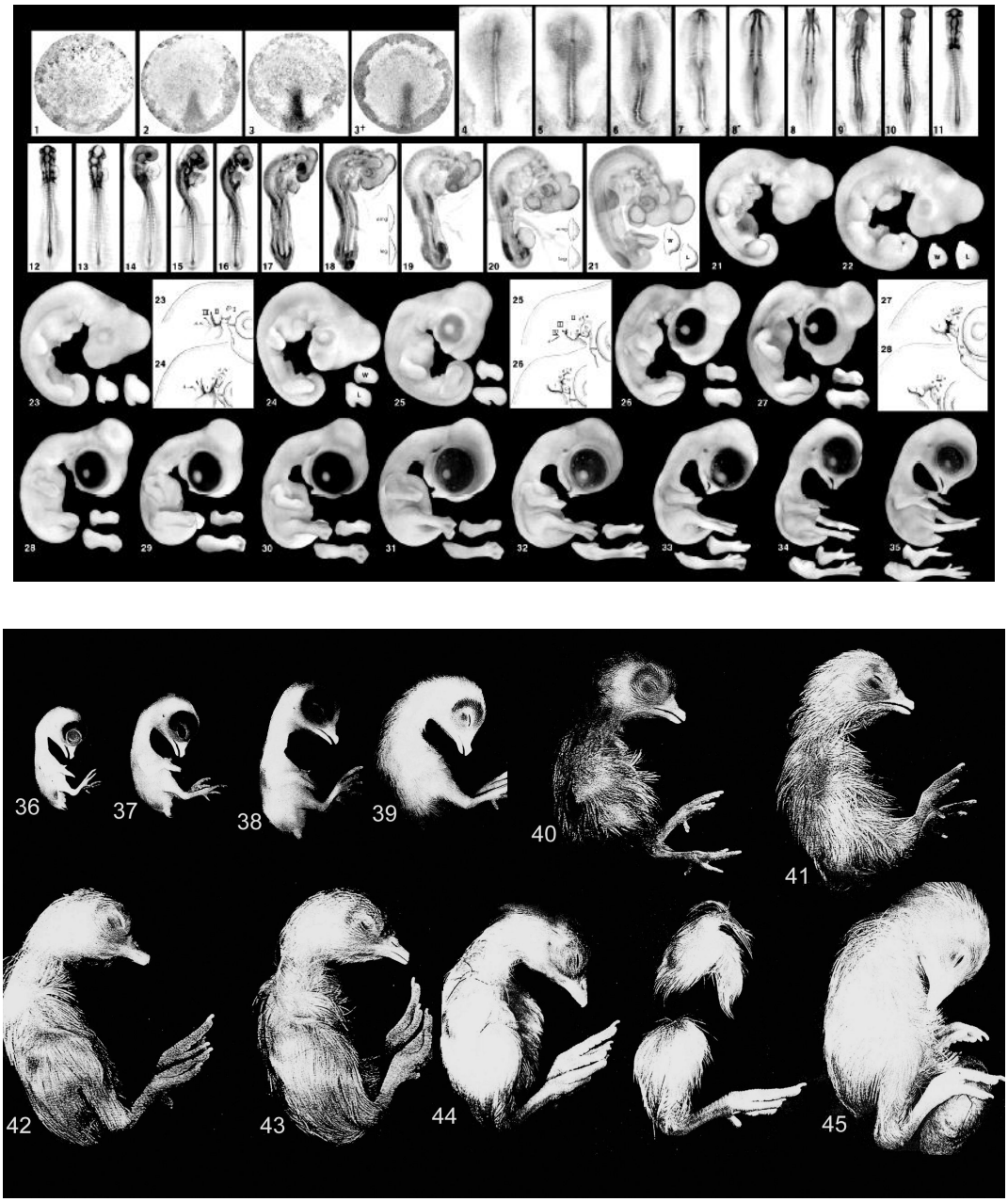
Şekil 2.1. Yumurtalara FM solüsyonlarının enjeksiyonu.

2.3.3. Yumurtaların Açılması Ve Doku Örneklerinin Alınması

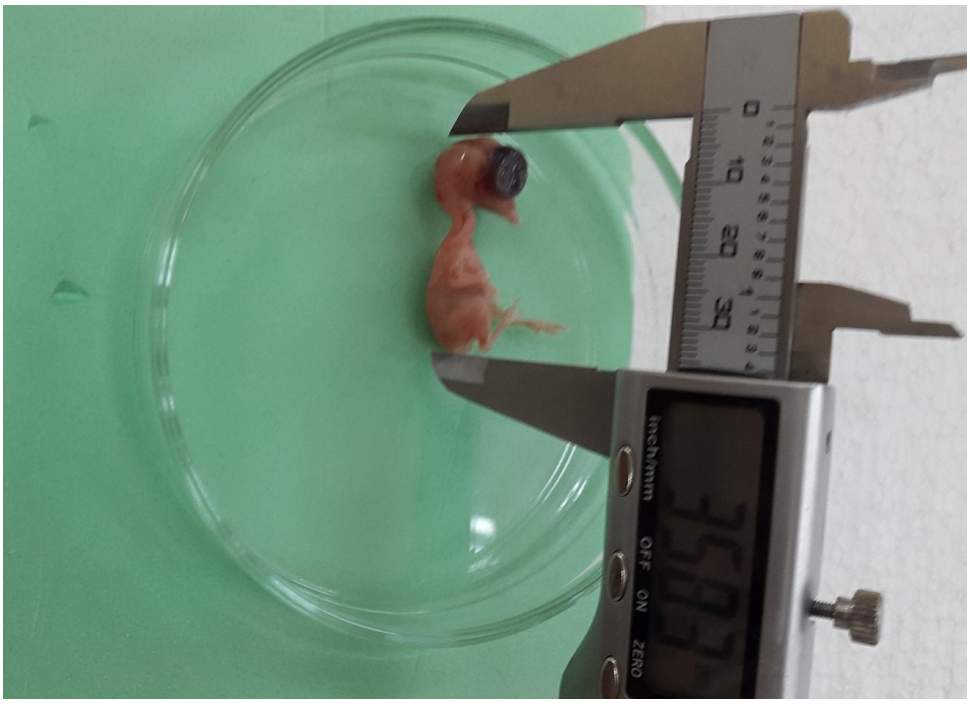
Bu amaçla kuluçkanın 7, 11, 15, 18 ve 21. günlerinde (çıkış günü), her gruptan rastgele seçilen 5'er adet yumurta açıldı. Hamburger Hamilton (1951) Skalası esas alınarak embriyoların gelişme evreleri belirlendi (Şekil 2.2.) ve takiben embriyoların tümü hassas terazi ile tartıldı. Embriyoların tepe-kıç mesafeleri (Crown-Rump Length, CRL) dijital bir kumpasla ölçüldü (Şekil 2.3.). Nispî embriyo ağırlıkları aşağıdaki formülle hesaplandı;

Nispî embriyo ağırlığı = (Embriyo ağırlığı/ Yumurtanın son ağırlığı) x100

Malformasyonlar ve gelişme geriliklerinin tespiti için %10'luk nötr formalinde 4°C'de saklanan canlı ve ölü embriyolarda hemoraji, ödem, anormal gaga oluşumu (wry beak), kanat ve bacakların gelişmemesi (micromelia), iç organların ters dönüp dışarıda oluşu (everted viscera), tek göz anormalliği (unilateral microphthalmus veya unilateral anophthalmus), çift göz anormalliği (bilateral microphthalmia veya bilateral anophthalmia), boyun defektleri (wry neck), kalça defektleri (rumplessness), beynin dışarıda gelişimi (exencephaly), tüylenmede anormallik, parmaklarda kıvrılma ve bükülmeler (curled toe) gibi çeşitli malformasyonların bulunup bulunmadığı çıplak göz ve stereo mikroskop yardımıyla incelenerek belirlendi. Genel gelişme geriliği ise sadece canlı embriyolarda dikkate alındı. Gerekli görülen embriyolar yakın çekim ile fotoğraflandı.



Şekil 2.2. Hamburger ve Hamilton (1951) skalasına (HH skalası) göre tavuk embriyosunun gelişim evreleri.



Şekil 2.3. Embriyoların CRL değerlerinin dijital bir kumpasla ölçülmesi.

2.3.4. İstatistiksel Analizler

Grupların embriyonik mortalitelerinin hesaplanmasında gruplardaki fertil yumurta sayıları esas alındı. Embriyonik mortalite verilerinin değerlendirilmesinde ki-kare testi uygulanırken, rölatif embriyo ve civciv ağırlığı ile tepe kıç mesafelerinin değerlendirilmesinde One -Way Anova ve Tukey testi kullanıldı. İstatistiksel testler uygulanırken SPSS (9.0.0 versiyonu) paket programı ve MİNİTAB (11.0 versiyonu) programından faydalanıldı. $P<0.05$ değeri istatistiki açıdan önem sınırı kabul edildi.

3. BULGULAR

Çalışmada tespit edilen infertilite ve mortalite değerleri Çizelge 3.1'de verildi. Çalışmada kullanılan 300 adet yumurtanın 282 adedi fertil olup, ortalama infertilite oranı %6 olarak hesaplandı. Kontrol grubunda mortalite %6.06 iken, 2.2 mg/kg FM enjekte edilen grupta %29.5; 5.5 mg/kg FM enjekte edilen grupta %25.88, 11 mg/kg FM enjekte edilen grupta ise %23.65 olarak bulundu. FM verilen gruplarda mortalitelerin kontrol grubuna göre önemli derecede ($P<0.05$) yüksek olduğu tespit edildi.

Çizelge 3.1. Grupların yumurta sayıları, ölü embriyo sayıları, infertil yumurta sayıları ve infertilite hariç mortalite değerleri (%).

Gruplar N=5	**Kullanılan yumurta sayısı**	**Ölü embriyo sayısı**	**İnfertil Yumurta sayısı**	**Mortalite**
Kontrol	35	2^{b}	2	$6,06^{b}$
F1-(2,2 mg)	75	21^{a}	4	$29,5^{a}$
F2-(5,5 mg)	90	22^{a}	5	$25,88^{a}$
F3-(11 mg)	100	22^{a}	7	23.65^{a}

$^{a, b}$: Aynı sütündaki farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir ($p<0.05$).

Kontrol grubunda embriyonik gelişim Hamburger-Hamilton (1951) (H-H) skalasına uygun bir seyir izledi. FM'in farklı doz gruplarında doza bağlı olarak artan oranlarda embriyonik gelişme geriliği ve farklı yapısal anomaliler ortaya çıktığı gözlendi (Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3). Bu anomali tipleri arasında genel gelişme geriliği yanında makas gaga ve ünilateral anoftalmi ile exencephaly, çift gaga ve parmaklarda kıvrılma ve bükülmeler en sık rastlanan anomali tipleriydi (Şekil 3.4, 3.5, 3.6 ve 3.7). Özellikle 21. günde F2 ve F3 grubundaki hayvanlarda parmaklardaki kıvrılma ve bükülmelere bağlı olarak hayvanların ayağa kalkamaması dikkat çekiciydi (Şekil 3.8, 3.9).



Şekil 3.1. Kuluçkanın yedinci (A) ve onbirinci gününde (B) kontrol ve 11 mg/kg FM (F_3) grubuna ait embriyolar görülmektedir. FM verilen embriyodaki gelişme geriliği oldukça belirgindir.



Şekil 3.2. Kuluçkanın onbeşinci gününde kontrol ve 11 mg/kg FM (F_3) grubuna ait embriyolar görülmektedir. FM verilen embriyodaki gelişme geriliği oldukça belirgindir.



Şekil 3.3. Kuluçkanın onsekizinci gününde kontrol ve 11 mg/kg FM (F_3) grubuna ait embriyolar görülmektedir. FM verilen embriyodaki gelişme geriliği oldukça belirgindir.



Şekil 3.4. 11 mg/kg FM (F_3) grubuna ait onbir günlük bir embriyoda karın duvarının kapanmadığı görülmektedir.



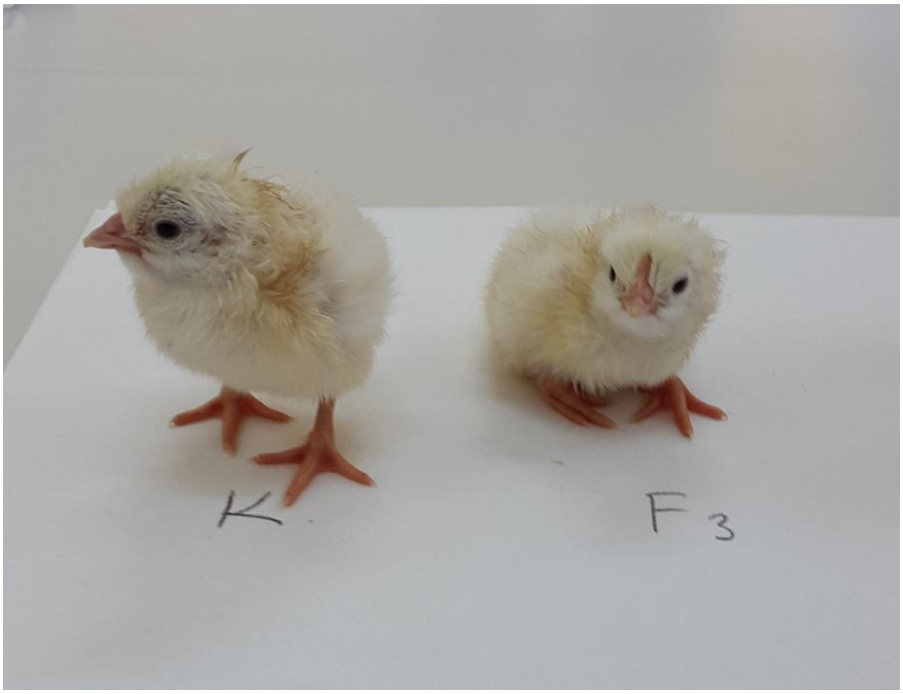
Şekil 3.5. 5.5 mg/kg FM (F_2) grubuna ait yirmibir günlük bir embriyoda makas gaga ve unilateral anoftalmi görülmektedir.



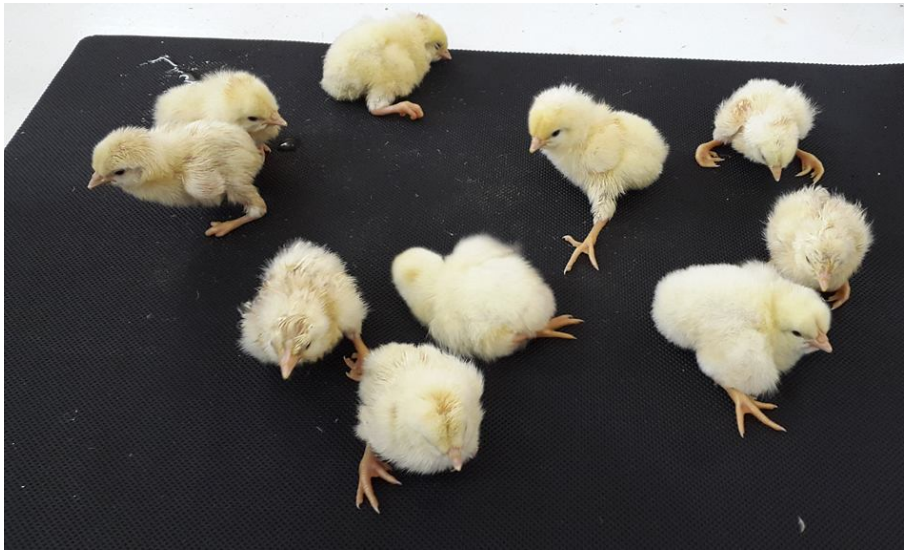
Şekil 3.6. 5.5 mg/kg FM (F_2) grubuna ait yirmibir günlük bir embriyoda makas gaga ve exencephaly görülmektedir.



Şekil 3.7. 5.5 mg/kg FM (F_2) grubuna ait yirmibir günlük bir embriyoda exencephaly ve çift gaga görülmektedir.

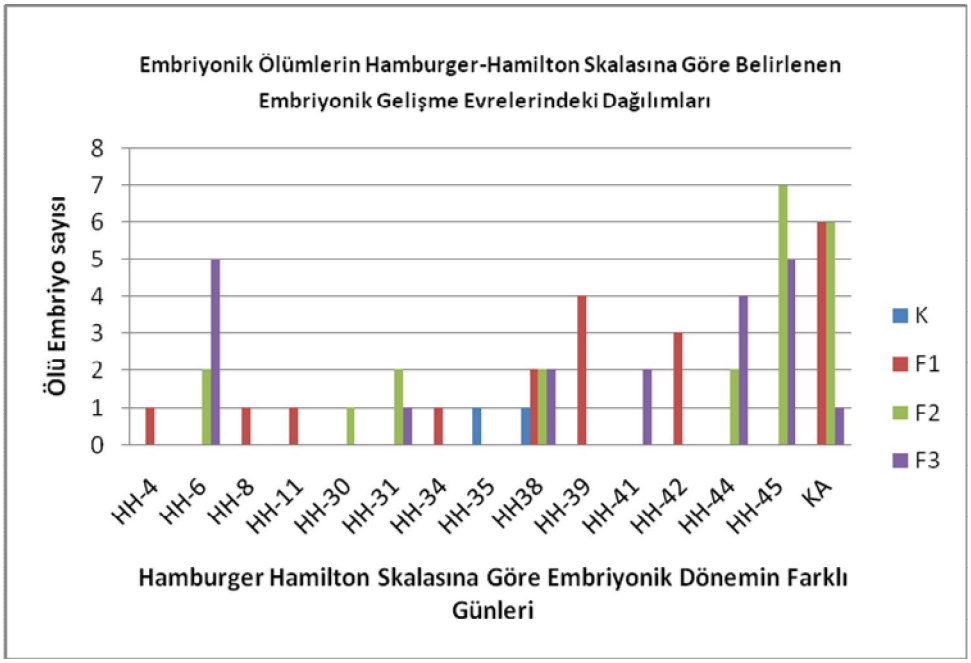


Şekil 3.8. Kuluçkadan çıkışta kontrol ve 11 mg/kg FM (F3) grubuna ait civcivler görülmektedir. Deney grubundaki civcivin parmaklarındaki kıvrılma ve bükülmelerle birlikte hayvanın ayakta durmakta güçlük çektiği dikkati çekmektedir.



Şekil 3.9. Kuluçkadan çıkışta 5.5 mg/kg FM (F2) grubuna ait civcivler görülmektedir. **C**ivcivlerin parmaklarındaki kıvrılma ve bükülmelerle birlikte iskelet sistemlerindeki bozukluklar nedeniyle ayakta durmakta güçlük çektikleri dikkati çekmektedir.

Kontrol ve FM verilen gruplardaki embriyonik ölümlerin dağılımı şekil 3.10' da gösterildi. Ölümlerin HH-38 evresinden sonra yoğunlaştığı, erken embriyonik dönemlerdeki ölümlerin ise özellikle yüksek doz grubunda (F3) ilk 25 saatlik dönemde (HH-6) olduğu dikkati çekti.



Şekil 3.10. Kontrol ve FM gruplarında saptanan embriyonik ölümlerin Hamburger-Hamilton Skalasına göre belirlenen embriyonik gelişme evrelerindeki dağılımları.

Kontrol ve FM gruplarındaki embriyoların ortalama rölatif canlı ağırlıklarının kuluçka günlerine göre dağılımları ve çıkış günü civciv ağırlıkları Çizelge 3.2 ve 3.3'de verildi. FM'nin yüksek doz grubunda (11 mg/kg) embriyonik gelişimin oldukça baskılanmış olduğu (Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3) ve bu grubun rölatif embriyo ağırlıklarının [(embriyo ağırlığı/yumurta ağırlığı)x100], belirgin bir şekilde düştüğü görüldü (Çizelge 3.2 ve 3.3). Ayrıca FM'nin yüksek doz grubunda, vitellüs kesesinin miktarındaki fazlalık da oldukça dikkat çekiciydi (Şekil 3.11).

Kontrol ve FM gruplarındaki embriyoların CRL değerleri Çizelge 3.4'de sunuldu. Özellikle FM'nin 5.5 ve 11 mg/kg doz gruplarında CRL değerindeki düşüş dikkat çekmektedir.



Şekil 3.11. Kuluçkanın onsekizinci gününde 11 mg/kg FM (sol) ve kontrol (sağ) ve grubuna ait embriyoların vitellüs keseleri görülmektedir. F_3 grubundaki embriyonun vitellüs miktarının fazla oluşu dikkat çekmektedir.

Çizelge 3.2. Kuluçkanın farklı dönemlerinde tespit edilen ortalama rölatif embriyo ağırlıkları (%).

Gruplar **N=5**	7. gün (x±Sd)	11. gün (x±Sd)	15. gün (x±Sd)	18. gün (x±Sd)
Kontrol	1,19±0,06[a]	6,66±0,61[a]	24,24±1,79[a]	48,29±2,84[a]
F1-(2,2 mg)	1,25±0,16[a]	6,47±0,67[ab]	23,46±2,38[a]	45,06±1,98[ab]
F2-(5,5 mg)	1,23±0,15[a]	5,66±0,32[bc]	23,61±2,14[a]	46,79±0,57[a]
F3-(11 mg)	0,77±0,11[b]	5,29±0,50[c]	19,04±3,10[b]	42,14±2,11[b]
	*	*	*	*

[a, b, c]: Aynı sütundaki farklı harfler ististiki açıdan önemlidir (P<0.05).

Çizelge 3.3. Çıkış gününde tespit edilen ortalama civciv çıkış ağırlıkları (g).

Gruplar **N=5**	**Civciv Ağırlığı**
Kontrol	43,72±3,82
F1-(2,2 mg)	40,62±3,12
F2-(5,5 mg)	43,12±2,84
F3-(11 mg)	40,77±1,77

Çizelge 3.4. Kuluçkanın farklı dönemlerinde tespit edilen ortalama CRL uzunlukları (mm).

Gruplar **N=5**	7. gün (x±Sd)	11. gün (x±Sd)	15. gün (x±Sd)	18. gün (x±Sd)
Kontrol	15,01±0,50[a]	35,82±1,26[a]	60,60±1,97	79,13±0,51[a]
F1-(2,2 mg)	14,11±1,01[ab]	32,83±1,84[b]	58,85±1,72	78,29±1,52[ab]
F2-(5,5 mg)	13,37±0,60[b]	29,94±0,75[c]	58,48±2,26	78,40±0,95[ab]
F3-(11 mg)	10,94±0,79[c]	29,90±1,42[c]	57,90±1,17	75,41±2,74[b]
	*	*	-	*

[a, b, c]: Aynı sütundaki farklı harfler ististiki açıdan önemlidir (P<0.05).

4. TARTIŞMA

İlaçlar, gıda katkı maddeleri, endüstriyel bileşikler, ağır metaller, mikotoksinler ve pestisitlerin embriyotoksik, teratojenik, mutajenik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan testlerde kanatlı embriyoları sıklıkla tercih edilen materyallerden biridir. Bu amaçla Jelinek (1977) döllü tavuk yumurtası kullanarak Tavuk Embriyotoksisite Belirleme Testini (Chicken Embryotoxicity Screening Test, CHEST) geliştirmiştir. Bu test CHEST-I (embriyotoksik doz sınırlarının belirlenmesi) ve CHEST-II (teratojenik parametrelerin tespiti) olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmektedir. Jelinek ve ark (1985), CHEST-I ve -II ile 130 maddenin toksik etkilerini değerlendirmiş, endüstriyel bileşikler, ilaçlar, gıda katkı maddeleri ve pestisitleri içeren bu bileşiklerden 117 tanesinde embriyotoksik etki gözlemişlerdir. CHEST-I'den elde edilen sonuçların memelilere uyarlanabilmesi de söz konusudur. Belirlenen embriyotoksik aralıktaki sulandırma konsantrasyonlarının 10^{-2} ile çarpılmasıyla elde edilen değer memeli gebe annenin canlı ağırlığının kg başına alması gereken toksik sınırlar olarak kabul edilmektedir. Her ne kadar CHEST'in sonuçlarının memelilere ve özellikle insana uygulanmasında tür farklılığı söz konusu olsa da bütün türlerde morfogenetik olaylar ve bunların seyri ortak olup; bazı embriyotoksisite testlerinde insan harici memeliler kullanılmaktadır (Jelinek 1977).

CHEST'in yanı sıra döllü tavuk yumurtası kullanılarak çeşitli modifikasyonlarla, Kemper ve Luepke (1986) Tavuk Yumurtası Testini (Hen's Eggs Test, HET), Nishigori ve ark (1992) Döllü Tavuk Yumurtası Belirleme Testini (Hen's Fertile Egg Screening Test, HEST), Wolf ve Luepke (1997) ise Mikronukleus İndüksiyonu için Tavuk Yumurtası Testini (Hen's Egg Test for Micronucleus Induction, HET-MN) geliştirmişlerdir. Bütün bu testler kolay, ucuz, tekrarlanabilir sonuçlar vermekte ve kısa sürede gerçekleştirilebilmektedir. Tavuk embriyosunun gelişim safhalarının çok iyi bilinmesi önemli bir diğer avantajdır. Çok sayıda tavuk embriyosunun kullanılabilmesi toksisitenin istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde memeli türlerle yapılacak çalışmalara karşı bir avantaj sağlamaktadır. Aynı zamanda

daha sonra memelilerdeki toksikolojik çalışmalarda kullanılacak olan denek sayısı ile deneme sayısını azaltmakta, canlı bir organizmaya verilebilecek ağrı ve acıyı da en aza indirgeyerek, etik kurallara ve yasal kısıtlamalar ile Hayvan Haklarını Koruma Kanununa da aykırı düşmemektedir. Ayrıca CHEST ve HET'den elde edilen sonuçların memelilerden elde edilen sonuçlarla büyük oranda uyumlu olduğu bildirilmiştir (Jelinek 1977, Jelinek ve ark 1985, Kemper ve Luepke 1986, Vesely ve Vesela 1995, Özcan 1992, Jelinek ve Marhan 1994, Davies ve Freeman 1995). Bununla birlikte plasenta ve memelilerdeki anne-fötus ilişkisi olmaması, ayrıca bazı bileşiklerin nonspesifik bir hassasiyet göstererek hatalı pozitif sonuçlar verebilmesi tavuk embriyosu kullanılan bu modellerin dezavantajları olarak kabul edilmektedir (Özcan 1992). Kemper ve Luepke (1986) HET ile ölüm oranının (LD50), gelişme geriliğinin (yumurtadan çıkış ağırlığı, kemik uzunlukları ve organ ağırlıkları), teratojenitenin (iskelet gelişimi anormallikleri, makroskobik ve anatomik anormallikler), sistemik etkilerin (biyokimyasal kan parametreler, hematolojik parametreler ve organ histopatolojisi) ve immünopatolojik etkilerin (timus ve bursa Fabricii'nin histolojik yapıları) değerlendirilebileceğini belirtmişlerdir. Daha önce bahsedilen testlerin yanı sıra Luepke (1985) İrritant Etki için Tavuk Yumurtası Korioallantoik Membran Testini (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane, HET-CAM) geliştirmiştir. Bu test ile kozmetik ürünleri gibi kimyasal maddelerin korioallantoik membran üzerindeki hemoraji, lizis ve koagülasyon etkileri değerlendirilerek gözle ilgili irritasyon potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Rosenbruch ve Holst (1990) ise HET-CAM'a alternatif, vitellüs kesesi kan damarları sistemi ile benzer bir model geliştirmişlerdir. Benzer şekilde Neumann ve ark (1997), tavşan göz irritasyon testine (Draize Test) alternatif olarak PHET'i (Photo Hen's Egg Test) geliştirmişlerdir. Hashizume ve ark (1992) teratoloji çalışmalarında enjeksiyon anındaki tavuk embriyolarının gelişme evresine, enjeksiyon bölgesine ve çözücü türünün önemine dikkat çeken bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Jelinek ve Marhan (1994), CHEST'in geçerliliğini göstermek için farklı farmakolojik özellikteki 50 kimyasal maddeyi rutin sıçan ve tavşan testlerine tâbi tutmuşlar, sonuçların yaklaşık %80 oranında CHEST ile tutarlı olduğunu, bununla birlikte alternatif test yöntemlerinin rutin test yöntemlerinin yerini alamayacağını

ancak yardımcı olabileceğini belirtmişlerdir. Rosenbruch (1994), tavuk yumurtası modelinin özellikle göz ve mukozal toksisite çalışmalarında, tümör biyolojisinde, ağır metallerin etkileri ve ilaçların kardiyovasküler sistem üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmalarda kullanımına dikkat çekmiştir. Ayrıca Rosenbruch (1994 ve 1997) deneysel biyoloji ve tıpta bir model olan tavuk yumurtasının, embriyonun acıya duyarlılığının gelişmediği kuluçka periyodunun erken evrelerinde (ilk üçte birlik evrede) kullanımına dikkat çekmiş, böylece bu testin hayvan deneylerine gerçek bir alternatif olabileceğini bildirmiştir. Bu çalışmada da farklı hayvan türlerinde (at, sığır, köpek, kedi, tavşan, hamster, kobay, gerbil, şinşilla, rat) kullanılan kuvvetli anti-inflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkilere sahip olan FM'in embriyotoksik etkilerinin belirlenebilmesi için döllü tavuk yumurtalarına enjeksiyonu gerçekleştirildi.

In ovo embriyotoksisite testlerinde enjeksiyon bölgesi ve zamanı, kullanılan test solüsyonunun hacmi ve pH'sı, uygulanan dozlar ve her doz grubu için kullanılan yumurta sayısı ile kullanılan çözücünün türü ve konsantrasyonu dikkat edilmesi gereken önemli hususlardır. Tavuk embriyoları üzerinde yapılan embriyotoksisite çalışmalarında test edilecek maddenin yumurtaya verilişinde, enjeksiyon bölgesi olarak hava kamarasına (Stoloff ve ark 1972, Kemper ve Leupke 1986, Çelik ve ark 2000a, Sur ve Çelik 2003, Öznurlu ve ark 20012), embriyonun kaudal bölgesine, albümine 45^0'lik açı ile ya da ekvator bölgesinden (Prelusky ve ark 1987), yumurta sarısına (Verret ve ark 1964) ve koryo-allantoik membrana (Pal ve ark 2005) enjeksiyon yöntemleri uygulanmıştır. Verret ve ark (1964) yumurta sarısına yapılan enjeksiyonun, hava kamarasına yapılana nazaran daha az toksik etkiye sahip olduğunu, ÖD50 değerlerinin yumurta sarısına yapılan enjeksiyonda 48 ng/yumurta iken, hava kamarasına enjeksiyonda 25 ng/yumurta olduğunu tespit etmişlerdir. Uygulama kolaylığı, yumurtaların enfekte olma riskinin en düşük düzeyde olması, verilen solüsyonun homojen ve hızlı bir şekilde diffüze olması ve diğer yöntemlerde söz konusu olan yumurta içi basınçtaki artışın embriyoda meydana getirebileceği mekanik hasarları ortadan kaldırdığı için hava kamarası ideal enjeksiyon bölgesi olarak kabul edilmektedir (Prelusky ve ark 1987, Çelik ve ark 2000a, Sur ve Çelik 2003, Özparlak ve ark 2008, Öznurlu ve ark

2012). Tüm bu avantajlarına rağmen, hava kamarasına yapılan enjeksiyonda maddenin tamamının embriyoya ulaşıp ulaşmadığının belirlenememesi bu yöntemin önemli bir dezavantajıdır (Prelusky ve ark 1987). Yukarıdaki bilgiler dikkate alınarak, bu çalışmada da test solüsyonlarının enjeksiyonları hava kamarası yoluyla 50 µL'lik hacimde gerçekleştirildi.

CHEST'te elde edilen sonuçların güvenilir olması için her doz grubunda kullanılan yumurta sayısı oldukça önemlidir. Bazı araştırıcılar (Verret ve ark 1964, Kemper ve Luepke 1986, Prelusky ve ark 1987) her doz grubu için 20 yumurtanın yeterli olduğunu bildirirken; Çelik ve ark (2000a) 56'şar, Jelinek ve ark (1985) 120'şer, Kucera ve Burnand (1987) 150' şer, Sur ve Çelik (2003) 80-120, Öznurlu ve ark (2012) ise 45-150 arasında yumurta kullanmışlardır. Bu çalışmada, FM'nin yüksek doz gruplarında fazla sayıda olmak üzere gruplarda kullanılan yumurta sayıları 35 ile 100 arasındadır.

Bir maddenin embriyotoksisitesinin belirlenmesi amacıyla yapılacak olan çalışmalarda test edilecek maddenin farklı dozları denenmelidir. Brown ve ark (1986) en az üç farklı dozun denenmesi gerektiğini bildirmiş; Çelik ve ark (2000) ile Öznurlu ve ark (2012) ise AFB_1 ile gerçekleştirdikleri embriyotoksisite çalışmasında üç farklı doz kullanmışlardır. Whitsel ve ark (2002) antiepileptik bir ilaç olan valproik asitin teratojenik etkilerini belirlemek amacıyla dört farklı doz kullanırlarken; Heinrich-Hirsch ve Neubert (1991)'de asiklovirin, Güvenç ve ark (2013) antiepileptik bir ilaç olan levetirasetamın, Çetinkal ve ark (2010) da meloksikamın etkisini belirlemek amacıyla üç farklı dozu denemişlerdir. Bu çalışmada da FM 2.2 mg/kg, 5.5 mg/kg ve 11 mg/kg olarak üç farklı dozda kullanılmıştır.

Kuluçka başlangıcında tavuk embriyosu (blastoderm), blastula aşamasındadır ve yaklaşık 400.000 adet, henüz diferansiyasyonun başlangıcındaki hücrelerden oluşan bir hücre topluluğu halindedir (Kucera ve Burmond 1987). Bu dönem ve takip eden üç günlük süre, tavuk embriyosunda mitoz ve hücre diferansiyasyonu olaylarının son derece hızlı bir tempoda gerçekleştiği evre olan organogenezisin en kritik evresidir. Çok sayıda morfogenetik olay, kuluçkanın bu erken evresinde gerçekleşir (Kucera ve Burmond 1987, Etches 1996). Bu dönemde ortaya çıkan ve embriyonik

gelişmeyi bozan fiziksel ya da kimyasal etkiler, embriyonik ölümlere sebep olmaları yanında, önemli yapısal ve fonksiyonel bozukluklara da sebep olmaktadır (Kucera ve Burmond 1987). Bu nedenle enjeksiyonlar bu çalışmada kuluçkanın başlangıcında yapılmıştır.

Embriyotoksisite ile ilgili farklı ilaçlar, gıda katkı maddeleri, endüstriyel bileşikler, ağır metaller, mikotoksinler ve pestisitler ile yapılmış çok sayıda çalışma mevcuttur. Çelik ve ark (2000) AFB_1'in embriyotoksik etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada döllü tavuk yumurtalarına hava kamarası yoluyla kuluçka başlangıcında 10 ng/yum, 100 ng/yum ve 1000 ng/yum dozlarında AFB_1 enjekte ederek, kuluçka sonunda sırasıyla %74.50, %98.03 ve %100 mortalite belirlemişler ve özellikle yüksek doz grubunda ölümlerin erken embriyonik dönemde yoğunlaştığını gözlemişlerdir. Sur ve Çelik (2003) AFB_1'in immun sistem üzerine etkilerini araştırdığı çalışmasında, tavuk yumurtalarına hava kamarası yoluyla 5 ng/yum, 10 ng/yum, 20 ng/yum ve 40 ng/yum dozlarında AFB_1 enjekte etmiş, kuluçka sonunda sırasıyla %41.66, %43.47, %80.43 ve %91.22 oranında mortalite belirlemiştir. Öznurlu ve ark (2012)'nın AFB_1'in iskelet sistemi üzerindeki etkilerini araştırdığı bir başka çalışmada ise tavuk yumurtasına hava kamarası yoluyla enjekte edilen 5 ng/yum, 15 ng/yum ve 40 ng/yum dozlarında AFB1 'in mortalite değerlerini kuluçka sonunda sırasıyla %19.40, %51.08 ve %84.67 olarak tespit etmişlerdir.

Durmuş ve ark (2005) ise aynı metotla diş hekimliği sahasında kullanılan farklı metal alaşımların embriyotoksik etkilerini inceledikleri çalışmalarında, %10 ile %13.51 arasında mortalite tespit etmişlerdir. Özparlak ve Ünsal (2006) döllü tavuk yumurtasına organik insektisit olan fipronili 161 µg/yum, 80.50 µg/yum, 40.25 µg/yum dozlarında enjekte etmiş, kuluçka sonunda sırasıyla %41.67, % 41.67 ve %45.45 oranında mortalite belirlemiştir. Julian ve Abbott (1998) insülinin kanatlı embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerine baktıkları çalışmalarında, 0 ile 3 günlük erken periyodda caudal vertebrada anormaliteler görüldüğünü ve insülinin yüksek mortalite (%40) değerine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Tavakkoli ve ark (2014) yaptıkları çalışmada farklı dozlarda Linkospektin™ (50 mg linkomisin hidroklörüd + 100 mg spektinomisin sülfat/mL) solüsyonunu yumurta sarısına enjekte etmişler ve kuluçkanın 18.

gününden sonra makroskobik ve mikroskobik olarak embriyolarda hiçbir olumsuz etkinin olmadığını tespit etmişlerdir.

Antiepileptik bir ilaç olan levetirasetam farklı dozlarda, 24 saatlik inkübasyondan sonra koryoallantoik membran altına enjekte edilmiş, 48 saat daha kuluçka işlemine devam edildikten sonra makroskobik ve mikroskobik olarak nöral tüp gelişimine bakılmış, deney gruplarında embriyonik gelişimin olumsuz yönde etkilendiği ve nöral tüpün kapanmasında gecikmeler olduğu tespit edilmiştir (Özer ve ark 2012).

Çetinkal ve ark (2010) meloksikamın erken dönem civciv embriyosunda nöral tüp gelişimine etkilerini belirlemek için yaptıkları çalışmada, inkübasyonun 30. saatinde farklı dozlarda meloksikamı embriyonik disk sahasının alt kısmına enjekte etmişler ve 72 saat inkübasyona devam etmişlerdir. Meloksikamın yüksek dozlarda erken dönem tavuk embriyosunda nöral tüp defekti insidensini arttırdığını gözlemlemişlerdir. Ancak düşük dozlarda kullanımı ile ilgili daha geniş denek sayısına ve daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu belirtmişlerdir.

Vatansever ve ark (2003) tavuk embriyosu gelişimi sırasında terapotik dozlarda in ovo olarak enjekte edilen metotreksatın nöral tüp gelişimi üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve 48-72 saatlik inkübasyondan sonra embriyolarda nöral tüpün kapanmasında defektlerin olduğunu tespit etmişlerdir.

Whitsel ve ark (2002) antiepileptik bir ilaç olan valproik asitin teratojenik etkilerini belirlemek amacıyla kuluçkanın 24. saatinde embriyonik disk sahasına farklı dozlarda valproik asiti enjekte etmişler ve makroskobik olarak büyümede gecikme, göz anomalilerinin yanı sıra iskelet sisteminde de anomaliler tespit etmişlerdir.

Heinrich-Hirsch ve Neubert (1991) asiklovirin (ACV) kanatlı embriyonik gelişimi ve organogenezisi üzerindeki etkilerini belirlemek için, 24 saatlik inkübasyondan sonra yumurta sarısına; 2 ve 3 günlük inkübasyondan sonra ise direkt embriyoya ACV'nin farklı dozlarını enjekte etmişlerdir. ACV'nin yüksek dozlarının enjekte edildiği gruplarda %50 düzeyinde anormal

gelişim ve yapısal bozuklukların olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmada, FM 2.2 mg/kg, 5.5 mg/kg ve 11 mg/kg olarak üç farklı dozda yumurtaya hava kamarası yoluyla enjekte edildi ve sırasıyla %29.5, %25.88 ve %23.65 oranında mortalite belirlendi (Çizelge 3.1). Özellikle veteriner sahada kullanılan dozda (2.2 mg/kg) dahi kontrol gruptan yüksek oranda ($P<0.05$) mortalite gözlenmesi dikkat edilmesi gereken bir bulgu olarak kabul edilebilir. EMEA (2000)'da, ratlara çiftleşme sonrası 6. günden 15. güne kadar 3, 5 ve 7 mg/kg dozlarında oral olarak FM verilmiş, mortalitelerin orta ve yüksek dozda olduğu rapor edilmiştir. 3 mg/kg'lık doz maternotoksisite için NOEL olarak kabul edilebileceği belirtilmiştir. Benzer şekilde çiftleşme sonrası 6. günden 15. güne kadar intramuskuler olarak günlük 2, 4 ve 6 mg/kg dozunda FM enjekte edilen ratlarda hiçbir teratojenik etkiye rastlanmamıştır. Bir başka çalışmada ise 1.5, 3 ve 6 mg/kg dozunda oral FM verilmiş, en yüksek doz verilen grubun embriyolarında canlı ağırlık artışı ve postnatal dönemde yaşamalarının önemli oranda etkilendiği belirtilmiştir. Ayrıca yüksek doz grubundaki embriyolarda kemiklerdeki ossifikasyonda gecikme insidensi de artmıştır. EMEA (2000)'da, gebe Yeni Zelenda tavşanlarında 3, 9 ve 15 mg/kg dozunda oral olarak FM uygulanmış, mortalitenin en yüksek dozda olduğu rapor edilmiştir. 9 mg/kg'lık doz maternotoksisite için NOEL olarak kabul edilmiştir.

Mauldin (1993)'e göre kuluçka boyunca günlük ağırlık kaybının %0.55-0.70 arasında olması kabul edilebilir sınırlar olarak belirlenmiştir. Kabuk porları yoluyla nemin buharlaşması sonucu gerçekleşen yumurta ağırlık kaybı, kuluçka makinesinin nispi (%) neminin belirlenmesi için iyi bir araçtır. Bu çalışmada kontrol grubu yumurtalarında kuluçka süresince gerçekleşen ağırlık kayıpları önerilen oranlara yakındır (Çizelge 3.2, 3.3). Bu durum, bu çalışmada sağlanan kuluçka şartlarının optimal olduğunu göstermektedir. Kuluçka şartlarının uygunluğuna işaret eden bir diğer nokta ise çalışmada kuluçkanın 7., 11., 15. ve 18. günlerinde açılan yumurtalarda hiçbir işlem uygulanmayan kontrol grubuna ait ortalama canlı embriyo ağırlıklarının, bu günler için Romanoff (1997)'un bildirdiği değerlere oldukça yakın olmasıdır. Bu çalışmada özellikle embriyonik dönemin 7, 11, 15 ve 18. günlerinde, kontrol ve FM verilen deney gruplarının rölatif embriyo ağırlıkları ve kuluçkadan çıkış günü civciv ağırlıkları arasında

önemli ($P<0.05$) farklar tespit edildi (Çizelge 3.2 , 3.3, Şekil 3.1, 3.2, 3.3). Ayrıca FM verilen gruplarda embriyoların vitellüs kesesinin daha büyük olduğu, embriyonun vitellüsten yeterince faydalanamadığı görüldü (Şekil 3.11). Bu durum, genel vücut gelişiminde gerilemeye, hayvanların iskelet sisteminin gelişiminin de yavaşlamasına sebep olduğu belirlendi. Bu bulgu ile ilşikili oarak etkilenen embriyoların CRL değerleri de önemli derecede ($P<0.05$) düşük bulundu (Çizelge 3.4). Ayrıca FM'in doza bağlı olarak artan oranlarda embriyonik gelişme geriliğinin yanı yanı sıra farklı yapısal anomalilere neden olduğu tespit edildi. Bu anomali tipleri arasında makas gaga**,** ünilateral anoftalmi, exencephaly, çift gaga ve parmaklarda kıvrılma ve bükülmeler sık rastlanan anomali tiplerindendir (Şekil 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak döllü tavuk yumurtalarının kullanıldığı bu çalışmada, kuluçka başlangıcında yumurtalara verilen farklı dozlarda FM embriyoların gelişimini olumsuz yönde etkilemiş, iskelet sistemi bozukluklarına ve çeşitli malformasyonlara neden olmuştur. Yüksek mortalite oranı veteriner sahada kullanılan dozda (2.2 mg/kg) bile tespit edilmiştir. FM'in gebe hayvanlarda kullanımı ile ilgili çalışmalar bulunmamaktadır. Bu nedenle embriyotoksisite çalışmaları ile elde edilen sonuçların memelilere uygulanmasında tür farklılığı karşımıza çıksa da bütün türlerde morfogenetik olaylar ve bunların seyri ortak olduğundan, bu etken maddenin özellikle gebe hayvanlarda kullanımında kar zarar hesabının hassasiyetle yapılmasının kritik öneme sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

Ahmed AA, Soliman MM, Khlifa BAA, El-Sadek SE and Nounou AH, 1988. Embryocidal and teratogenic effects of paraquat on chick embryos and white rats. Arch. Exper. Vet. Med. Lepzig, 42, 848-853.

Ameenuddin S and Sunde ML, 1984. Sensitivity of chick embryo to various solvents used in egg injection studies. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,175, 176-178.

Becker SRB and Shibley IA,1998. Teratogenicity of ethanol in different chicken strains. Alcohol Alcoholism., 33 (5), 457-464.

Booth, N.H. and McDonald, L.E. 1988. Veterinary pharmacologyand therapeutics. 6 th ed., lowa State Univ, Press,Ames.

Bryan TE, Gildersleeve RP and Wiard RP, 1989. Exposure of Japanese quail embryos to o,p´-DDT has long-term effects on reproductive behaviors, hematology and feather morphology. Teratology, 39, 525-535.

Brunström, B., Broman, D. and Naf, C, 1990. Embryotoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in three domestic avian species, and of PAHs and coplanar Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in the common eider. Environ. Pollut. 67, 133-143.

Brown LP, Flint OP, Orton TC and Gibson GG, 1986. Chemical teratogenesis: Testing methods and the role of metabolism. Drug Metab. Rev., 17 (3-4), 221-260.

Budai P, Feje S, Varnagy L, Somlyay IM and Takacs I, 2001. Teratogenicity test of dimethoate containing insecticide formulation and heavy elements (Cu, Cd) in chicken embryos after administration as single compounds or in combination. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent., 66 (2b), 885-889.

Budai P, Fejes S, Varnagy L, Szabo R and Keseru M, 2002. Embryonic toxicity of a dimethoate containing insecticide formulation and Cu-Sulphate in chicken after individual or combined administration. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent., 67 (2), 99-103.

Chibber G and Gilani SH, 1986. Acrolein and embryogenesis: An experimental study. Environ. Res., 39, 44-49.

Cilievici O, Cordos I, Ghidus E and Moldovan A, 1980. The toxic and teratogenic effect of Aflatoxin B1 on the chick embryo development. Morphol. Embryol., 26 (4), 309-314.

Çelik I, Oguz H, Demet Ö, Boydak M, Dönmez HH, Sur E and Nizamlıoglu F, 2000. Emryotoxicity assay of aflatoxin produced by Aspergillus parasiticus Nrrl 2999. Brit. Poult. Sci., 41 (4), 401-409.

Çetinkal A, Çolak A, Topuz K, Demircan MN, Şimsek N, Berber U, Umur AŞ, Selçuki M, Vatansever HS, 2010. The Effects of Meloxicam on Neural Tube development in the Early Stage of Chick Embryos Turkish Neurosurgery, 20, 2, 111-116.

Davies WJ and Freeman SJ, 1995. Chick embryotoxicity screening test (CHEST I and II). In: Methods in Molecular Biology. In Vitro Toxicity Testing Protocols. O'Hare, S. and Atterwill, C.K. (eds.), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 43: 307- 310.

Durmus E, Inan O, Çelik I, Sur E, Özkan Y, Acar A and Aydin MF, 2005. Use of the fertilized hen's egg in the evaluation of embryotoxicity of dental alloys. J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater., 72 (B): 322-327.

El-Sayyad HI, El-Gammal SA and Kariem, S.A. 1996. Some aspects of growth deformities of chick embryos induced by flufenoxuron. J. Union. Arab. Biol. 5 (A): 313-329.

Elovaara E, Hemminki K and Vainio H, 1979. Effects of methylene chloride, trichloroethane, tetrachloroethylene and toluen on the development of chick embryos. Toxicology., 12, 111-119.

EMEA,2000.http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014325.pdf, Erişim tarihi:29.12.2015

Etches R, 1996. Reproduction in Poultry. CAB International, Cambridge.

Fejes S, Budai P, Varnagy L, Molnar T, Szabo R and Fancsi T, 2002. Toxicity of a mancozeb containing fungicide formulation and Cu-sulphate to chicken embryos after administration as single compounds or in combination. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent., 67/2, 105-109.

Garrison JC and Wyttenbach, CR, 1985. Notochordal Development as influenced by the insecticide dicrotophos (Bidrin). J. Exp. Zool., 234, 243-250.

Gilani SH and Alibhai Y, 1990. Teratogenicity of metals to chick embryos. J. Toxicol. Environ. Health, 30 (1), 23-31.

Günaydın AA, Sezen Ş, Coşkun Ö, Cıncık M, Öztaş E, Duman S, 2001. Meningomyelosel Anomalili Yenidoğanların ve Annelerinin Serumlarında Bulunan Olası Embriyotoksik Faktörlerin Tavuk Embriyosunda Oluşturduğu Malformasyonlar. T Klin J Med Sci, 21, 25-30.

Guvenc Y, Dalgic A, Billur D, Karaoglu D, Aydin S, Daglioglu E, Ozdol C, Nacar OA, Yildirim AE, Belen D, 2013. The effects of levetiracetam on neural tube development in the early stage of chick embryos. Turk Neurosurg., 23(5), 617-22.

Hamburger V and Hamilton HL, 1951. A series of normal stages in the development of chick embryo. J. Morphol., 88, 49-92.

Hamilton JV, Denison MS and Bloom SE, 1983. Development of basal and induced aryl hydrcarbon (benzo(a)pyrene) hydroxylase activity in the chick embryo in ovo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 3372-3376.

Harold TT, Bruyere J, Steve J, Kargas A, Nishikawa T, Takagi Y And Gilbert EF, 1987. Alcohol induces cardiovascular malformations in the chick embryo. Teratology., 35, 95-103.

Hashizume R, Noda, Itoh M, Yamamoto Y, Masui S, Oka M And Nakamura T,1992. Studies on teratological testing using chicken embryoseffects of solvents, injection sites and the age of the embryo. Jikken Dobutsu, 41(3), 349-356.

Hassan Z, Khan MZ , Saleemı MK, Khan A, Javed I, and Bhattı SH, 2012.Toxico-Pathological Effects of In Ovo Inoculation of Ochratoxin A (OTA) in Chick Embryos and Subsequently in Hatched Chicks. Toxicologic Pathology, 40,33-39, 2012

Heinrich-Hirsch B, Neubert D, 1991. Effect of aciclovir on the development of the chick embryo in ovo. Archives of Toxicology , 65, 5, 402-408.

Henry MH and Wyatt RD, 2001. The toxicity of fumonisin B1, B2 and B3, individually and in combination, in chicken embryos. Poultry Sci, 80 (4): 401- 407.

Jelinek R, 1977. The chick embryotoxicity screening test (CHEST). In: Methods in Prenatal Toxicology. Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigrooh, T.E. (eds.), Georg Thieme, Stutgart, pp. 381-386.

Jelinek R, Peterka M and Rychter Z, 1985. Chick Embryotoxicity Screening Test-130 Substances Tested. Indian J. Exp. Biol, 23: 588-595.

Jelinek R and Marhan O, 1994, Validation of chick embryotoxicity screening test (CHEST). A comparative study. Funct. Dev. Morphol, 4 (4): 317-323.

Julian D, Abbott UK, 1998. An avian model for comparative studies of insulin teratogenicity. Anat Histol Embryol, 27(5):313-21.

Kaya S, Alabay B, Baydan E ve Altunay H, 1995. Ağır metallerin tavuk embriyolarında teratojenik etkileri: Arsenik, ve kursun ayrı ayrı ve birlikte kullanılmasının etkileri. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg, 42: 225-233.

Kelly MJ, 1988. The cilincal use of nonsteroidal antiinflammatory drugs in the dog. XII World Conference ot theWorld Smail Animals Veterinary Association. Barcelona.

Kemper FH and Luepke NP, 1986. Toxicity testing by the hen's egg test (HET). Food Chem. Toxicol, 24 (6/7): 647-648.

Korhonen A, Hemminki K and Vainio H,1982. Embryotoxicity of industrial chemicals on the chicken embryo: Thiourea derivatives. Acta Pharmacol. et. Toxicol, 51: 38-44.

Korhonen A, Hemminki K and Vaini H, 1983. Embryotoxicity of industrial chemicals on the chicken embryo: Dithiocarbamates. Teratogen. Carcin. Mut, 3(2): 163-175.

Königsson K, Törneke K, Engeland IV, Odensvik K, Kindahl H, 2003. Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of flunixin after intravenous, intramuscular and oral administration to dairy goats. Acta Vet. Scand, 44, 153-159.

Kucera P and Burnand MB, 1987. Routine teratogenicity test that uses chick embryos in vitro. Teratogen. Carcin. Mut, 7: 427-447.

Kury BG and Craig JM, 1967. The effects of Mitomycin C on developing chick embryos. J. Embryol. Exper. Morph, 17 (1): 229-237.

Lees P and Higgins A, 1984. Flunixin inhibits prostaglandın E2 production in equine inflammation. Resarch in Veterinary Science, 37, 347-349.

Lee CD and Maxwell LK, 2014. Effect of body weight on the pharmacokinetics of flunixine meglumine in miniature horses and quarter horses. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 37, 35-42.

Luepke NP, 1985. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. Food Chem. Toxicol, 23: 287-291.

Maci R and Arias E, 1987. Teratogenic effects of the fungucide maneb on chick embryos. Ecotoxicol. Environ. Safe, 13: 169-173.

Mas A. and Arola L, 1985. Cadmium and lead toxicity effects on zinc, copper, nickel and iron distribution in the developing chick embryo. Comp. Biochem. Physiol. C, 80 (1): 185-188.

Neumann NJ, Hölzle E, Lehmann P, Rosenbruch M, Klaucic A and Plewig G, 1997. Photo hen's egg test: A model for phototoxicity. Brit. J. Dermatol, 136: 326-330.

Nishigori H, Mizuura M and Iwatsuru M, 1992. The hen's fertile egg screening test (HEST): A comparison between the acute toxicity for chick embryos and rodents of 20 drugs. Cell Biol. Toxicol, 8 (4): 255-265.

Özcan, M, 1992. Hidrokinon'un gelişim toksisitesinin döllenmiş tavuk embriyosunda analiz ve değerlendirilmesi. G. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

Özer F, Demirel A, Dilsiz Ö, Aydın M, Özdemir N, Uyanıkgil Y, Baka M, 2012. Effects of Levetiracetam on neural tube development and closure of the chick embryos in ovo, Childs Nerv Syst, 28:969–976

Öznurlu Y, Celik I, Sur E, Ozaydin T, Oğuz H, Altunbaş K,2012. Determination of the effects of aflatoxin B_1 given in ovo on the proximal tibial growth plate of broiler chickens: histologic, histometric and immunohistochemical findings. Avian Pathology, 41, 5, 469-477.

Özparlak H ve Ünsal S, 2006. " Organik insektisit Fipronil'in saf ve ticari formülasyonlarının tavuk yumurtası testiyle LD50 tayini ve embriyotoksik etkilerinin belirlenmesi. ", Fen Fakültesi Fen Dergisi , 27,83-98.

Özparlak H, Çelik İ, Sur E, Telatar T, Aydın MF. Öznurlu, Y, 2008. Farklı konsantrasyonlardaki asetonun Embriyotoksik etkilerinin tavuk yumurtası testiyle belirlenmesi. AKÜ Fen Bilimleri Dergisi, 8 (1), 7-16.

Pal AK, Prasad R, Prasad A, Singh SK, Kumar A, Jadhao SB, 2005. In ovo embryotoxicity of alpha-endosulfan adversely influences liver and brain metabolism and the immune system in chickens. Pesticide Biochemistry and Physiology, 82,2.

Peterka M, Jelinek R and Pavlik A, 1992. Embryotoxicity of 25 psychotropic drugs: A study using CHEST. Reprod. Toxicol, 6: 367-364.

Prelusky DB, Hamilton RMG, Foster BC, Trenholm HL and Thompson BK, 1987. Optimization of chick embryotoxicity bioassay for testing toxicity potential of fungal metabolites. J. Assoc. Anal. Chem, 70 (6): 1049-1055.

Rashev Z and Vasilev VK, 1982 Teratogenic effect of the pesticide preparation metathion. Vet. Med. Nauki, 19 (1): 79-89.

Rosenbruch M and Holst A, 1990 The chick embryo yolk-sac blood vessel system as an experimental model for irritation and inflammation. Toxicol. In Vitro, 4 (4/5): 327-331.

Rosenbruch M, 1994. Early stages of the incubated chicken egg as a model in experimental biology and medicine. Altex, 11 (4): 199-206.

Rosenbruch M, 1997. The sensitivity of chicken embryos in incubated eggs. Altex, 14 (2): 111-113.

Sahu CR and Ghatak S, 2002. Effects of dimecron on developing chick embryo: Malformations and other histopathological changes. Anat. Histol. Embryol, 31: 15-20.

Sur E and Celik I, 2003. Effects of aflatoxin B_1 on the development of the bursa of Fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken. British Poultry Science, 44, 4, 558–566.

Stoloff L, Verret MJ, Dantzman J and Reynaldo EF, 1972. Toxicological study of aflatoxin P_1 using the fertile chicken egg. Toxicol. Appl. Pharmacol., 23, 528-531.

Tavakkoli H, Derakhshanfar A, Salandari S, 2014. Investigation on the using of linco-spectin solution for in ovo administration in chicken embryo. International journal of Advanced Biological and Biomedical Research, 2, 1, 110-116.

Traş B,İzci C, Elmas M, 1995. Fluniksin Meglumin (Finadynr)'İn Eklem Sıvısına Geçiş Oranının Belirlenmesi Vet. Bil. Derg, 11, 1: 65- 66.

Traş B, Elmas M, 2012. Ağrı davranışı ve ağrı kesici, ateş düşürücü ile yangı giderici ilaçlar, in: Veteriner İlaç, Ed: Yazar E, Olgun-Çelik Matbaası, Konya, pp:208-233.

Whitsel AI, Johnson CB and Forehand C, 2002. An In Ovo Chicken Model to Study the Systemic and Localized Teratogenic Effects of Valproic Acid, Teratology, 66:153–163.

Wolf T and Luepke NP, 1997. Formation of micronuclei in incubated hen's eggs as a measure of genotoxicity. Mutat. Res.-Gen. Tox. En, 394: 163-175.

Wolf T, Niehaus-Rolf C and Luepke NP, 2002. Some new methodological aspects of the hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN). Mutat. Res.-Gen. Tox. En, 514: 59-76.

Wyttenbach, C.R. and Thompson, S.C., 1985. The effects of the organophosphate insecticide malathion on very young chick embryos: Malformations detected by histological examination. Am. J. Anat, 174: 187-202.

Varga T, Hlubik I, Varnagy L, Budai P and Molnar E, 1999. Embryonic toxicity of insecticide sumithion 50 EC and herbicide fusilade S in pheasants after individual or combined administration. Acta Vet. Hung, 47 (1): 123-128.

Varga T, Cravedi JP, Füzesi I and Varnagy L, 2002 Residues of fenitrothion in chick embryos following exposure of fertile eggs to this organophosphorus insecticide. Revue Med. Vet, 153: 275-278.

Varnagy L and Deli E, 1985. Comparative teratological study of insecticide Wofatox 50 EC (%50 methyl-parathion) on chicken and pheasant fetuses. Anat. Anz, 158: 1-3.

Varnagy L, 1999. Degradation of some pesticides in avian embryos. Acta Vet. Hung, 47 (1): 117-122.

Varnagy L, Budai P, Molnar E, Füzesi I and Fancsi T, 2001. Teratogenicity testing of BI 58 EC (%38 dimethoate) in chicken embryos with special respect to degradation of the active ingredient. Acta Vet. Hung, 49 (3): 355-361.

Varnagy L, Budai P, Molnar E, Susan M and Fancsi T, 2002. Toxicity and degradation of benefin in chicken embryos. Med. Rijk. Gent. Fak. Land. Toe. Biol. Wet, 67 (2): 111-115.

Vatansever HS, Umur AŞ, İnan VS, Selçuki M, 2003. The effects of methotrexate on the development of neural tube defects in the chick embryo. Turk J. Vet. Anim. Sci., 27, 1119-1125.

Verret MJ, Marliac JP and McLoughlin J, 1964. Use of the chicken embryo in the assay of aflatoxin toxicity. J AOAC, 47(6), 1003-1006.

Verret MJ, Scott WF, Reynaldo EF, Alterman EK and Thomas CA, 1980. Toxicity and teratogenicity of food additive chemicals in the developing chicken embryo. Toxicol. Appl. Pharmacol, 56: 265-273.

Vesely D, Vesela D and Jelinek R, 1982. Nineteen mycotoxins tested on chicken embryos. Toxicol. Lett, 13 (3-4): 239-245.

Vesely D and Vesela D, 1995. Embryotoxic effects of a combination of zearalenone and vomitoxin (4-dioxynivalenole) on the chick embryo. Veterinarni Medicina, 40(9):279-281.

Yazar E, 2010. Kemirgenler, in: Egzotik Hayvan Hastalıkları ve Beslenmesi, Ed: Maden M, Erman Ofset, Konya, pp:111-128.

Yılmaz S, 1997. Bazı metal kombinasyonlarının tavuk embriyolarında teratojenik etkileri-Bakır, molibden ve kadmiyumun etkileri. A. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

Zhang C, Fang C, Liu L, Xia G and Qiao H., 2002. Disrupting effects of polychlorinated biphenyls on gonadal development and reproductive functions in chickens. J. Environ. Sci. Health A, 37 (4): 509-519.

8. ÖZGEÇMİŞ

1974'de Konya'da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimini Konya'da tamamladı. 1997'de Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesinden mezun oldu. 1999-2011 yılları arasında Eczacıbaşı İlaç Pazarlama A.Ş.'de uzman olarak görev aldı. 2011 yılı itibarı ile Gıda Tarım ve Hayvacılık Bakanlığı Selçuklu İlçe Müdürlüğünde Veteriner Hekim olarak görev yapmaktadır. Evli ve iki çocuk babasıdır.