

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YUMURTAYA VERİLEN ORGANİK
İNSEKTİSİT FİPRONİL'İN TAVUKLARIN
EMBRİYONİK VE KULUÇKA SONU
ERKEN DÖNEM GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ
ZARARLI ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Haluk ÖZPARLAK

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Konya, 2006

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YUMURTAYA VERİLEN ORGANİK İNSEKTİSİT FİPRONİL'İN
TAVUKLARIN EMBRİYONİK VE KULUÇKA SONU ERKEN DÖNEM
GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ ZARARLI ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Haluk ÖZPARLAK

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 22.09.2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

.....
Yrd.Doç.Dr. Sadettin ÜNSAL
(Danışman)

.....
Prof.Dr. Muhsin KONUK
(Üye)

.....
Prof.Dr. İlhami ÇELİK
(Üye)

.....
Prof.Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK
(Üye)

.....
Yrd.Doç.Dr. Yasemin ÖZNURLU
(Üye)

ÖZET

Doktora Tezi

YUMURTAYA VERİLEN ORGANİK İNSEKTİSİT FİPRONİL'İN TAVUKLARIN EMBRİYONİK VE KULUÇKA SONU ERKEN DÖNEM GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ ZARARLI ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Haluk ÖZPARLAK

**Selçuk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Sadettin ÜNSAL

2006, xii+135 Sayfa

Jüri: Prof.Dr. Muhsin KONUK

Prof.Dr. İlhami ÇELİK

Prof.Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK

Yrd.Doç.Dr. Sadettin ÜNSAL

Yrd.Doç.Dr. Yasemin ÖZNURLU

Organik bir insektisit olan fipronil, pestisitlerin fenil pirazoller veya fiproller olarak bilinen daha yeni ve küçük bir grubuna dahildir. Fipronil geniş spektrumlu bir insektisit olup, zirai alanda, çevre sağlığında ve veteriner hekimlikte pek çok zararlıya karşı etkilidir ve tüm dünyada kullanımı artmaktadır. Bu çalışmanın birinci amacı saf ve ticari fipronilin tavuk embriyolarının gelişimi üzerindeki olası embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin belirlenmesiydi. Bu amaçla asetonda çözdürülmüş saf fipronil ve steril bidistile suda sulandırılmış ticari fipronil

solüsyonları kuluçka başlangıcında dömlü tavuk yumurtalarının hava kamarasına enjekte edildi. Yumurtalar kuluçkanın 15. gününde açılarak grupların ölü ve anormal embriyo sayıları, malformasyon tipleri, canlı ve nispi embriyo ağırlıkları ile embriyoların tepe-kıç boyları (Crown-Rump Length, CRL) belirlendi. Regresyon analizi yöntemiyle saf fipronilin LD₅₀ (Letal Doz %50) değeri 161 µg/yumurta, ticari fipronilin LD₅₀ değeri 383 µg/yumurta olarak tayin edildi. Saf ve ticari fipronil grupları ile kontrol grubu arasında anormal embriyo oranı bakımından farklar istatistiksel öneme sahip değildi. Bununla birlikte saf ve ticari fipronil gruplarında canlı ve rölatif embriyo ağırlıkları ile embriyoların CRL değerlerinin kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde azalma gösterdiği belirlendi. Bu sonuçlar, hem saf hem de ticari fipronilin metabolize olmamış formunun tavuk embriyoları üzerinde önemli embriyotoksik etkiye sahip olduğunu, bununla birlikte teratojenik etkiye sahip olmadığını göstermektedir.

Çalışmanın ikinci aşamasında LD₅₀ ve subletal dozlarda (161 µg/yumurta, 80.50 µg/yumurta ve 40.25 µg/yumurta) saf fipronil kuluçka başlangıcında ve kuluçkanın 8. gününde hava kamarası yoluyla dömlü tavuk yumurtalarına enjekte edildi. Pozitif kontrol olarak aflatoksin B₁ ve siklofosamid kullanıldı. Kuluçkanın farklı günlerinde ve kuluçka sonunda fipronilin embriyotoksik, teratojenik ve genotoksik etkileri yanı sıra immün sistem üzerindeki olası zararlı etkileri değerlendirildi. Kuluçkanın 8. gününde enjekte edilen fipronilin kuluçka öncesi yapılan enjeksiyona kıyasla daha toksik etki gösterdiği belirlendi. Ayrıca Alizarin Red-S ile yapılan boyamalarda, özellikle kuluçkanın 8. gününde enjeksiyon yapılan tüm fipronil gruplarındaki embriyolarda kuluçkanın 11. gününde iskelet sistemi gelişiminde gecikme gözlemlendi. Bu sonuçlar, tavuk embriyolarında bu günlerde karaciğerin fonksiyonel olgunlaşması ve geniş bir metabolik aktivite sahası bulunmasıyla bağlantılı olarak fipronilin metabolitlerinin doğal formundan daha toksik olduğuna işaret etmektedir. Kuluçka başlangıcında fipronil verilen yumurtalardan elde edilen 10 günlük civcivlerin periferik kanındaki akyuvar sayısı, lenfosit ve Alfa Naftil Asetat Esteraz-pozitif (ANAE(+)) lenfosit oranları kontrol gruplarına kıyasla önemli düzeyde azalma gösterdi. Bu veriler metabolize olmamış fipronilin hücrel immünite üzerinde zararlı etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Mikronukleus (MN) testi sonuçları ise bu çalışmada uygulanan

dozlardaki fipronilin ve metabolitlerinin genotoksik etkiye sahip olmadığına işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Fipronil, tavuk embriyosu, LD₅₀, embriyotoksisite, teratojenite, genotoksisite, mikronukleus, ANAE.

ABSTRACT

PhD Thesis

DETERMINATION OF DELETERIOUS EFFECTS OF ORGANIC INSECTICIDE FIPRONIL GIVEN *IN OVO* ON THE DEVELOPMENT OF CHICKENS AT EMBRYONIC AND EARLY POST-HATCH PERIODS

Haluk ÖZPARLAK

Selçuk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assist.Prof.Dr. Sadettin ÜNSAL

2006, xii+135 Pages

Jury: Prof.Dr. Muhsin KONUK

Prof.Dr. İlhami ÇELİK

Prof.Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK

Assist.Prof.Dr. Sadettin ÜNSAL

Assist.Prof.Dr. Yasemin ÖZNURLU

Fipronil, an organic insecticide, is a member of relatively new and small class of pesticides, the phenyl pyrazoles or fiproles group of chemicals. Fipronil is a highly effective, broad-spectrum insecticide that effectively controls a wide range of crop, public hygiene and veterinary pests and its use worldwide is increasing. The first aim of this study was to determine the possible embryotoxic and teratogenic effects of both pure and commercial formulations of fipronil on the development of chicken embryos. For this purpose, solutions of pure fipronil dissolved in acetone and

commercial fipronil diluted with distilled water (20 µl/egg) were injected into the air space of fertilized hen's eggs at the beginning of the incubation. The eggs were opened at 15th day of the incubation and the following parameters of each group were examined: dead and abnormal embryo numbers, malformation types, both live and relative embryo weights and crown-rump lengths (CRL). Regression analysis estimated the LD₅₀ (the 50% lethal dose) for pure fipronil and commercial fipronil to be 161 µg/egg and 383 µg/egg, respectively. The differences in abnormal embryo rates were not statistically significant between the control and the fipronil groups. However, the live and relative embryo weights and embryo CRL values of the fipronil groups were significantly lower than that of the control group. Based on the results, it was concluded that non-metabolized forms of both pure and commercial fipronil have significant embryotoxic effects but no teratogenic effects on chicken embryos.

In the second stage of this study, LD₅₀ and sublethal doses of pure fipronil (161 µg/egg, 80.50 µg/egg and 40.25 µg/egg) were injected into the air space of fertilized hen's eggs at the beginning and 8th day of the incubation. Aflatoxin B₁ and cyclophosphamide were also used as positive controls. Embryotoxic, teratogenic and genotoxic effects of fipronil were evaluated on different days of the incubation and after hatching in addition to its possible deleterious effects on the immune system. Fipronil which was injected at 8th day of the incubation had more toxic effect than that of the pre-incubation injection. Besides, the results of Alizarin Red-S staining demonstrated that all of the fipronil doses injected, especially, at 8th day of the incubation caused retardation in the development of the embryonic skeletal system at 11th day of the incubation. These results indicated that metabolites of fipronil were more toxic than its native form to chicken embryo, related to the functional maturation of liver and a wide range of metabolic activities occurring at these days. In the peripheral blood samples of 10 days-old chickens obtained from the eggs which were treated with fipronil at the beginning of the incubation, leucocyte counts, lymphocyte and Alpha Naphtyl Acetate Esterase-positive (ANAE(+)) lymphocyte proportions were significantly decreased when compared to the control groups. These data revealed that non-metabolized fipronil might have harmful effect on the

cellular immunity. The results of micronucleus (MN) assays pointed out that fipronil and its metabolites had no genotoxic effect at doses tested.

Key Words: Fipronil, chick embryo, LD₅₀, embryotoxicity, teratogenicity, genotoxicity, micronucleus, ANAE.

ÖNSÖZ

Kısıtlı proje imkanlarıyla gerçekleştirilmeye çalışılan bu tez çalışması boyunca her türlü kolaylığı gösteren danışmanım Yrd.Doç.Dr. Sadettin ÜNSAL başta olmak üzere, araştırma laboratuvarlarındaki teçhizatlarla çalışma imkanı veren, kimyasal madde yardımında bulunan, fotoğraf çekimlerinde ve tezin diğer aşamalarında yardımlarını esirgemeyen S.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. İlhami ÇELİK'e, zaman ayırarak değerli önerileri ile çalışmalarına yön veren Prof.Dr. M. Turan AKAY'a, tezin her aşamasında maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr. Abdurrahman AKTÜMSEK'e teşekkürü borç bilirim. Ayrıca tezin özellikle deneme ve laboratuvar çalışmaları esnasında yardımlarını esirgemeyen başta Doç.Dr. Emrah SUR olmak üzere, Yrd.Doç.Dr. Yasemin ÖZNURLU'ya, Yrd.Doç.Dr. Atilla ARSLAN'a, Arş.Gör.Dr. Turgay ÜSTÜNER'e, Arş.Gör. Tuğba TELATAR'a, Arş.Gör. G. Özmen GÜLER'e ve Arş.Gör. Ahmet UYSAL'a; istatistik uygulamaların bir kısmını yapan Yrd.Doç.Dr. Mustafa SEMİZ'e; çalışmayı destekleyen S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne (Bap Proje No: 2003/166) teşekkür ederim.

KISALTMALAR

AF: Asentrik Fragman

AFB₁: Aflatoksin B₁ (Aflatoxin B₁)

ANAE(-): Alfa Naftil Asetat Esteraz negatif

ANAE(+): Alfa Naftil Asetat Esteraz pozitif

CHEST: Tavuk Embriyotoksisitesi Belirleme Testi (Chicken Embryotoxicity Screening Test)

CP: Siklofosamid (Cyclophosphamide)

CRL: Tepe-kıç uzunluğu (Crown-Rump Length)

E I: Primitif alyuvarlar (Primary/Primitive Erythrocytes)

E II: Sekonder alyuvarlar (Secondary/Definite Erythrocytes)

EEÖ: Erken Embriyonik Ölüm

HET: Tavuk Yumurtası Testi (Hen's Eggs Test)

HET-CAM: İritant Etki İçin Tavuk Yumurtası Korioallantoik Membran Testi (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane)

HET-MN: Mikronukleus İndüksiyonu için Tavuk Yumurtası Testi (Hen's Egg Test for Micronucleus Induction)

HH skalası: Hamburger ve Hamilton (1951) skalası

LD₅₀: Letal Doz %50

MB46136: Fipronilin metabolitlerinden fipronil-sulfone

MMC: Mitomisin C (Mitomycin C)

MN: Mikronukleus (Micronucleus)

n: Gruptaki birey sayısı

NA: Çekirdek anormalliği (Nuclear Abnormality)

ng/yum: nanogram/yumurta

PBL: Periferel kan lenfositleri (Peripheral Blood Lymphocytes)

$\bar{x} \pm SS$: Aritmetik Ortalama \pm Standart Sapma

µg/yum: mikrogram/yumurta

µl/yum: mikrolitre/yumurta

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. Fipronil.....	5
2.2. Tavuk Yumurtasının Yapısı ve Tavuklarda Embriyonik Gelişme.....	6
2.3. Kanatlı Embriyoları ile Yapılan Embriyotoksosite ve Teratojenite Çalışmaları.....	11
2.4. Mikronukleus (MN) ve MN Testleri.....	19
2.5. Alfa Naftil Asetat Esteraz (ANAE).....	26
3. MATERYAL ve METOT.....	28
3.1. Kuluçka Başlangıcında Yumurtaya Verilen Saf ve Ticari Fipronilin Tavuk Embriyolarında LD ₅₀ (Letal Doz %50) Tayini ile Embriyotoksik ve Teratojenik Etkilerinin Belirlenmesi.....	28
3.2. Kuluçkanın Farklı Günlerinde Letal ve Subletal Dozlarda Yumurtaya Verilen Saf Fipronilin Embriyolar ve Çıkan Cıvcivler Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi.....	30
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI.....	37
4.1. Kuluçka Başlangıcında Yumurtaya Verilen Saf ve Ticari Fipronilin Tavuk Embriyolarında LD ₅₀ (Letal Doz %50) Değerleri ile Embriyotoksik ve Teratojenik Etkileri.....	37
4.2. Kuluçkanın Farklı Günlerinde Yumurtaya Verilen Saf Fipronilin Tavuk Embriyoları ve Kuluçka Sonu Elde Edilen Erken Dönem Cıvcivleri Üzerindeki Etkileri.....	39
4.2.1. Kuluçka Başlangıcında Letal (LD ₅₀ -161 µg/yum) ve Subletal Dozlarda (80.50 µg/yum ve 40.25 µg/yum) Yumurtaya Verilen Saf Fipronilin Tavuk Embriyoları ve Kuluçka Sonu Elde Edilen Erken Dönem Cıvcivleri Üzerindeki Etkileri.....	39
4.2.2. Kuluçkanın 8. Gününde Üç Farklı Dozda (161 µg/yum, 80.50 µg/yum ve 40.25 µg/yum) Yumurtaya Verilen Saf Fipronilin Tavuk Embriyoları ve	

Kuluçka Sonu Elde Edilen Erken Dönem Cıvcıvleri Üzerindeki Etkileri.....	42
4.2.3. Kuluçkanın 8. Günü Enjekte Edilen Fipronilin Tavuk Embriolarının 11. Gününde Periferal Alyuvarlarındaki MN ve Anormal Çekirdek Oluşumu Üzerine Etkileri.....	46
4.2.4. Kuluçka Başlangıcında Letal (LD ₅₀ -161 µg/yum) ve Subletal Dozlarda (80.50 µg/yum ve 40.25 µg/yum) Saf Fipronil Verilen Yumurtalardan Elde Edilen Cıvcıvlerin 10. Gün Alyuvar ve Akyuvar Sayıları ile Lenfosit ve ANAE(+) Lenfosit Oranları.....	48
4.2.5. Kuluçkanın 8. Gününde Üç Farklı Dozda (161 µg/yum, 80.50 µg/yum ve 40.25 µg/yum) Saf Fipronil Verilen Yumurtalardan Elde Edilen Cıvcıvlerin 10. Gün Alyuvar ve Akyuvar Sayıları ile Lenfosit ve ANAE(+) Lenfosit Oranları.....	50
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	52
6. KAYNAKLAR.....	74
EK A (Tablolar).....	93
EK B (Şekiller).....	114

1. GİRİŞ

Günümüzün en önemli sorunlarından biri hızla artan dünya nüfusunun beslenmesidir ve dünyanın ana besin kaynağını bitkiler teşkil etmektedir. Dünya nüfustaki artışa paralel olarak, erozyon, yeni yerleşim yerlerinin açılması ve yeni fabrikaların kurulması gibi sebeplerle tarıma elverişli alanlar her geçen gün azalmakta, dolayısıyla da birim alandan elde edilen ürün miktarının artırılması zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple modern üretim teknikleri yanında pestisitlerin kullanılması kaçınılmazdır. Pek çok zararlı böcek ve diğer türde hayvanın zararına engel olmak, onları yok etmek yada engellemek için kullanılan kimyasal maddelere veya madde karışımlarına pestisit denilmektedir. Pestisit kullanılmadan üretim yapılması halinde ürün miktarlarında ortalama %65 oranında kayıp olduğu bildirilmektedir. Zirai mücadele yöntemleri içerisinde biyolojik mücadele, organik ve ekolojik tarım gibi tarım ilaçları dışındaki yöntemlerin ise dünyanın en gelişmiş ülkelerinde bile %5'i geçemediği görülmektedir. Bazı hastalık ve zararlılara karşı son yıllarda bulunan dayanıklı çeşitler de gerekli sonucu sağlayamamıştır. Bu sebeplerden dolayı pestisitler bugün bütün dünyada kullanılmasından vazgeçilemeyecek maddeler olarak kabul edilmektedir (Öztürk 1997, Karabay 2000).

Bitkilere zarar veren başta böcek olmak üzere zararlı hayvan populasyonlarına karşı, ülkemizde de en çok uygulanan zirai mücadele şekli kimyasal mücadeledir. Pestisitler kullanıldıkları zararlı gruplarına, zararlının biyolojik dönemine, etki şekillerine, toksik özelliklerine, kullanma tekniğine, formülasyonlarına ve yapısındaki aktif madde grubuna göre sınıflandırılabilir. Kullanıldıkları zararlı gruplarına göre en önemli pestisit grubu ise insektisitler (böcek öldürücüler)'dir. Kimyasal mücadelede kullanılan insektisitler, çevre ve besin kirlenmesi, akut ve kronik zehirlenme, biyolojik dengenin bozulması, insan ve hayvanlarda teratojenik, mutajenik ve karsinojenik etkileri gibi çok yönlü çevre sorunlarının doğmasına sebep olmaktadır. Pestisitlerin hedef türlere olan seçiciliği çok iyi geliştirilememekte ve bu sebeple hedef olmayan türler de sıklıkla etkilenmektedir. Tamamen güvenli bir pestisit geliştirilmesi imkanı olmadığından, günümüzde pestisitlerin ve dolayısıyla

insektisitlerin çevresel etkilerini yansıtacak olan, su, toprak ve hava kirlenmesi düzeylerinin değerlendirilmesi, bunun yanı sıra toksikolojik ve ekotoksikolojik yan etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır (Karabay 2000, SBYKP 2001).

Çevre sağlığı açısından pestisitlerin yapısında bulunan aktif madde grupları son derece önemlidir. Çünkü bunlar canlılar üzerinde akut yada kronik etkiler oluşturup, onların ölümlerine sebep olmaktadır. Yapısındaki aktif madde gruplarına göre pestisitler, inorganik ve organik pestisitler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Organik pestisitler de yine kendi aralarında doğal ve sentetik organik pestisitler şeklinde ikiye ayrılırlar. Sentetik organik pestisitler zirai mücadelede en fazla kullanılan kimyasallardır ve bu sebeple çevre ve organizmalara karşı zararları açısından en önemli pestisit grubunu oluşturmaktadırlar (Ecobichon 1996).

Son yıllarda organik fosforlular, organik klorlular, karbamatlar ve piretroidler gibi klasik insektisit gruplarına kitin sentez inhibitörleri, juvenil hormon taklitçileri ve ektizon agonistlerini içine alan böcek büyüme regülatörleri (insect growth regulators), biyolojik insektisitler (biological insecticides), nikotinoid insektisitler (nicotinoid insecticides) ve fenil pirazol (phenyl pyrazole) grubu insektisitler de dahil olmuştur (Ishaaya 1998, Ishaaya 2001). Yapısındaki klor iyonları sebebiyle modern organik klorlu bir insektisit olarak da kabul edilen fipronil diğer insektisit gruplarına göre daha yeni ve daha küçük bir grup olan fenil pirazoller grubuna dahil olup, tüm dünyada ürün koruma ve tohum ilacı olarak kullanımı artmaktadır. Piretroid, siklodien, organik fosforlu ve karbamat grubu insektisitlere karşı dirençli böcekler fipronile duyarlıdır (Tomlin 2000, Tingle ve ark. 2003). Ülkemizde de patates böceğine, ekin kambur böceğine ve mısır tel kurduna karşı ruhsatlı tarım ilacı olarak kullanılmaktadır (Aydınoğlu ve ark. 2002).

Herbisidal etkilere de sahip olan fipronil geniş spektrumlu bir insektisit olup etki şekli bakımından poliklorlusikloalkanlara (α -endosulfan ve lindane gibi) benzer. Fipronil γ -aminobütirikasit (γ -aminobutyric acid, GABA) reseptörlerini bloke ederek, hedef böceklerin merkezi sinir sistemi üzerinde GABA tarafından kontrol edilen klor kanalları içinden klor iyonlarının geçişine müdahale eder. Bu etki

böceklerde sonu ölümle biten kontrolsüz merkezi sinir sistemi aktivitesine ve paralize sebep olur. GABA kanalları hem omurgalı hem de omurgasız hayvanlarda sinirsel uyarıların iletiminde önemli olmasına rağmen, fipronil omurgalı hayvanlarda GABA reseptörlerine omurgasız hayvanlardakinden daha zayıf bağlanır (Ishaaya 2001, Tingle ve ark. 2003, Casida ve Quistad 2004). Fipronilin GABA reseptörlerine farklı duyarlılığı seçici bir toksisite yaratır ki böceklere ve kenelere memelilerden daha toksik olduğu için veteriner hekimlikte de kullanılmaktadır (Hovda ve Hooser 2002). Özellikle evde beslenen hayvanlar ve çiftlik hayvanları üzerindeki pire, kene, bit ve akarlar karşı fipronil kullanımına ait denemelerden bahsedilirken (Tingle ve ark. 2003), tavuklar üzerinde kullanımına ait bir çalışma yoktur.

Fipronilin memeliler üzerindeki akut, kronik ve subkronik toksisitesi, karsinojenik ve genotoksik etkileri ile üreme ve gelişme üzerindeki etkileri ayrıntılı olarak çalışılmıştır (USEPA 1996a, ACP 1999). Fipronilin kuşlar üzerindeki etkileri ise akut toksisite düzeyinde çeşitli kuş türleri üzerinde araştırılmış ve LD₅₀ (Letal Doz %50) değerleri belirlenmiştir. Akut toksisite çalışmasında sülün, keklik ve bildircin gibi tavuksu kuşların (gallinaceous birds) fipronile serçe, ördek ve kaz gibi kuşlardan çok daha fazla duyarlı olduğu belirlenmiştir (Hamon ve ark. 1996). Bununla birlikte fipronil ve metabolitlerinin kanatlı embriyoları üzerindeki etkilerine ait literatür bilgisi bulunmamaktadır.

Bu tez çalışması ile birinci aşamada, kuluçka başlangıcında dömlü tavuk yumurtalarına enjeksiyon yapılarak, saf ve ticari fipronilin metabolize olmamış yani doğal formlarının tavuk embriyoları üzerindeki LD₅₀ tayini ile olası embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. İkinci aşamada ise letal ve subletal dozlardaki saf fipronil, kuluçka başlangıcında ve kuluçkanın 8. gününde dömlü tavuk yumurtalarına aynı dozlarda enjekte edilerek fipronilin hem metabolize olmamış doğal formunun hem de metabolitlerinin embriyolar ve çıkışta elde edilen civcivler üzerindeki embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra ikinci aşama deneylerinde fipronilin olası genotoksik etkileri, embriyoların periferik kan alyuvarlarındaki mikronukleus (Micronucleus, MN) ve çekirdek anormallikleri (Nuclear Abnormality, NA) incelenerek; kuluçka sonrası elde edilen erken dönem civcivlerinin immün sistemleri üzerindeki olası

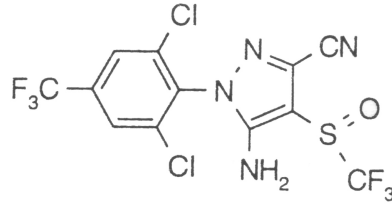
etkileri ise, akyuvar sayıları, lenfosit oranları ve Alfa Naftil Asetat Esteraz (ANAE) enzimi pozitivitesi gösteren T-lenfositlerin oranlarının tespiti ile belirlenmeye çalışılmıştır. Fipronilin kanatlılar için model bir organizma olan tavuk embriyoları üzerindeki etkileri, yaban hayattaki kuşlar üzerinde olabilecek etkilerine ışık tutmasının yanı sıra, önemli zararlara sebep olan pire ve keneye karşı tavuklar üzerinde de güvenli bir şekilde kullanılıp kullanılmayacağı hususunda ön bilgiler sağlayacaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Fipronil

Fenil pirazoller (veya fiproller) grubuna dahil bir insektisit olan fipronilin saf formu küf kokulu beyaz toz halinde olup, kimyasal yapısı ve diğer özellikleri aşağıdaki gibidir;

Kimyasal yapısı:



Kapalı formülü: C₁₂H₄Cl₂F₆N₄OS

Kimyasal adı: 5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-[(1*R,S*)-(trifluoromethyl)sulfinyl]-1*H*-pyrazole-3-carbonitrile

Molekül ağırlığı: 437.2

Erime noktası: 195.5-203°C

pH: 5.9-6.1 (23°C)

Çözünürlüğü: Suda 1.9 mg/l (pH=5), asetonda 545.9 g/l, metanolde 137.5 g/l, diklorometanda 22.3 g/l, toluende 3.0 g/l, hekzende 0.028 g/l (20°C)

Gelişim kodları: MB46030 ve RPA-030 (Rhône-Poulenc) (Tomlin 2000, Tingle ve ark. 2003).

Suda çok az çözünen fipronil normal sıcaklıkta 1 yıl stabildir, ancak metal iyonları varlığında stabil değildir. Fipronil gün ışığında çok sayıda metabolitlerine dönüşmektedir ki bunlar içinde MB46513 (fipronil-desülfinyl) aşırı derecede stabildir ve benzer diğer bileşiklerden çok daha toksiktir (Tingle ve ark. 2003).

Fipronil ilk olarak 1987 yılında keşfedilmiş, 1993 yılında Rhône-Poulenc firması tarafından piyasaya sunulmuş, 1997 yılının sonuna kadar 51 ülkede zirai

kullanım amaçlı, 63 ülkede ise zirai amaçlar dışındaki kullanımlar için ruhsat almıştır. Geniş spektrumlu bir insektisit olan fipronil böceklerde temas ve mide yoluyla etkili olup, çok sayıda böcek türüne karşı zirai ürünleri korumak için tohum ilacı, toprak veya yaprak üstü uygulama yöntemleriyle kullanılmaktadır. Ayrıca ev ve çiftlik hayvanları üzerindeki bit, pire ve keneye karşı kullanımı da yaygınlaşmaktadır (Tomlin 2000, Tingle ve ark. 2003).

Fipronilin akut oral LD₅₀ değerleri sıçanlar için 97 mg/kg, fareler için 95 mg/kg, bildircinlar için 11.3 mg/kg, yeşilbaş ördekler için >2000 mg/kg, sülünler için 31 mg/kg, keklikler için 34 mg/kg, serçeler için 1120 mg/kg ve güvercinler için >2000 mg/kg olarak belirlenmiştir. Diyet karıştırma yöntemi (5 gün) ile LC₅₀ (Letal Konsantrasyon %50) değerleri ise bildircinlar için 49 mg/kg diet ve yeşilbaş ördekler için >5000 mg/kg diet olarak bildirilmiştir (Tomlin 2000).

2.2. Tavuk Yumurtasının Yapısı ve Tavuklarda Embriyonik Gelişme

Tavuk yumurtası, yumurta sarısı olarak da bilinen vitellus tarafından sitoplazmasının tamamına yakını doldurulan yumurta hücresi ile bunun etrafını saran albumin, kabuk altı zarları ve kireç kabuk olmak üzere dört kısımdan oluşur (Şekil 1).

Kireç kabuk, iç (yada mememsi) tabaka, ara süngerimsi tabaka ve yüzey kütikula olmak üzere üç tabakadan meydana gelmekte olup, büyük ölçüde tavuğun besininden elde edilen kalsiyum tuzlarından oluşur. Kabuğun yumurtaya eklenmesi uterus bezlerince gerçekleştirilir. Kireç kabuğun uterusu yapımı yaklaşık 20 saat sürer (Patent 1971, Smith 1997).

Kabuk altı zarları, iç ve dış zar olmak üzere iki adettir. Kalın (50-70 µm) olan dış zar kireç kabuğun hemen altındadır. Albuminden önce gelen iç zar daha incedir (15-25 µm). Bu iki zar arasında, yumurtanın küt ucunda hava boşluğu (hava kamarası, hava hücresi) oluşur (Hamilton 1952, Patten 1971).

Albumin, şalaz dışında hemen hemen homojen bir yapıdadır. Ancak vitellüs yakınındaki albumin periferaldeki albuminden daha yoğundur. Albumin ovaryuma yakın ovidukt kısmında sentezlenir. Albuminin yapısında ovomukoid, ovomusin gibi glikoproteinler ile ovalbumin, ovokonalbumin ve ovoglobulin gibi proteinler bulunur. Albumin embriyoyu mekanik ve kimyasal etkilerden korurken aynı zamanda embriyonun büyümesi esnasında kullanılan besin deposu görevi de yapar (Hamilton 1952).

Vitellus, yumurta hücresinin sitoplazmasındaki depolanmış besin maddesi olup, hem yapı hem de renk bakımından düzenli bir yapıya sahip değildir. Beyaz ve sarı vitellus olmak üzere farklı halkalar içerir. Beyaz vitellusun birikimi latebra adı verilen merkezi bölgede olur. Latebra, germinal diski (blastodisk) yumurtanın merkezine bağlayan bir kanaldır ve embriyonun beslenmesinde rol alır. Germinal disk dömlü yumurtalarda embriyonun gelişmeye başladığı kısımdır. Bu bölge blastoderme doğru yayılır ve pander çekirdeği olarak bilinen bir kitlenin altında bulunur. Latebra ve pander çekirdeğine ilave olarak sarı vitellusun daha kalın tabakaları arasında beyaz vitellusun ince tabakaları vardır. En dıştaki vitellus vitellin membran ile çevrilidir. Bu zar vitellusun dağılmasını önler. Vitellus blastoderm hücreleri tarafından emilen oldukça yüksek oranda besin değerine sahiptir (Hamilton 1952, Patten 1971).

Bol miktarda vitellusa (polilesital) sahip olan tavuk yumurtalarında bölünme ve gelişmeler az miktarda sitoplazma ve çekirdeğin bulunduğu animal kutupta gerçekleşir. Hücre bölünmesi döllenmeden hemen sonra başlar, yumurtanın geri kalanı şekilleninceye kadar devam eder. Hücre bölünmesi 38°C'de devam eder. Bölünme yarıklanma şeklindedir. İlk hücre bölünmesi yumurta istmustan geçerken tamamlanır. Bundan sonraki bölünmeler her 20 dakikada bir meydana gelir ve böylece binlerce hücre tabakası gastrulayı oluşturur (Romanoff 1997).

Kuluçka başladıktan sonra kalınlaşan hücre tabakası embriyonun kuyruk kısmında görünür hale gelmeye başlar. Bu primitif çizgi adını alır. Kuluçkanın 1. günü bitmeden pek çok yeni organ şekillenir. Embriyonun başı ayırt edilebilir,

sindirim sisteminin öncüsü ön bağırsak şekillenir, kan adacıkları görülür ve nöral oluğu oluşturacak olan yarıklık oluşur (Romanoff 1997).

Kuluçkanın 2. gününde nöral oluk şekillenir. Baş bölgesi gelişir. Kulak gelişmeye başlar ve gözdeki mercek oluşur. Kalp oluşurken, kan adacıkları birbirleri ile bağlantı yaparak vasküler sistemi oluşturur. Kuluçkanın 44. saatinde kalp ve damar sistemi bağlanır ve kalp atmaya başlar. İki farklı dolaşım sistemi oluşur. Birincisi embriyo içi embriyonik sistem, ikincisi yumurta içinde yayılan vitellin sistemdir. Embriyonik gelişimin daha sonraki evrelerinde iki farklı embriyo dışı dolaşım sistemi vardır. Vitellin sistem embriyoya vitellustan besinleri aktarır. Allantoik damarlardan oluşan diğer bir dolaşım sistemi solunum ve allantoisteki atık ürünlerin saklanması ile ilişkilidir. Cıvcıv yumurtadan çıktığı zaman her iki dolaşım sistemi de işlevini durdurur (Romanoff 1997).

Kuluçkanın 3. günü sonunda gaga gelişmeye başlar, kanat ve bacak tomurcukları görünür. Başın ve boynun iki tarafında üç visseral yay gelişir. Bu oluşumlar arterial sistem, kulaktaki östaki borusu, yüz, çene ve bazı kanalsız bezlerin gelişiminde önemlidir. Embriyo, korunma amacıyla sıvı ile dolu amnion ile çevrelenir. Kuyruk ortaya çıkar ve allantois görünür. Allantoik kese solunum ve boşaltım organıdır. Embriyo albuminden beslenir ve kabuktan kalsiyum embriyoya allantoisten aktarılır. 3 günlük embriyoda solunum sisteminin farklılaşmasının ilk göstergesi faringeal bölgenin posteriorunda laringo-trakeal oluğun oluşmasıdır. Laringo-trakeal oluk farinksin arka kısmından evaginasyon ile meydana gelir. Daha sonra bu yapı trake olarak kaudale doğru büyür. Trake özofagus ile yaklaşık olarak paralel ve ventralde bulunur. Trakeal büyüme uzadıkça kaudal kısım ikiye ayrılarak akciğer tomurcuklarını oluşturur (Romanoff 1997).

Kuluçkanın 4. günü boyunca torsiyon ve fleksiyon devam eder. Embriyonun vücudu 90° döner ve vitellusun üzerinde sol tarafa doğru kayar. Baş ve kuyruk birbirine çok yakındır. Bu hali ile embriyo "C" şeklindedir. Sindirim ve solunum sisteminin bir parçası olan ağız, dil ve nasal açıklık gelişir. Kalp büyümeye devam eder. Kuluçkanın 4. günü sona ererken embriyo yaşamak için ihtiyaç duyduğu tüm organlara sahiptir ve embriyonun tüm kısımları tanımlanabilir (Romanoff 1997).

Kuluçkanın 7. gününde kanat ve ayak parmakları görünür hale gelir, kalp bütünüyle torasik boşluğu doldurur ve embriyo büyük ölçüde kuşa benzer. Kuluçkanın 10. gününden sonra tüyler görünür ve gaga sertleşir. 14. günde pençeler şekillenir ve embriyo yumurtadan çıkmak için pozisyonunu alır. Albumin desteği 16. günde tükenir. Böylece vitellus besin için temel kaynak olur. 18. günün sonunda gaga hava boşluğunu deler ve akciğer solunumu başlar. 20. gün sonunda civciv yumurtadan çıkma pozisyonundadır (Romanoff 1997).

Akciğer olarak hizmet eden allantois, civciv kendi akciğerlerini kullandıkça kurumaya başlar. Kuluçka başlangıcından 21 gün sonra yumurta dişi denilen gaganın üst kısmındaki sert boynuzumsu yapı ve boynun arka kısmında bulunan kasların yardımıyla yumurta kabuğu kırılır. Yumurtadan tamamen kurtulan civcivin göbek açıklığı kapanır ve kurumaya başlar. Civciv yumurtadan çıktıktan birkaç gün sonra gaga üzerindeki boynuzumsu yapı düşer. Protein, yağ, vitamin, mineral ve su açısından oldukça zengin olan vitellus yumurtadan çıktıktan sonra saatlerce civciv için besin sağlayabildiğinden, yumurtadan çıkan civciv 72 saat boyunca beslenmeksizin yaşayabilir (Romanoff 1997).

Embriyotoksisite açısından önemli bir kriter olan ağırlık artışının tavuk embriyolarının gelişimindeki günlük değerleri aşağıdaki gibidir (Romanoff 1997);

1. gün: 0.0002 g
2. gün: 0.003 g
3. gün: 0.02 g
4. gün: 0.05 g
5. gün: 0.13 g
6. gün: 0.29 g
7. gün: 0.57 g
8. gün: 1.15 g
9. gün: 1.53 g
10. gün: 2.26 g
11. gün: 3.68 g
12. gün: 5.07 g
13. gün: 7.37 g
14. gün: 9.74 g
15. gün: 12.00 g
16. gün: 15.98 g
17. gün: 18.59 g
18. gün: 21.83 g

19. gün: 25.62 g
20. gün: 30.21 g
21. gün: Yumurtadan çıkış

Bu çalışmada canlı ve ölü embriyoların gelişme evrelerinin belirlenmesinde kullanılan Hamburger ve Hamilton (1951) skalasına (HH skalası) göre tavuk embriyosunun gelişme evreleri kuluçka günlerine göre aşağıdaki gibi olup, bu skala Şekil 2’de görülmektedir;

- Evre 1 (Sulkus Primitivus Öncesi Evre): 0-6. saatler
Evre 2 (Başlangıç 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 (Baş Çıkıntısının Geliştiği Evre): 19-22. saatler
Evre 6 (Baş Kıvrımının Oluştığı 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 36: 10. gün
Evre 37: 11. gün
Evre 38: 12. gün

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

2.3. Kanatlı Embriyoları ile Yapılan Embriyotoksitate ve Teratojenite Çalışmaları

Kanatlı embriyoları kullanılarak çeşitli mikotoksinlerin (Cilieveci ve ark. 1980, Vesely ve ark. 1982, Prelusky ve ark. 1987, Vesely ve Vesela 1991, Çelik ve ark. 2000, Henry ve Wyatt 2001), metallerin ve alaşımlarının (Mas ve Arola 1985, Gilani ve Alibhai 1990, Kaya ve ark. 1995, Yılmaz 1997, Durmus 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, Korhonen ve ark. 1983, Chibber ve Gilani 1986, Özcan 1992), çözücülerin (Ameenuddin ve Sunde 1984) 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 araştırmalar mevcuttur. Organik klorlu, organik fosforlu, karbamat, piretroit, fumigant ve kitin sentez inhibitörü gibi klasik insektisitlerin kanatlı embriyoları üzerindeki embriyotoksik, teratojenik ve diğer etkilerine ait aşağıda bahsedilen çeşitli çalışmalar bulunmakla birlikte, fenil pirazol grubuna ait yeni nesil insektisitlerin etkilerine ait literatür bilgisine rastlanmamıştır.

Organik fosforlu insektisit fenitrothion, teratojenik etkilerinin belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda dömlü tavuk yumurtalarının sarısına kuluçkanın 4. gününden 12. gününe kadar değişik evrelerde enjekte edilmiş, daha geç embriyonik dönemlerdeki enjeksiyonun daha az toksik olduğu gözlenmiştir (Paul ve Vadlamudi 1976).

Organik fosforlu insektisit azodrin'in kanatlı gelişimi üzerindeki etkileri, döllu keklik yumurtaları ile iki farklı tavuk ırkına ait yumurtalar üzerinde enjeksiyon yöntemi ile çalışılmış ve boyun kıvrımının uzamasını yavaşlattığı tespit edilmiştir (Schom ve Abbott 1977).

Organik fosforlu insektisit dicrotophos, döllu tavuk yumurtalarının sarısına kuluçkanın 4. günü tibiotarsus deformasyonlarını tespit etmek için enjekte edilmiş ve bacak kemiklerinin uzamasını baskıladığı, ışık ve elektron mikroskopik gözlemlerde ise kemiklerin büyüme plağının oluşmaması, kondrositlerin salgısal aktivitesinin azalması, kemik lamellerin bozuk ve asimetrik birikmesi gibi histopatolojik etkiler belirlenmiştir (Meinzel ve ark. 1979).

Organik fosforlu insektisit dichlorvos, kuluçkadan önce döllu bıldırcın yumurtalarına enjekte edilerek eşey hücreleri populasyonu üzerindeki etkileri incelenmiş ve embriyonik gelişimin 24. evresindeki eşey hücrelerinin 29. evreye kıyasla daha az zarar görmüş olduğu belirlenmiştir (Bruel ve David 1980).

Organik fosforlu insektisit metathion, teratojenik etkilerinin belirlenmesi amacıyla iki farklı dozda eşit ağırlığa sahip döllu tavuk yumurtalarının sarısına kuluçkanın 2. günü steril şartlarda enjekte edilmiştir. 14., 18. ve 21. günlerde Alizarin Red-S boyama yöntemiyle iskelet anormallikleri incelenmiş, papağan tipi gaga, bacaklarda kısılma ve kalınlaşma, ağırlık kaybı, total ve kısmi ödem ile tüylenmede bozukluklar tespit edilmiştir (Rashev ve Vasilev 1982).

Organik fosforlu insektisitler diazinon ve dicrotophos, ekstremite ve vertebralar üzerindeki teratojenik etkilerinin belirlenmesi amacıyla kuluçkanın 3. günü döllu tavuk yumurtalarına enjekte edilmiş, 5. günden 17. güne kadar embriyolarda Alcian Blue ve Alizarin Red-S ile kıkırdak ve kalsifiye kemik boyamaları yapılmıştır. Özellikle 9. günden itibaren femur, tibia, metatarsus ve parmak gelişiminde inhibisyon gözlenmiştir (Misawa ve ark. 1982).

Sentetik piretroit decamethrin'in saf ve ticari formülasyonları, farklı dozlarda döllu bıldırcın yumurtalarının vitellusuna enjeksiyon veya yumurta kabuğuna

spreylenme yöntemi ile uygulanmış ve beş günlük embriyoların eşey hücresi popülasyonu üzerindeki olumsuz etkileri incelenmiştir (David 1982).

Organik fosforlu insektisit diazinon, sebep olduğu kısa ve çarpık boyunun anatomik kökenini açıklamak için 48 saatlik tavuk embriyolarına değişik dozlarda enjekte edilmiş, 96. saatte histolojik ve 19. günde de makroskopik gözlemler yapılmıştır. Bu çalışma ile diazinon'un başlıca etkisinin nöral tüpten ziyade notokord üzerinde ortaya çıktığı, kısa boyunun notokord katlanması sonucu oluştuğu ve çarpık boyunun ise notokord katlanmasıyla ilgili olmadığı belirlenmiştir (Wytttenbach ve Hwang 1984).

Organik fosforlu insektisit Wofatox 50 EC (%50 metylparathion) iki farklı dozda kuluçkanın 12. gününde dömlü tavuk ve sülün yumurtalarının hava kamerasına enjekte edilmiş ve bu maddenin vücut ağırlığında önemli oranda azalmaya, gelişim malformasyonlarına ve yüksek dozda embriyonik ölümlere sebep olduğu saptanmıştır (Varnagy ve Deli 1985).

Organik fosforlu insektisit malathion, kuluçkanın 24., 48. ve 72. saatlerinde tavuk embriyolarına enjekte edilmiş ve enjeksiyondan 48 saat sonra embriyolardan seri kesitler alınarak histolojik açıdan değerlendirmeler yapılmıştır. Embriyoların notokord, omurilik, gövde, göz, diensephalon, kardiyovasküler ve kuyruk yapılarında doza ve evreye bağlı olarak çeşitli deformasyonlar gözlenmiştir. Bu çalışma ile embriyoların ne kadar erken evrede ise o kadar duyarlı olduğu belirlenmiştir (Wytttenbach ve Thompson 1985).

Organik fosforlu insektisitler tri-o-cresyl phosphate ve leptophos, geç nörotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla kuluçkanın 14. gününde tavuk yumurtalarında albümine enjekte edilmiş, yumurtadan çıkan civcivlerde bacak sinirlerinde çok sayıda dejenere olmuş sinir fibrilleri gözlenmiştir (Sheets ve Norton 1985).

Organik fosforlu insektisit dicrotophos (Bidrin), notokord gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla farklı dozlarda dömlü tavuk yumurtalarına kuluçkanın 8. saatinden itibaren 96. saatine kadar belli aralıklarla enjekte edilmiş ve

kuluçkaya 48 saat daha devam edilmiştir. Özellikle 48. saatteki dicrotophos muamelesi notokortda boyun bölgesinde şiddetli katlanmaya sebep olmuştur (Garrison ve Wyttenbach 1985).

Wofatox 50 EC (%50 methylparathion), sebep olduğu morfolojik değişiklikler ile biyokimyasal parametreler arasındaki ilişkinin belirlenmesi için iki farklı konsantrasyonda döllu tavuk yumurtalarının hava kamarasına kuluçkanın 12. günü enjekte edilmiş, 19. günde boyun ve femur kaslarından alınan örneklerde histolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler yapılmıştır (Deli ve ark. 1985).

Organik fosforlu insektisitler parathion ve methylparathion döllu tavuk yumurtalarına kuluçkanın 4. veya 8. günlerinde enjekte edilmiş, 18. gün embriyolardan alınan boyun kaslarının protein modelleri analiz edilmiştir. Bu çalışma ile parathion ve türevlerinin kaslar üzerindeki etkisinin belirli hücre iskeleti proteinlerinin miktarını azaltmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür (Deli ve Kiss 1988).

Organik fosforlu insektisitler fenthion, fenitrothion ve desbromoleptophos, organik fosforuların indüklediği geç nörotoksisiteyi tespit etmek amacıyla döllu tavuk yumurtalarında albümine kuluçkanın 15. gününde enjekte edilmiş, 18. ve 21. gün embriyolarında ve yumurtadan çıkıştan sonra asetilkolinesteraz, nörotoksik esteraz aktivitesi ve yürüme anormallikleri değerlendirilmiştir (Farage-Elawar ve Francis 1988).

Diazinon ve parathion ile yapılan başka bir çalışmada, kuluçkanın 48. ve 72. saatlerinde döllu keklik yumurtalarına değişik dozlarda enjeksiyon yapılmış ve parathion'un iskelet kusurları oluşumunda diazinon'dan daha etkili olduğu gözlenmiştir (Meneely ve Wyttenbach 1989).

Organik klorlu insektisitler p,p`-DDT ve o,p`-DDT farklı dozlarda kuluçkanın 1. gününde döllu bıldırcın yumurtalarında albümin içine enjekte edilmiş, yumurtadan çıkma oranı ve yumurtadan çıkan civcivler üzerinde bu insektisitlerin uzun süreli etkileri incelenmiş, bu iki DDT izomerinin yumurtadan çıkıştan sonraki 5 hafta içinde canlılık oranını, üreme davranışlarını ve yumurtlama sayısını azalttığı,

yumurta kabuğu malformasyonlarını artırdığı ve tüy morfolojisini etkilediği gözlenmiştir (Bryan ve ark. 1989).

Organik klorlu grubuna dahil poliklorlusikloalkan türü insektisitlerle yapılan bir çalışmada, teratojenik etkilerini belirlemek amacıyla dömlü tavuk yumurtalarına kuluçkanın 4. ve 6. günleri enjeksiyon yapılmıştır. 16. ve 18. günlerdeki makroskopik incelemeler sonucu bacak deformasyonları, ödem, kanama ve ekzoftalmus gözlenmiştir (Seifert 1989).

Karbamat grubu insektisitlerden carbaryl ve aldicarb değişik dozlarda dömlü tavuk yumurtalarına kuluçkanın 15. gününde enjekte edilmiş ve uygulamadan sonraki günlerde nörotransmitter seviyeleri ve davranış bozuklukları incelenmiştir (Farage-Elawar ve Blaker 1992).

Wofatox 50 EC (%50 methylparathion) ile yapılan başka bir çalışmada sülün yumurtalarının hava kamarasına dört farklı dozda enjeksiyon gerçekleştirilmiş ve teratolojik etkiler makroskopik ve kan plazmasındaki biyokimyasal değerler açısından değerlendirmeler yapılmıştır (Varnagy 1992).

Organik fosforlu insektisit RPR-V üç farklı dozda dömlü tavuk yumurtalarının sarısına kuluçkanın 4. gününde enjekte edilmiş, 20. günde ve yumurtadan çıktıktan sonra teratolojik parametreler üzerinde değerlendirmeler yapılmıştır. Doz arttıkça yumurtadan çıkma oranı azalmış, deformasyon oranı artmış, Alizarin Red-S ile boyanan embriyolarda iskelet deformasyonları belirlenmiştir (Rao ve ark. 1992).

Methylparathion ile yapılan başka bir çalışmada dömlü tavuk yumurtalarının sarısına farklı evrelerde enjeksiyon yöntemi ile teratojenik etkileri belirlenmeye çalışılmış, vücut ağırlığında ve uzunluğunda azalma, bacak kemiklerinde kısalma ve kısa boyun gibi çok çeşitli büyüme anormallikleri gözlenmiştir (Kumar ve Devi 1992).

Organik fosforlu insektisit oxydemeton-methyl altı farklı dozda 12. evre tavuk embriyolarına yumurta kabuğunda pencere açılarak topikal olarak uygulanmış ve teratojenik etkilerine bakılmıştır. 41. evrede (15. gün) yapılan otopsielerde artan doza

bağlı olarak iç ve dış malformasyonlarda artış, ağırlıkta ve vücut uzunluğunda azalma gözlenmiştir (Lenselink ve ark. 1993).

Methylparathion ve parathion ile yapılan bir başka çalışmada, bu insektisitlerin sulu süspansiyon veya emülsiyonları kuluçkanın 9. gününde bıldırcın, 12. gününde sülün ve tavuk yumurtalarına hava kamarası yoluyla enjekte edilmiştir. Methylparathion toksik etki göstermezken, parathion uygulanan gruplarda ölü ve anormal embriyo sayıları ile embriyo ağırlıklarının kontrol grubundan önemli fark gösterdiği belirlenmiştir (Varnagy 1995).

Organik klorlu insektisitler PCB 126 (3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl) ve TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) kuluçkadan önce farklı dozlarda tavuk yumurtalarına enjekte edilmiş, yumurtadan çıkış oranı, yumurtadan çıkışın ilk 24 saati içinde iç organ ağırlıkları ve ödem gibi gelişim anormallikleri değerlendirilmiştir (Powell ve ark. 1996).

Kitin sentez inhibitörü flufenoxuron kuluçkanın 48. saatinde dömlü tavuk yumurtalarına enjekte edilmiş, 5, 7 ve 9 günlük muamele edilmiş embriyolarda vücut ağırlığının ve uzunluğunun önemli düzeyde azaldığı ve teratojenik etkiye işaret eden göz ve boyun anormallikleri gözleendiği, histolojik olarak da hücre farklılaşmasının geciktiği bildirilmiştir (El-Sayyad ve ark. 1996).

Organik klorlu insektisitlerin rezidüleri ile ilgili yapılan bir çalışmada, yaban hayattan toplanan 1000 adet çift ibikli karabatak yumurtasından elde edilen ekstrakt dört farklı konsantrasyonda dömlü tavuk yumurtalarının sarısına kuluçkadan önce enjekte edilmiştir. Kullanılan en yüksek konsantrasyon yumurtadan çıkışta %77 ölüm oranına sebep olmuştur ki, bu değer bir karabatak yumurtasından ortalama elde edilen organik klorlu rezidülerini ihtiva eden konsantrasyondur (Powell ve ark. 1997).

Organik fosforlu insektisit Sumithion 50 EC (%5 fenitrothion) ve herbisit Fusilade S (%12.5 fluazifop-P-butyl) bireysel ve kombine etkilerini tespit etmek amacıyla dömlü sülün yumurtalarının hava kamarasına kuluçkanın 12. gününde farklı konsantrasyonlarda enjekte edilmiş, 23. günde ölüm oranı, vücut ağırlığı, morfolojik

değişiklikler ve boyama yöntemi ile iskelet anormallikleri tespit edilmiştir. Bu çalışmada bu iki maddenin birlikte kullanılmasının, tek tek kullanılmasıyla ortaya çıkan toksik/teratojenik etkileri azalttığı şeklinde ilginç bir sonuç bulunmuştur (Varga ve ark. 1999).

Çeşitli pestisit gruplarına dahil parathion, methylparathion, carbendazim, 2,4-D-amine Na ve phosmethylene'in indirgenmesi ile ilgili ekotoksikolojik bir çalışma amacıyla döller tavuk, bildircin veya sülün yumurtlarının hava kamarasına enjeksiyon yada tavuk yumurtalarına immersiyon yöntemiyle bu pestisitler uygulanmış ve rezidüleri analiz edilmiştir. Ayrıca bu rezidülerin embriyoları doğrudan etkilediği, normal gelişimlerini bozduğu, patofizyolojik ve morfolojik değişikliklere sebep olduğu belirtilmiştir (Varnagy 1999).

Organik klorlu insektisit PCB 126, yaban hayatta bu insektsite maruz kalan embriyolar üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için, laboratuvar şartlarına uyarlamak amacıyla tavuk embriyosu modeli üzerinde incelenmiştir. Bu amaçla PCB 126 farklı konsantrasyonlarda döller tavuk yumurtalarının hava kamarasına kuluçkadan önce enjekte edilmiş, kuluçkanın 20. gününde timus ve bursa Fabricii üzerinde yapılan incelemelerle immünotoksik etkiler belirlenmiştir (Fox ve Grasman 1999).

Organik fosforlu insektisitler chlorpyrifos, parathion, acephate ve trichlorfon'un asetilkolinesteraz inhibisyonunu embriyoların tüm beyin homojenatlarında değerlendirmek amacıyla döller tavuk yumurtalarına enjeksiyon yöntemi kullanılmıştır (Lesser ve ark. 2000).

Fumigant insektisitlerden 1,2-dibromoethane'in (ethylene dibromide) embriyotoksik etkilerini belirlemek amacıyla kuluçkanın 3., 4. ve 5. günlerinde döller tavuk yumurtalarına uygulanmış ve elde edilen veriler sıçan embriyo kültürü ile elde edilen sonuçlarla uyumlu çıkmıştır. Bu çalışma ile tavuk embriyolarının embriyotoksikite çalışmaları için uygunluğuna dikkat çekilmiştir (Dusek ve ark. 2001).

Organik fosforlu insektisit BI 58 EC'nin (%38 dimethoate) teratojenik etkilerini belirlemek amacıyla iki yöntemle test edilmiştir. Birinci yöntemde döller

tavuk yumurtalarının hava kamarasına kuluçkanın 12. gününde insektisit emülsiyonu enjekte edilmiş, ikinci yöntemde aynı gün yumurtalar 30 dakika insektisit solüsyonuna immersiyon yoluyla maruz bırakılmış, kuluçkanın 13., 15. ve 19. gününde embriyo örneklerinde rezidü miktarları ölçülmüş, morfolojik değerlendirmeler yapılmıştır (Varnagy ve ark. 2001).

Dimethoate ile Cu-sülfat ve Cd-sülfat, tek ve kombinasyonlar şeklinde döllu tavuk yumurtalarına hava kamarası yoluyla kuluçkanın 12. günü enjekte edilmiş ve 19. günde değerlendirmeler yapılmıştır. Bu çalışma ile kombine kullanımın bu ağır metallerin tek kullanımından daha yüksek toksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir (Budai ve ark. 2001). Dimethoate ve Cu-sülfat ile yapılan başka bir çalışmada ise enjeksiyon yolu ile kombine uygulamanın immersiyon yöntemine göre daha yüksek embriyotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Budai ve ark. 2002).

Fenitrothion ile yapılan bir başka çalışmada bu insektisit birinci deneyde döllu tavuk yumurtalarının hava kamarasına kuluçkanın başlangıcında ve 12. günlerinde enjekte edilmiş, ikinci deneyde yumurtalar immersiyon yöntemiyle bu insektisite maruz bırakılmıştır. Daha sonra alınan örneklerdeki rezidü miktarları tespit edilmiş ve enjeksiyon yöntemi ile dışardan maruz bırakma yöntemlerinin birbirinin yerini alamayacağı, ancak enjeksiyon yönteminin toksikolojik çalışmalarda yumurta uygulamaları için yararlı bir teknik olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Varga ve ark. 2002).

Organik fosforlu insektisit dimecron iki doz şeklinde kuluçka başlangıcında döllu tavuk yumurtalarının sarısına uygulanmıştır. İnsektisit ile muamele edilen embriyolarda büyümede gerileme ve organojenezde önemli anormallikler, ayrıca karaciğer ve böbrekte her iki dozda da önemli histopatolojik etkiler gözlenmiştir (Sahu ve Ghatak 2002).

1,2-dibromoethane ile yapılan başka bir çalışmada kan yapımı üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla, döllu tavuk yumurtalarına kuluçkanın 3. gününde kabukta pencere açarak intraamniyotik yöntemle uygulanmıştır. Bu çalışma ile erken evre tavuk embriyolarının, ksenobiyotiklerin kan yapımı üzerinde uzun süreli

etkilerini araştırmak için memeli modellerine karşı uygun bir alternatif olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Dusek ve ark. 2003).

2.4. Mikronukleus (MN) ve MN Testleri

Mikronukleus (Micronucleus, Micronuclei, MN) ışık mikroskopuyla görülebilen, bir hücrenin sitoplazmasında bulunan, hücrenin ana çekirdeği ile benzer boyanan, incelenen hücrenin tipine bağlı olarak hücre çekirdeğinin üçte birinden büyük olmayan ve çoğunlukla yuvarlak veya hafif oval şekilli partiküllerdir. Bununla birlikte ışık mikroskopuyla görülemeyen, yalnızca elektron mikroskopuyla tespit edilebilecek kadar küçük MN'ler de olabilir. MN'ler tipik iki zardan oluşan bir çekirdek zarfına, nükleer laminaya ve çekirdek porlarına sahiptirler. Biyokimyasal yapısına bakıldığında MN'ler DNA sentezleme ve eğer çekirdekçik organizatör bölgesine (Nucleolus Organizer Region-NOR) sahip bir kromozom parçası ise RNA, mRNA ve rRNA da sentezleme yeteneğine sahiptirler (Müller ve Streffer 1994).

MN, mitoz bölünmenin metafaz-anafaz geçişi esnasında oluşur. MN'ler, bir kromozomun kutuplara çekilmesi sırasında gerçekleşen anöjenik (kromozom kaybına sebep olan) bir olay sonucu tümüyle kaybı yada klastojenik (kromozom kırılına sebep olan) bir olay sonucu asentrik (sentromersiz) bir parçasının kırılıp kardeş hücrelere ulaşamaması sonucu şekillenebilirler (Fenech ve ark. 1999).

İyonizan radyasyon ve pek çok kimyasal mutajen, kromozomlarda büyük, çok sayıda ve çoğunluğu ışık mikroskopuyla da görülebilen yapısal bozukluğa yol açar. Bu bozukluklar, DNA tamir teorisi ve iyonizan ışınların kullanıldığı radyo biyolojide biyolojik dozimetre, klinik sitogenetik ve çeşitli maddelerin kimyasal ve elektromanyetik alanlar gibi fiziksel etkenlerin çevresel etkilerinin değerlendirmesinde bir çok pratik uygulama alanı olan testlerin temel teorisini şekillendirmektedir. “Asimetrik Olaylar” veya “Kararsız Kusurlar” da denen kromozom bozukluklarında, kromatidlerin kromozomal mikrotubuluslara tutunma bölgeleri olan kinetokor ve sentromerleri oluşmaz. Böyle kromozom parçaları

“Asentrik Fragmanlar (AF)” olarak da bilinirler. Hücre bölündüğünde bunların bazıları yeni oluşan hücre çekirdeğinin yapısına giremez ve ayrılarak sitoplazmada küçük, ekstra çekirdekleri yani MN’leri, tek başlarına veya diğer yapılarla birlikte şekillendirirler. Böyle MN’ler yeni hücrelerin sadece birinin yada her ikisinin sitoplazmasında görülürler. Çekirdeğe dahil olmayan parçanın kökenine bağlı olarak, yeni oluşan hücrelerin sadece biri, yada her ikisi genetik kayıptan etkilenir. Bazı olaylarda bu kusurlar, mitoz bölünmenin anafazında ayrılma kusurlarına (köprüleşmelere) ve aynı zamanda da parça kayıplarına öncülük ederler. Bu olaylar en sonunda, hücre bölünmesinin durmasıyla ölçülebilen ve birkaç bölünmenin gerçekleşmesinden sonra hücre ölümüyle sonuçlanır. Bu yüzden zamanla bir akut radyasyon dozu veya çok kısa ömürlü bir klastojene (kromozom kırıklarına yada DNA replikasyonu sırasında homolog kromatidlerde karşılıklı parça değişimi veya birleşmelerine yol açan etken) maruz kalma sonucu ortaya çıkan MN şekillenmesi en sonunda durur ve yeni hücrelerdeki MN frekansı uygulama öncesi kontrol seviyesine (muamele edilmeden önceki düzeye) döner (Savage 2000).

Bir hücrede bulunan AF sayısı ile o hücrede oluşan MN sayısı arasında basit bir bağıntı kurulmasını engelleyen ve kritik sayısal sonuçlara ulaşmayı zorlaştıran pek çok faktör bulunmakla birlikte; yapılan deneysel çalışmalar, bir etkenin genotoksik etkisinin hücrelerdeki MN bulunma sıklığında (MN frekansı) sebep olduğu sayısal artışla ortaya konulabileceğini göstermiştir. Bu bulguya dayanılarak, interfaz hücrelerinde MN sayısının saptanması suretiyle yapılan genotoksisite belirleme yönteminin, daha zor ve zaman alıcı olan mitozun metafaz evresinde kromozomlardaki yapısal ve sayısal sapmaların analizi yöntemlerinin yerine geçebileceği ileri sürülmüş ve bu amaçla MN belirleme testi geliştirilmiştir. Mutajenlerin genotoksik etkilerinin incelenmesinde ve özellikle de sayısal cevaplar gerektiğinde MN analizi oldukça iyi sonuçlar veren bir yöntemdir ve oldukça mantıklı sonuçlar elde edilebilir. Bununla birlikte, pek çok analiz yönteminde olduğu gibi bu analiz sisteminde de yeterli tecrübeye sahip olunmaması durumunda pek çok zorlukla karşılaşılabilir (Savage 2000).

MN sayımı, lenfosit ve fibroblast kültürleri ile epitel hücresi döküntülerinde de yapılabilmektedir. Hatta doku kesitlerinde de MN sayımı yapılan çalışmalardan

bahsedilmektedir. Günümüzde MN indeksi, genetik toksisite belirleme (genotoksisite) çalışmalarında standart sitogenetik testlerden biri haline gelmiştir. Standart MN testinde; etkisi incelenecek olan madde hücre kültürüne ilave edilir. Takiben, mitojen (Örneğin; phytohemagglutinin, PHA) ilavesiyle mitoz bölünmeye sevk edilen hücreler, mitozun karyokinez aşamasını tamamladıktan sonraki kritik bir evrede sitokinezi (kardeş hücrelerin çekirdeklerinin şekillenmesini takip eden sitoplazma bölünmesi) durduran bir maddenin (Örneğin; Cytochalasin B, Cyt-B) ilave edilmesinden sonra iki çekirdekli (dikaryotik) hücreler oluşturulur. Böyle hücrelerde yapılan incelemede oluşan MN'ler daha kolayca tanınabilirler. Sitogenezis-Blok MN (Cytokinesis-Block Micronucleus, CBMN) testiyle kromozom kırıkları, kromozom kayıpları, nondisjunction, nekroz, apoptozis ve sitostazis (kılcal damar lümenlerinin akyuvarlarca tıkanması) gibi bozukluklar da belirlenmektedir. Ayrıca bu yöntemle mukoza epitel hücreleri (ağız, burun, bronş ve ürogenital sistemin eksofoliyatif hücreleri gibi) de incelenebildiğinden yöntem, çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanların sitogenetik etkilerinin belirlenmesi amacıyla eksofoliyatif sitolojide de yaygın biçimde uygulanan bir teknik haline gelmiştir. Bununla birlikte MN, epitelin yüzey kısmında bulunan hücrelerde gözlenmezken bazal kısmında bulunan hücrelerde gözlenmektedir (Müller ve Streffer 1994, Fenech 2000, Kirsch-Volders ve Fenech 2001, Fenech ve ark. 2003, Güven 2005). Kromozomlardaki yapısal ve sayısal bozuklukların belirlenmesinde en çok kullanılan, basit ve hızlı bir yöntem olan MN testi, OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), ICH (International Conference on Harmonization), EU (European Union) ve USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) tarafından bilimsel bir yöntem olarak kabul edilmiştir (USEPA 1996b, Wolf ve ark. 2002, Wolf ve ark. 2003).

Periferal kan lenfositlerindeki (Peripheral Blood Lymphocytes, PBL) kromozom hasarlarının bir göstergesi olarak MN indüksiyonundan yararlanılabileceği ilk kez Countryman ve Heddle (1976) tarafından ileri sürülmüş ve takiben de karyokinezin tamamlanmış olduğu hücrelerde sitokinezin bloke edilmesiyle oluşan iki çekirdekli hücrelerde MN sayımı yöntemi geliştirilmiştir. Testin bir parçası olarak çeşitli mesleki ve çevresel ortamlarda yada yaşam stilinin bir parçası olarak genotoksik ajanlara maruz kalan insan popülasyonlarındaki

kromozom hasarının varlığının ve derecesinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Bonassi ve ark. 2001).

Orijinal MN testi tekniği *in vitro* koşullarda gerçekleştirilir ve genotoksisite ile sitotoksisite hakkında önemli bilgiler sağlar. Bu teknikte dikkate alınan kriterler; kromozom kırıkları, kromozom kaybı, kromozomların iç yapılarının yeniden tertiplenmesi, gen amplifikasyonu, nekroz, apoptozis ve sitotoksisite veya hücre çoğalmasdır. MN belirleme testi; özellikle kanser riskinin belirlenmesinde, kromozom ve genom mutasyonlarının saptanması ile genotoksik ajanların belirlenmesinde, gerek *in vivo* ve gerekse de *in vitro* olarak uygulanmaktadır. Sonuç olarak MN testi, mitozla bölünen hücrelerde oluşan genotoksik değişikliklerin ortaya konmasında güvenle uygulanabilen bir tekniktir. MN testi, yeni geliştirilen bir çok etken maddenin pazara sunulmadan önce zararlı etkilerinin belirlenmesi amacıyla yönelik olarak geçmesi gereken test grubundaki testlerden biridir (Fenech 2000).

MN testi, çevresel kirleticilerin mutajenik etkilerinin belirlenmesi alanında çalışan laboratuvarlar arasında oldukça popülerite kazanmıştır. MN testinin kullanımının yaygınlaşmasının iki sebebi vardır. Birincisi PBL MN testi kromozom kırık ve kayıpları hakkında daha az maliyetle güvenilir bilgi sağlar, ikincisi sitokinezisin bloke edilmesiyle uygulanan MN tekniği, hücre bölünmesinin genotoksik etkilerinin belirlenmesini zorlaştıran bazı sebepleri ortadan kaldırmıştır (Bonassi ve ark. 2001).

MN testinin duyarlılığı üzerinde özellikle *in vitro* sitogenezisin bloke edilmesi yöntemiyle çalışılıyorsa, Cyt-B konsantrasyonu ve kullanılan vasatların önemli etkilerinin olduğu ileri sürülmektedir. Testin uygulanmasında dikkat edilmesi gereken noktalardan birincisi incelenecek maddelerin konsantrasyonları (en az üç konsantrasyon), ikincisi çalışmada kullanılan çözücü veya taşıyıcının kullanıldığı negatif kontroller ile mitomisin C (Mitomycin C, MMC) veya siklofosfamid (Cyclophosphamide, CP) gibi pozitif kontrol gruplarının mutlaka oluşturulmasıdır (GPT 2006).

Değerlendirme/Analiz aşamasında; çift tekrarlı hücre kültürlerinde, 1000 adet çift çekirdekli hücrede bir, iki ve daha fazla MN'ler sayılır. Toksisitenin bir ölçüsü

olmak üzere, ek olarak hücreler, tek çekirdekli, çift çekirdekli ve çok çekirdekli olarak sınıflanırlar. Sonuçların yazılması aşamasında; bir madde konsantrasyona bağlı veya MN içeren hücre sayılarında tekrarlanabilir bir artışa yol açıyorsa sonuç pozitifdir. *In vitro* MN testinde pozitif sonuç veren madde, kromozom veya hücre bölünme aparatına hasar veriyor demektir. Eğer kesin bir pozitif sonuç varsa kesinleştirme, doğrulama gereği yoktur. Şüpheli sonuçlar deneysel koşulların düzeltilmesinden sonra yapılan ileri tetkiklerle kesinleştirilir (USEPA 1996b).

Testin bir diğer modifikasyonu da *in vivo* memeli alyuvar MN testidir. Bu amaçla genç farelerin kemik iliğindeki polikromatik alyuvarlar kullanılır. İntraperitoneal veya oral yolla verilen maddenin etkisi polikromatik alyuvarlardaki MN frekansının tespiti ile belirlenir. Pozitif yanıtın belirlenmesinde polikromatik alyuvarlarda istatistiksel öneme sahip doz-bağımlı MN frekansı artışı dikkate alınır. Diğer bir kriter de en azından bir madde için hazırlanan farklı konsantrasyondaki test solüsyonlarından biri için tekrarlanabilir istatistiksel öneme sahip pozitif yanıtın gözlenmesidir. İncelenen bir maddenin uygulanan farklı konsantrasyonlarının polikromatik alyuvarların MN frekansında istatistiksel öneme sahip olan bir doz-bağımlı artışa yol açmaması, söz konusu test maddesinin nonmutajenik olduğunu gösterir. Değerlendirmede hem biyolojik ve hem de istatistiksel sonuçların her ikisi birlikte dikkate alınmaktadır. Her örnekte pozitif ve negatif kontrol gruplarıyla test grupları dahil;

- Polikromatik alyuvarların sayısı,
- MN'li polikromatik alyuvarların sayısı,
- MN'li hücrelerin yüzdesi,
- MN'li normokromatik alyuvarların sayısı,
- MN'li alyuvarların yüzdesi,
- Normokromatik/Polikromatik alyuvarların oranı belirlenmektedir (USEPA 1996b).

Son yıllarda farelerin periferel kanındaki olgunlaşmamış alyuvarlar üzerinde yapılan MN testlerinin de kemik iliğine yakın sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Periferel kanın kullanılabilmesi MN testini daha pratik ve faydalı hale getirmiştir. Son zamanlarda sıçanların test için tercih edilebilir olduğu tespit edildiğinden, genel

toksosite ve karsinojenite çalışmalarında sıçanlar daha fazla tercih edilmektedir (Sato ve Tomita 2001).

MN testi kullanılarak yapılan çeşitli araştırmalar mevcuttur. İnsan sağlığıyla ilgili olarak yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde laboratuvarlar arasında birliktelik sağlanması için farklı ülkelerden araştırmacıların katılımıyla ortak bir proje (HUMAN MicroNucleus Project, HUMN Project) geliştirilmiştir ve sürdürülmektedir (Bonassi ve ark., 2001). Lucero ve ark. (2000) pestisitlere maruz kalan sera işçilerinin periferik kan lenfositlerindeki ve yanak epitel hücrelerindeki MN frekansının kontrol grubundan önemli fark göstermediğini belirlemişlerdir. Benzer bir diğer çalışmada Pastor ve ark. (2001) pestisitlere maruz kalan çiftçilerin periferik kan lenfositlerindeki ve yanak epitel hücrelerindeki MN frekansının kontrol grubundan önemli fark göstermediğini bildirmişlerdir. Elavarasi ve ark. (2002) ise mobilya endüstrisinde çalışan işçilerdeki lenfositlerde MN frekansını tespit etmişler ve araştırmacılar MN frekansındaki değişikliklerin genetik hasarın tespitinde yararlı bir kriter olduğunu ve odun tozunun genetik hasara yol açtığını vurgulamışlardır.

Pestisitlerin genotoksik etkilerini göstermek amacıyla yapılmış çeşitli MN çalışmaları mevcuttur. Aalachlor, atrazine, terbuthylazine, gluphosinate-ammonium, isoproturon, pendimethaline ve trifluralin gibi herbisitlerin genotoksitesini belirlemek amacıyla fare kemik iliği MN testi gerçekleştirilmiş, atrazine ve trifluralin yalnızca dişi farelerde MN sayısını artırırken diğerleri herhangi bir genotoksik etki göstermemiştir (Gebel ve ark. 1997).

Organik fosforlu insektisit fosphamidon ve organik klorlu insektisit dieldrin letal ve subletal dozlarda fare kemik iliği MN testine tâbi tutulmuş ve her ikisinin de doza bağlı olarak MN'li polikromatik alyuvar sayısındaki artışı indüklediği gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada yapılan CREST boyama (antikinetokor antibadileri kullanılarak) ile bu iki maddenin klastojen olduğu da belirlenmiştir (Cicchetti ve ark. 1999).

Neonikotinoid insektisit imidacloprid ve böcek büyüme regülatörü RH-5849, yer solucanı (*Eisenia fetida*) genotoksosite testi, bakla (*Vicia faba*) kök ucu MN testi

ve fare kemik iliği MN testi ile genotoksisite açısından incelenmiştir. Bu insektisitlerin subletal dozlarda (2/3 LD₅₀) kemik iliği hücrelerindeki MN frekansını etkilemediği belirlenmiştir (Zang ve ark. 2000).

Triazine grubu herbisitlerden atrazine, simazine ve cyanazine ile yapılan fare kemik iliği MN testinde, fareler ölüme sebep olan yüksek dozlara maruz bırakıldığında bile bu üç herbisit genotoksik etki göstermemiştir (Kligerman ve ark. 2000).

Organik fosforlu insektisit trichlorfon, erken dönem fare embriyoları üzerindeki sitogenetik etkilerinin belirlenmesi için dişi gebe farelere intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Muamele edilen gruplardaki embriyolarda MN sayısı ile monosomik ve trisomik hücre frekansının kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde artmış olduğu belirlenmiştir (Tian ve ark. 2000).

Karbamat grubu bir insektisit olan carbosulfan genotoksik etkilerinin belirlenmesi için fare kemik iliği MN testine tâbi tutulmuş ve MN'li polikromatik alyuvar frekansında doza bağlı olarak önemli artış gözlenmiştir (Giri ve ark. 2002a).

Sentetik piretroid insektisit lambda-cyhalothrin'in genotoksik etkilerini belirlemek için sıçan kemik iliği MN testi uygulanmıştır. Muamele edilen gruplarda polikromatik alyuvar sayısı önemli oranda azalırken MN'li alyuvar frekansı artmış ve bu insektisit klastojenik/genotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Çelik ve ark. 2003).

Balıklar su kirlenmesinin genotoksik etkilerinin belirlenmesinde çok kullanılan bir materyal olup, MN testi balıklar için de modifiye edilmiştir. Bu amaçla çeşitli gruplara dahil pestisitler, tekstil fabrikaları atık suları ile MMC ve CP gibi diğer bileşiklerin etkileri balık periferal kan örneklerinde veya solungaç epitel hücrelerinde gerçekleştirilen MN testleri ile araştırılmıştır (Campana ve ark. 1999, Grisolia ve Cordeino 2000, Grisolia 2002, Çavaş ve Ergene-Gözükara 2003a ve 2003b).

2.5. Alfa Naftil Asetat Esteraz (ANAE)

Alfa Naftil Asetat Esteraz (ANAE) lizozomal bir enzimdir (Knowles ve ark. 1978, Zicca ve ark. 1981). Pratikte pek çok türün gerek doku ve gerekse periferel kan frotilerinde T-lenfosit, B-lenfosit ve monositlerin birbirlerinden ayırt edilmelerinde bu enzimden yararlanılmaktadır (Mueller ve ark. 1975, Higgy ve ark. 1977, Knowles ve Holck 1978, Pangalis ve ark. 1978, Ranki 1978, Knowles ve Halper 1980, Pruthi ve ark. 1987, Ramos ve ark. 1992). ANAE, T-lenfosit olgunlaşmasının ileri aşamalarında kazanılan bir enzimdir (Basso ve ark. 1980). Çelik ve ark.'da (1992) sığır fötüslerinde yaptıkları bir çalışmada, fötüslerin periferel kanlarında ANAE pozitif lenfositlere gebeliğin 60. gününde rastlamış, gebeliğin ilerlemesi ile birlikte pozitif lenfosit oranlarının da arttığını tespit etmişlerdir. Diğer esteraz grubu enzimler gibi ANAE enziminin de aktive olan T-lenfositlerin sitotoksik fonksiyonları ile makrofajların fagosite ettikleri materyalleri parçalamalarında etkinlik gösterdiğine inanılmaktadır (Mueller ve ark. 1975). ANAE özellikle başta insan olmak üzere (Li ve ark. 1972, Çelik ve ark. 1991), sığır (Yang ve ark. 1979, Kajikawa ve ark. 1983), tavuk (Maiti ve ark. 1990), köpek (Wulff ve ark. 1981) ve farede (Mueller ve ark. 1975) T-lenfositlerin ayırımında yararlanan bir enzimdir.

ANAE pozitivitesi, lenfosit, monosit ve makrofajlarda farklı şekillerde gözlenmektedir. İnsan periferel kan lenfositlerinde iki farklı pozitivite tipi tespit edilmiştir (Higgy ve ark. 1977, Zicca ve ark. 1981, Çelik ve ark. 1991). Bunlardan birincisi, bir veya birkaç adet kırmızı-kahverengi granülden ibaret olan nokta tipindeki pozitivite (Dot Like Positivity Pattern) T-lenfositlere özgüdür (Higgy ve ark. 1977, Knowles ve Holck 1978, Knowles ve ark. 1978, Wulff ve ark. 1981, Zicca ve ark. 1981, Kajikawa ve ark. 1983, Pruthi ve ark. 1987, Çelik ve ark. 1991). İkinci tip pozitivite ise ince-granüler boyanmadır (Fine Granuler Positivity Pattern). Bu tarz boyanmanın “Null Cells” olarak adlandırılan hücrelere özgü olduğu ifade edilmektedir (Higgy ve ark. 1977). B-lenfositlerin ise ANAE negatif reaksiyon verdiği bildirilmektedir (Mueller ve ark. 1975, Higgy ve ark. 1977, Pangalis ve ark. 1978, Ranki 1978, Pinkus ve ark. 1979, Çelik ve ark. 1991). Monosit ve

makrofajlarda ise sitoplazmada diffuz ve güçlü bir pozitivite gözlenmektedir (Higgy ve ark. 1977, Pinkus ve ark. 1979, Kajikawa ve ark. 1983, Çelik ve ark. 1991).

Farklı türlerin periferal kanlarındaki ANAE pozitif lenfosit oranları oldukça değişiklik göstermektedir. İnsanlarda %69-75 (Ranki 1978, Çelik ve ark. 1991), köpeklerde %56-78 (Wulff ve ark. 1981), tavuklarda %35 (Pruthi ve ark. 1987) ve sığırlarda ise %47.7 (Kajikawa ve ark. 1983) oranında ANAE pozitif lenfosit bulunmaktadır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Kuluçka Başlangıcında Yumurtaya Verilen Saf ve Ticari Fipronilin Tavuk Embriyolarında LD₅₀ (Letal Doz %50) Tayini ile Embriyotoksik ve Teratojenik Etkilerinin Belirlenmesi

Çalışmanın bu kısmında Bahri Dağdaş Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünden temin edilen kahverengi yumurtacı (ATE-K) damızlıklara ait, 59±2.5 g ağırlığındaki 240 adet dömlü kuluçkalık yumurta kullanıldı. Yumurtalar enjeksiyon saatine kadar yaklaşık 18°C'de en fazla 3 gün süreyle depolandı. Her yumurta enjeksiyondan önce tartıldı ve kapalı bir kabinde 21 g potasyum permanganat+42 ml formaldehit/m³ karışımıyla elde edilen buharla 15 dakika dezenfekte edildi. Denemelerde kullanılan saf fipronil standardı (%97.7) *Riedel-De Haen*'den (RdH-46451) ve ticari fipronil (500g/l) *Basf-Türk* firmasından temin edildi.

Denemeler iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci denemede, steril şartlar altında saf asetonda (*Merck*) çözdürülen saf fipronil stok solüsyonu kullanıldı. Fipronilin tavuk embriyoları üzerindeki etkilerine ait literatür bulunmadığı için yumurtalara enjekte edilen dozlar daha önce geniş doz aralıklarıyla yapılan ön denemelerde belirlendi. Ön denemelerde yumurtaya enjekte edilen yüksek dozlardaki (1000 mikrogram/yumurta (µg/yum) ve 500 µg/yum gibi) fipronil aktif maddesinin yumurtalar açılırken hava kamerasında iç zar üzerinde kristal şeklinde çökelti bıraktığı ve albümine ulaşamadığı gözlemlendi. Dolayısıyla yüksek dozların 20 µl'de çözünme sorunu oluşturması sebebiyle bu denemede dört doz kullanılmıştır. Her bir doz için deney solüsyonları (pH=5.5-6.5), stok solüsyonun yine asetonda geometrik tarzda seyreltilmesiyle ve iyice karıştırılmasıyla hazırlandı. Solüsyonlar enjeksiyon saatine kadar steril ve renkli minivial şişelerde 4°C'de saklandı. Birinci deneme için Tablo 1'de görülen altı deney grubu oluşturuldu.

İkinci denemede steril bidistile suda çözdürülmüş ticari fipronil solüsyonları kullanıldı. Ön denemelerde yine yüksek dozlarda (2000 µg/yum ve 1000 µg/yum

gibi) 20 µl hacimde çözünme sorunları gözlemlendiği için dört doz kullanıldı. Bu deneme için de Tablo 2’de görülen altı deney grubu oluşturuldu.

Kontrol grubu haricinde diğer gruplardaki yumurtaların küt uçları enjeksiyondan önce %96’lık etanollü pamukla silindi ve özel yumurta delicisi ile delindi. Enjeksiyonların ardından delikler derhal sıvı parafinle kapatıldı. Tüm enjeksiyonlar steril şartlar altında laminar flow kabinde, steril uçlu mikropipetle (*Eppendorf*), 20 mikrolitre/yumurta (µl/yum) hacminde, kuluçka başlangıcında ve yumurtaların hava kamarasına gerçekleştirildi. Takiben yumurtalar 37.5°C’de, %65 nispi neme sahip kuluçka makinesinde (*VGS*) ilk 1 saat test solüsyonlarının diffüze olabilmesi için dik konumda bekletildikten sonra, her 2 saatte bir kez 180° çevrilerek inkübe edildi. Kuluçka işlemine başlanmadan önce kuluçka makinesi %96’lık etanol ile dezenfekte edildi. Yumurtaların dezenfeksiyon, enjeksiyon ve kuluçka işlemleri S.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Yumurtalar kuluçka makinesine yerleştirilmelerinden 15 gün sonra tartılarak küt uçlarından açıldı ve embriyoların canlılığı kalp atışı, ekstremitte hareketleri ve dokunulduğunda uzuv refleksi alınarak değerlendirildi. Takiben ekstraembriyonik keselerinden ayrılan ölü ve canlı embriyoların gelişme evreleri Hamburger ve Hamilton (1951) skalasına (HH skalası) göre belirlendi. Bununla birlikte yumurtalar kuluçkanın 15. gününde açıldığı için ilk 3 günde ölen embriyolarda meydana gelen bozulmalardan dolayı, kesin bir evre tespiti yapılamadı ve bu dönemdeki ölümler Erken Embriyonik Ölüm (EEÖ) olarak belirtildi. Canlı embriyolar hassas terazi ile tartıldı ve tepe-kıç mesafeleri (Crown-Rump Length, CRL) saat başlı bir kumpasla ölçüldü. Nispi embriyo ağırlıkları aşağıdaki formülle hesaplandı;

$$\text{Nispi embriyo ağırlığı} = \frac{\text{Embriyo ağırlığı}}{\text{Yumurtanın son ağırlığı}} \times 100$$

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.

Denemelerde kontrol gruplarında doğal ölümler gözlemlendiği için LD₅₀ tayininde, her grup için Abbott formülüne göre düzeltilmiş mortalite değerleri kullanıldı (Sümbüloğlu ve Sümbüloğlu 1990);

$$\text{Abbott formülü} = \frac{\text{Gerçek ölüm oranı} - \text{Geçici ölüm oranı}}{100 - \text{Geçici ölüm oranı}} \times 100$$

Saf ve ticari fipronilin LD₅₀ değerleri, düzeltilmiş mortalite değerlerinin probit değerlere transforme edilerek regresyon analizi uygulanmasıyla tayin edildi (Sümbüloğlu ve Sümbüloğlu 1990). Kontrol grubu ve diğer grupların anormal embriyo oranları ve mortaliteleri arasındaki farklar t-testiyle (bağımsız iki grup oran testi) karşılaştırıldı (Fischer ve Van Belle 1993). Canlı ve nispi embriyo ağırlıkları ile embriyo CRL değerlerine, gruplar arası farkın belirlenmesi için Kruskal-Wallis testi uygulandı. Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki farkların belirlenmesi için bu teste ait ikili karşılaştırmalar yapıldı (Conover 1980).

3.2. Kuluçkanın Farklı Günlerinde Letal ve Subletal Dozlarda Yumurtaya Verilen Saf Fipronilin Embriyolar ve Çıkan Cıvcivler Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

Çalışmanın bu kısmında ticari bir işletmeden (*Dost Damızlık-Afyon*) temin edilen beyaz yumurtacı (*Bovans white*) damızlıklara ait, 65±2.5 g ağırlığındaki 468 adet döllü kuluçkalık yumurta kullanıldı. Yumurtalar enjeksiyon saatine kadar yaklaşık 18°C'de 2 gün süreyle depolandı. Her yumurta enjeksiyondan önce tartıldı

ve bölüm 3.1’de bahsedildiği şekilde dezenfekte edildi. Denemelerde kullanılan saf fipronil standardı (%97.7) *Riedel-de Haen*’den (*RdH-46451*) temin edildi.

Denemeler iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşamada saf fipronil LD₅₀ (161 µg/yum) ve subletal dozlarda (80.50 µg/yum ve 40.25 µg/yum) kuluçka başlangıcında yumurtaların hava kamarasına enjekte edildi. Steril şartlar altında saf asetonla (*Merck*) çözdürülerek ve iyice karıştırılarak hazırlanan stok fipronil solüsyonundan yine asetonla geometrik seyreltme yöntemiyle çalışma solüsyonları (pH=5.5-6.5) hazırlandı ve solüsyonlar enjeksiyon saatine kadar steril ve renkli minivial şişelerde 4°C’de saklandı. Ayrıca pozitif kontrol amacıyla bir grup yumurtaya da embriyotoksik etkisi önceden bilinen 40 ng/yumurta (ng/yum) Aflatoksin B₁ (AFB₁) enjekte edildi. Kristal haldeki saf AFB₁ standardı (*Makor Chemical Co.*, Israel) benzen içinde çözdürülmek suretiyle stok solüsyon hazırlandı. Bu solüsyon denemede kullanılacak AFB₁ dozunu ihtiva edecek hacimde steril vialle aktararak, karanlıkta bekletildi ve benzenin tamamen uçması sağlandı. AFB₁ içeren vialle önceden belirlenen miktarda saf etanol ilave edilerek AFB₁ tamamen eritildi. Takiben etanol konsantrasyonunu %30’a (v/v) düşürmek amacıyla solüsyona steril bidistile su ilavesi yapılarak istenen dozda AFB₁ içeren solüsyon hazırlandı. Solüsyonun istenen dozda AFB₁ içerip içermediği ince tabaka kromatografisi ve floresans spektrofotometre yöntemleriyle kontrol edildi. Bu solüsyon da enjeksiyon saatine kadar 4°C’de saklandı. Bu deneme için Tablo 3’deki gruplar oluşturuldu.

Bu deneme için enjeksiyon ve kuluçka işlemleri bölüm 3.1’de bahsedildiği gibi gerçekleştirildi.

Kuluçkanın 7. ve 14. günlerinde her gruptan 12’şer adet yumurta tartılarak küt uçlarından açıldı ve embriyoların canlılığı, gelişme evreleri, canlı ve nispî embriyo ağırlıkları ile CRL değerleri bölüm 3.1’de bahsedilen şekilde belirlendi. Bununla birlikte yumurtalar kuluçkanın 7. ve 14. günlerinde açıldığı için ilk üç günde ölen embriyolarda meydana gelen bozulmalardan dolayı, kesin bir evre tespiti yapılamadı ve bu dönemdeki ölümler Erken Embriyonik Ölüm (EEÖ) olarak belirtildi. Ayrıca 14 günlük embriyoların karaciğer ağırlıkları da belirlendi.

Malformasyonlar ve gelişme geriliklerinin tespiti için %10'luk nötr formalinde 4°C'de saklanan canlı ve ölü embriyolarda bölüm 3.1'de bahsedilen çeşitli malformasyon varlığı çıplak göz ve stereo mikroskop yardımıyla incelenerek belirlendi. Genel gelişme geriliği ise sadece canlı embriyolarda dikkate alındı. Gerekli görülen embriyolar yakın çekim ile fotoğraflandı. Her gruptan 2-3 adet makroskobik anormallik göstermeyen embriyo muhtemel iskelet gelişme geriliklerinin belirlenmesi için Alizarin Red-S ile boyandı (Stevens 1990). Tespit işleminden sonra embriyolar 2 gün süreyle %1'lik KOH içerisinde bekletildikten sonra, %0.01-0.001'lik Alizarin Red-S (%1'lik KOH içinde taze olarak hazırlanmış) ile kontrollü bir şekilde boyandı ve gerekli görülenlerin fotoğrafları çekildi. 7 günlük embriyolar total olarak, 14 günlük embriyolar ya total olarak ya da sadece üyeleri boyamaya alındı.

Bu denemede her gruptan 12'ser yumurta çıkış elde etmek amacıyla kuluçkanın 18. günü kuluçka makinesinin çıkış bölümüne transfer edildi. Kuluçka sonunda elde edilen civcivler 10 gün süreyle optimal koşullarda civciv yemi ve çeşme suyu ile beslenerek gözlemlendi. Gerekli görülenlerin fotoğrafları çekildi. Grupların civciv çıkış ve anormal civciv oranları, civciv çıkış ve 10 günlük civciv ağırlıkları ile 10 günlük civciv karaciğer ağırlıkları kaydedildi. Civciv çıkmayan yumurtalar kırılarak ölü embriyoların HH skalasına göre gelişme evreleri belirlendi.

10 günlük civcivlerden, her grup için altışar bireyden usulüne uygun olarak vacutainer tüplere yeterli miktarda kan örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinin bir kısmı ile frotiler hazırlanarak havada kurutuldu. Kan örneklerinin diğer kısmı alyuvar ve akyuvar sayımında kullanıldı. Alyuvar ve akyuvar sayıları alyuvar sulandırma pipeti yardımıyla Natt ve Herrick solüsyonu ile 100 kat sulandırılmasından sonra Thoma lamı kullanılarak ışık mikroskopunda belirlendi. Natt ve Herrick solüsyonu 3.88 g NaCl, 2.50 g Na₂SO₄, 2.91 g Na₂HPO₄.12H₂O, 0.25 g KH₂PO₄, 7.50 ml formaldehit, 0.10 g Metil violet 2B ve 1000 ml saf su ile hazırlandı ve süzülükten sonra kullanıldı (Campbell 1995).

Her bir birey için havada kurutulan frotilerden bir kısmı metil alkolde (*Merck*) 5 dakika tespit edilerek lenfosit oranlarının belirlenmesi için kullanıldı. Bu frotiler

rutin May-Grünwald Giemsa boyama yöntemiyle (Konuk 1981) boyanarak, etanol serisinde dehidrasyon ve ksilolde şeffaflaştırma basamaklarından sonra entellan (*Merck*) ile kapatıldı. Bu preparatlardaki lenfosit oranları (%) ışık mikroskopunda immersiyon objektif yardımıyla her birey için 200 akyuvar değerlendirilerek belirlendi. Akyuvar tiplerinin belirlenmesinde Rosskopf ve Woerpel (1996) referans kabul edildi.

Havada kurutulan diğer frotiler, Alfa Naftil Asetat Esteraz (ANAE) enziminin demonstrasyonu için -10°C'deki glutaraldehit-aseton tespit solüsyonunda (pH=4.8) 3 dakika tespit edildi (Maiti ve ark. 1990) ve distile su ile üç kez yıkanarak oda sıcaklığında kurutuldu. ANAE demonstrasyonu için inkübasyon işlemi şu sıra ile gerçekleştirildi. pH=5 olan tamponlu fosfat solüsyonunun 80 ml'sine 0.8 ml aseton içerisinde eritilen 20 mg substrat (alpha-naphthyl acetate-*Sigma-N-8505*) yavaş yavaş damlatıldı. Ardından 2.4 ml %4'lük sodyum nitrit (*Merck-1.06544*) solüsyonu ile 2.4 ml pararozanilin (*Sigma-P-3750*) (1 g pararozanilin, 20 ml distile su, 5 ml konsantre HCl) solüsyonunun 2 dakika süreyle bekletilmesiyle elde edilen 4.8 ml hekzazotize edilmiş pararozanilin karışımı, substrat içeren tamponlu fosfat solüsyonuna eklendi. Hazırlanan solüsyonun pH'sı, 1 N NaOH solüsyonu ile 5.8'e ayarlandıktan sonra süzüldü. Bu inkübasyon solüsyonu içerisinde frotiler 37°C'de en az 2 saat süreyle kontrollü bir şekilde bekletildi. Kırmızı-kahverengi granüllerin şekillenmesinin ardından inkübasyon işlemi sona erdirildi ve üç kez distile su ile yıkanan preparatlara kontrollü bir şekilde %1'lik methyl-green ile çekirdek boyası uygulandı (Sur 2001). Preparatlar etanol serisinde dehidrasyon ve ksilolde şeffaflaştırma basamaklarından sonra entellan (*Merck*) ile kapatıldı. Işık mikroskopik incelemelerde immersiyon objektifi ile lenfositlerde 1-5 arasında değişen sayılarda kiremit kırmızısı-kahverengi granüle sahip olan lenfositler ANAE pozitif (ANAE(+)) olarak kabul edilirken, reaksiyon göstermeyenler ANAE negatif (ANAE(-)) olarak değerlendirildi. Her birey için ortalama 200 adet lenfosit değerlendirildi.

Denemenin ikinci aşamasında saf asetonda çözdürülmüş saf fipronil, aynı dozlarda (161 µg/yum, 80.50µg/yum ve 40.25 µg/yum) yumurtaların hava kamarasına, bununla birlikte kuluçkanın 8. gününde enjekte edildi. Enjeksiyonlar 8 günlük embriyoların 40 µl'lik enjeksiyon hacmini tolere edebileceği düşünülerek bu

hacimde gerçekleştirildi. Ancak çözücü olarak kullanılan asetonun 40 µl/yum hacminde korioallantoik membran üzerinde yaratabileceği iritan etkinin azaltılması için, fipronil solüsyonlarına (pH=5.5-6.5) enjeksiyondan önce steril bidistile su ilavesiyle aseton konsantrasyonu %70'e (v/v) düşürüldü. Pozitif kontrol grubu için daha önce bahsedilen şekilde hazırlanmış ancak daha yüksek dozda 80 ng/yum AFB₁ dozu kullanıldı. Ayrıca HET-MN (Mikronukleus İndüksiyonu için Tavuk Yumurtası Testi, Hen's Egg Test for Micronucleus Induction) için pozitif kontrol amacıyla üç gruba siklofosfamid (Cyclophosphamide, CP) enjekte edildi. Steril bidistile suda çözdürülmüş CP (*Fluka-29875*) 50 µg/yum, 250 µg/yum ve 500 µg/yum olmak üzere üç farklı dozda hazırlandı. Bu denemedeki yumurtalar enjeksiyondan yaklaşık 18 saat önce, hava kamaralarının yerleşmesi için çevirme durdurularak küt ucu yukarı gelecek şekilde dik konuma getirildi. Daha önce bahsedilen yöntemle hızlıca enjeksiyonu gerçekleştirilen yumurtalar kuluçka makinesine tekrar yerleştirildi. Bu deneme için Tablo 4'de görülen gruplar oluşturuldu.

CP gruplarında kuluçkanın 11. gününde, diğer gruplarda 11. ve 18. günlerinde her gruptan 12'şer adet yumurta açıldı ve daha önce belirtilen yöntemlerle grupların mortaliteleri, anormal embriyo oranları, malformasyon tipleri, embriyo evreleri, canlı ve nispi embriyo ağırlıkları, CRL değerleri ve karaciğer ağırlıkları belirlendi. Ayrıca her gruptan 2-3 adet makroskopik anormallik göstermeyen embriyo muhtemel iskelet gelişme geriliklerinin belirlenmesi için Alizarin Red-S ile boyandı. 11 günlük embriyolar total olarak, 18 günlük embriyoların ise sadece üyeleri boyamaya alındı.

11. günde açılan yumurtalardaki canlı embriyo ihtiva edenlerin korioallantoik membranlarının periferik dolaşım sistemine ait büyük damarlarından HET-MN testi için kan örnekleri alınarak frotileri hazırlandı, havada kurutuldu ve 5 dakika metil alkolde (*Merck*) tespit edildi. Bu frotiler modifiye May-Grünwald Giemsa yöntemiyle (Wolf ve Luepke 1997, Wolf ve ark. 2002, Wolf ve ark. 2003) boyandı. Preparatlar önce 3 dakika süzölmüş May-Grünwald (*Merck*) ile boyandı. Daha sonra preparat üzerine boya ile eşit hacimde 0.1 M disodyumsitrat/NaOH tamponu (pH=5.2) ilave edildi. Metalik bir parlaklık oluşuncaya kadar ancak 5 dakikayı aşmadan boya solüsyonu döküldü ve preparatlar distile su ile yıkandı. Daha sonra preparatlar 0.1 M disodyumsitrat/NaOH tamponu (pH=5.2) içinde hazırlanmış ve

süzülmüş %30'luk Giemsa (*Merck*) ile 20 dakika boyandı ve distile su ile tekrar yıkandı. Hızlı bir şekilde saf etanolden geçirilen preparatlar ksilolde şeffaflaştırılarak entellan (*Merck*) ile kapatıldı. Bu preparatlarda ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile her bireyin periferal kan alyuvarlarındaki anormal çekirdek ve MN oranları belirlendi. Çekirdek anormalliği (Nuclear Abnormality, NA) değerlendirilirken çift (binuclei), loblu (lobed nuclei), tomurcuklu (blebbed nuclei), çentikli (notched nuclei) ve çok sayıda (multinuclei) çekirdek gibi anormallikler dikkate alındı. MN kriterleri için ise Wolf ve Luepke (1997) ve Wolf ve ark. (2002) referans kabul edildi. Buna göre özetle; çekirdeğe benzer, üç boyutlu, çekirdekle aynı boyanma özelliğine sahip, çekirdek boyutunun üçte ikisini geçmeyen, sınırları belli ve yuvarlak-oval şekilli yapılar MN olarak kabul edildi. Ayrıca her bireyin alyuvar mitotik figür (mitoz bölünmenin profaz, metafaz, anafaz ve telofaz safhaları) oranı da belirlendi. Her bireyden 5000 alyuvar değerlendirildi. MN'ler sayılırken HET-MN testinde Wolf ve ark. (2002) ve Wolf ve ark. (2003) tarafından E II olarak gruplandırılmış alyuvar hücreleri dikkate alındı. NA'lar sayılırken E II hücreleri yanı sıra primitif normokromatik alyuvarlardakilerde dikkate alındı. Wolf ve ark. (2002) ve Wolf ve ark. (2003) embriyonik dönemdeki periferal alyuvarları iki hücre hattına ayırmışlardır. E I olarak adlandırdıkları gruba primitif alyuvarları (primary/primitive erythrocytes), E II olarak adlandırdıkları gruba sekonder alyuvarları (secondary/definite erythrocytes) dahil etmişlerdir. E II (sekonder alyuvarlar) eritroblastları, proeritroblastları, erken-, orta- ve geç-polikromatik alyuvarları ve olgun normokromatik alyuvarları ihtiva etmektedir. E I hücreleri daha büyük boyutları, düşük çekirdek-sitoplazma oranları ve yuvarlak yapıları ile karakteristiktir. E II hücreleri ise büyük, yuvarlak, bazofilik ve büyük çekirdekli proeritroblastlardan başlayıp, oval şekilli, normokromatik, küçük ve yoğun çekirdekli olgun hücrelere kadar olan eritroid seri hücrelerini kapsamaktadır (Wolf ve Luepke 1997 ve Wolf ve ark. 2002). Embriyonik dönemdeki hücre tiplerinin sınıflandırılmasında ayrıca Bruns ve Ingram (1973) ve renkli literatür olarak Lucas ve Jamroz (1961) referans kabul edildi.

Bu denemede de her gruptan 12'şer yumurta çıkışa bırakıldı ve daha önce bahsedildiği gibi civcivler ile ilgili veriler kaydedildi. Civciv çıkmayan yumurtalar da kırılarak ölü embriyoların HH skalasına göre gelişme evreleri belirlendi. Elde

edilen civcivlerden 10. günde alınan kan örnekleri kullanılarak daha önce bahsedilen yöntemlerle grupların alyuvar ve akyuvar sayıları ile lenfosit ve ANAE(+) lenfosit oranları belirlendi.

Histolojik preparatlardaki gerekli görülen bölgelerin fotoğrafları, S.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalındaki dijital fotoğraf makineli (Nikon DS Camera Control Unit DS-L1 with DS Camera Head DS-5M) ışık mikroskobu (Nikon Eclipse, E-400) ile kaydedildi.

Kontrol grubu ve diğer grupların anormal embriyo ve civciv oranları, mortaliteleri ile civciv çıkış oranları arasındaki farklar t-testiyle (bağımsız iki grup oran testi) karşılaştırıldı. Farklı enjeksiyon saatlerine göre grupların birbirleriyle karşılaştırılmasında da aynı test uygulandı (Fischer ve Van Belle 1993). Canlı ve nispi embriyo ağırlıkları, embriyo CRL değerleri, karaciğer ağırlıkları ve civciv ağırlıklarına, gruplar arası farkın belirlenmesi için Kruskal-Wallis testi uygulandı. Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki farkların belirlenmesi için bu teste ait ikili karşılaştırmalar yapıldı (Conover 1980).

Alyuvarlardaki MN ve çekirdek anormalliklerine ait oranlar ile civciv 10. gün kan sayımına ait hücre sayıları ve oranlarına gruplar arası farkın belirlenmesi için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Grupların birbirleriyle karşılaştırılmasında varyansların homojen olduğu durumlarda Tukey HSD testi ve varyansların homojen olmadığı durumlarda Tamhane T2 testi sonuçları kullanıldı. Yüzde oran türündeki hücre verileri istatistiksel analizler uygulanmadan önce Açık (Arc Sinus) değerlerine transforme edildi. Verilerin tablollaştırılmasında ise transformasyon öncesi gerçek değerler kullanıldı. İstatistiksel testler uygulanırken SPSS (9.0.0 versiyonu) paket programından faydalanıldı.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1. Kuluçka Başlangıcında Yumurtaya Verilen Saf ve Ticari Fipronilin Tavuk Embriyolarında LD₅₀ (Letal Doz %50) Değerleri ile Embriyotoksik ve Teratojenik Etkileri

Saf fipronil kullanılarak gerçekleştirilen birinci denemede hiçbir işlem uygulanmayan kontrol grubu yumurtalarında kuluçkanın 15. gününde oluşan ağırlık kaybı oranı %11.00, ticari fipronil kullanılarak gerçekleştirilen ikinci denemede %10.20 olarak gerçekleşmiştir. Kahverengi damızlıklara ait yumurtaların kullanıldığı bu denemelerde total infertilite ise %5.83 olarak hesaplanmıştır.

Birinci ve ikinci denemeye ait grupların infertil ve fertil yumurta sayıları, anormal ve ölü embriyo sayıları ile infertilite hariç anormal embriyo oranları ve mortalite değerleri Tablo 5 ve 6'da verilmiştir. Hem kontrol gruplarındaki (Şekil 3a ve Şekil 4a) hem de deney gruplarındaki canlı ve anormallik göstermeyen embriyoların gelişimi kuluçkanın 15. gününde HH skalasına uygun olarak 41. evrede gerçekleşmiştir. Saf fipronil kullanılarak gerçekleştirilen birinci denemeye ait hiçbir işlem uygulanmayan kontrol ve çözücü grubu olan negatif kontrol (%100'lük aseton) gruplarındaki embriyolarda herhangi bir anormallik gözlenmezken, fipronil gruplarında parmaklar ve boyunda çarpıklık, iç organları dışa dönük yapışık çift vücut, ödem, tek kanat gelişmemesi, tek ve çift göz anormalliği gibi malformasyon tipleri gözlenmiştir (Şekil 3b-h). Ticari fipronil kullanılarak gerçekleştirilen ikinci denemeye ait kontrol grubunda herhangi bir anormallik gözlenmezken, negatif kontrol (bidistile su) ve fipronil gruplarında genel gelişme geriliği, fokal ve yaygın hemoraji ve ödem gibi malformasyon tipleri gözlenmiştir (Şekil 4b-d). Bununla birlikte Tablo 5 ve 6'da görüldüğü gibi negatif kontrol, saf ve ticari fipronil gruplarında görülen anormalliklerin sıklığı kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli düzeyde fark göstermemektedir ($p>0.05$). Negatif kontrol, 31.25 µg/yum saf fipronil ve 50 µg/yum ticari fipronil gruplarının mortaliteleri kontrol gruplarının mortalitelerinden fark göstermezken, 62.50 µg/yum, 125 µg/yum, 250 µg/yum saf fipronil ve 125 µg/yum, 250 µg/yum, 500 µg/yum ticari fipronil gruplarının

mortaliteleri kontrol gruplarından önemli derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$, Tablo 5 ve 6).

Şekil 5’de görüleceği gibi saf fipronilin tavuk embriyolarının mortalitesi üzerindeki etkisi lineer bir doz-cevap ilişkisine sahipken, ticari fipronil nonlineer bir doz-cevap ilişkisine sahiptir. Artan doza bağlı olarak mortalite artmaktadır, bununla birlikte sunulan bu çalışmada kullanılan dozlarda %100’e ulaşan bir mortalite gözlenememiştir. LD₅₀ tayininde, kontrol grubunda doğal ölümler gözlendiği için Tablo 5 ve 6’da görülen Abbott formülüne göre düzeltilmiş mortalite değerleri kullanılmıştır. Regresyon analizi sonuçlarına göre kuluçka başlangıcında hava kamarası yöntemiyle enjekte edilen saf fipronilin tavuk embriyoları için LD₅₀ değeri 161 µg/yum (Şekil 6), ticari fipronilin tavuk embriyoları için LD₅₀ değeri ise 383 µg/yum (Şekil 7) olarak belirlenmiştir.

Birinci denemeye ait ölü embriyoların HH skalasına göre gelişme evreleri dağılımı Tablo 7’de, ikinci denemeye ait olanlar Tablo 8’de gösterilmiştir. Saf fipronille gerçekleştirilen birinci denemede tüm dozlarda ve negatif kontrol grubunda ölümlerin özellikle erken embriyonik dönemde, HH skalasına göre ilk 20 evrede diğer bir deyişle kuluçkanın ilk üç gününde gerçekleştiği dikkat çekmektedir (Tablo 7). Ticari fipronille gerçekleştirilen ikinci denemede ise ölümler en yüksek dozda yine erken dönemde yoğunlaşırken, düşük dozlarda daha geç evrelere yayılmıştır (Tablo 8).

Birinci denemeye ait gruplardaki embriyoların ortalama canlı ve nispî embriyo ağırlıkları ile CRL değerleri Tablo 9’da, ikinci denemeye ait sonuçlar Tablo 10’da verilmiştir. Her iki denemede de negatif kontrol, saf ve ticari fipronil gruplarında embriyoların canlı ve nispî embriyo ağırlıkları ile CRL değerlerinde kontrol grubuna kıyasla bir azalma söz konusudur. Bununla birlikte negatif kontrol grupları ile kontrol grupları arasındaki farkların istatistiksel olarak önemsiz olduğu, saf ve ticari fipronil gruplarının ise tüm dozlarda kontrol grubundan önemli düzeyde fark gösterdiği saptanmıştır ($p<0.001$, Tablo 9 ve 10).

4.2. Kuluçkanın Farklı Günlerinde Yumurtaya Verilen Saf Fipronilin Tavuk Embriyoları ve Kuluçka Sonu Elde Edilen Erken Dönem Cıvcivleri Üzerindeki Etkileri

4.2.1. Kuluçka Başlangıcında Letal (LD₅₀-161 µg/yum) ve Subletal Dozlarda (80.50 µg/yum ve 40.25 µg/yum) Yumurtaya Verilen Saf Fipronilin Tavuk Embriyoları ve Kuluçka Sonu Elde Edilen Erken Dönem Cıvcivleri Üzerindeki Etkileri

Beyaz yumurtacı damızlıklara ait yumurtaların kullanıldığı çalışmanın bu kısmında, hiçbir işlem uygulanmayan kontrol grubu yumurtalarındaki kuluçkanın 7. gününde gerçekleşen ağırlık kaybı oranı %3.52, 14. gününde gerçekleşen ağırlık kaybı oranı %7.40 olarak, total infertilite ise %2.78 olarak hesaplanmıştır.

Bu denemeye ait grupların kuluçkanın 7. gününde açılan yumurta sayısı, infertil ve fertil yumurta sayıları, anormal ve ölü embriyo sayıları ile infertilite hariç anormal embriyo oranları ve mortalite değerleri Tablo 11’de verilmiştir. Hem kontrol grubundaki (Şekil 8a) hem de deney gruplarındaki canlı ve anormallik göstermeyen embriyoların gelişimi kuluçkanın 7. gününde HH skalasına uygun olarak 31. evrede gerçekleşmiştir. Kuluçkanın bu gününde hiçbir işlem uygulanmayan kontrol ve çözücü grubu olan negatif kontrol (%100’lük aseton) gruplarındaki embriyolarda herhangi bir anormallik gözlenmezken, pozitif kontrol (40 ng/yum AFB₁) ve fipronil gruplarında genel gelişme geriliği, tek ve çift göz anormalliği ve hemoraji gibi malformasyon tipleri gözlenmiştir (Şekil 8a-c). Bununla birlikte Tablo 11’de görülebileceği gibi anormal embriyo oranı bakımından kontrol grubu ile diğer gruplar arasında önemli fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Mortalite ise sadece pozitif kontrol grubunda kontrol grubundan önemli düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$, Tablo 11). Kuluçkanın 7. gününde gruplardaki embriyoların ortalama canlı ve nispi embriyo ağırlıkları ile CRL değerleri Tablo 12’de verilmiştir. Tablo 12’de görülebileceği gibi canlı ve nispi embriyo ağırlıkları bakımından kontrol grubu ile negatif kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değilken, pozitif kontrol ve fipronil grupları kontrol grubundan önemli düzeyde azalma göstermiştir ($p<0.001$). CRL değerleri bakımından ise sadece 80.50 µg/yum fipronil grubu kontrol grubundan önemli düzeyde azalma göstermiştir ($p<0.05$, Tablo 12).

Kuluçkanın 7. gününde Alizarin Red-S ile hem kontrol hem de diğer gruplara ait embriyolarda boyanma elde edilememiş dolayısıyla kemikleşme daha başlamadığı için herhangi bir değerlendirme yapılamamıştır.

Bu denemeye ait grupların kuluçkanın 14. gününde açılan yumurta sayısı, infertil ve fertil yumurta sayıları, anormal ve ölü embriyo sayıları ile infertilite hariç anormal embriyo oranları ve mortalite değerleri Tablo 13’de verilmiştir. Hem kontrol grubundaki (Şekil 9) hem de deney gruplarındaki canlı ve anormallik göstermeyen embriyoların gelişimi kuluçkanın 14. gününde HH skalasına uygun olarak 40. evrede gerçekleşmiştir. Kuluçkanın bu gününde kontrol, negatif kontrol, pozitif kontrol ve 80.50 µg/yum fipronil gruplarındaki embriyolarda herhangi bir anormallik gözlenmezken, 161 µg/yum ve 40.25 µg/yum fipronil gruplarında genel gelişme geriliği, çapraz gaga, tek göz anormalliği ve hemoraji gibi malformasyon tipleri gözlenmiştir. Genel gelişme geriliği gösteren bir embriyo Şekil 9’da görülebilir. Bununla birlikte Tablo 13’de görülebileceği gibi anormal embriyo oranı bakımından kontrol grubu ile diğer gruplar arasında yine önemli fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Mortalite ise sadece pozitif kontrol ve 161 µg/yum fipronil gruplarında kontrol grubundan önemli düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$, Tablo 13). Kuluçkanın 14. gününde gruplardaki embriyoların ortalama canlı ve nispî embriyo ağırlıkları, CRL değerleri ile karaciğer ağırlıkları Tablo 14’de verilmiştir. Tablo 14’de görülebileceği gibi canlı ve nispî embriyo ağırlıkları bakımından kontrol grubu ile negatif ve pozitif kontrol grubu istatistiksel olarak önemli fark göstermezken, fipronil grupları kontrol grubundan önemli düzeyde azalma göstermiştir ($p<0.05$). CRL değerleri bakımından gruplar arasındaki fark önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). Karaciğer ağırlığı bakımından ise kontrol grubu ile negatif kontrol grubu arasında önemli fark bulunmazken, pozitif kontrol ve fipronil grupları kontrol grubundan önemli düzeyde azalma göstermişlerdir ($p<0.05$, Tablo 14). Alizarin Red-S ile yapılan iskelet boyamalarında fipronil gruplarından bazı embriyo örneklerinde kontrol ve negatif kontrol grubu ile makroskobik olarak kıyaslandığında kemik gelişimlerinde gecikmeler gözlenmiştir (Şekil 10). Kemik gelişimindeki bu gecikmeler özellikle üyelerde daha iyi görülmektedir (Şekil 11a ve b).

Kuluçka başlangıcında enjeksiyon yapılan bu denemede çıkışa bırakılan yumurtalardan elde edilen civciv ve anormal civciv sayıları, anormal ve ölü embriyo sayıları ile bunlara ait oranlar Tablo 15’de verilmiştir. Tablo 15’de görülebileceği gibi kontrol grubunda %100 gibi yüksek bir oranda çıkış elde edilmiştir. Kontrol grubu ve negatif kontrol grubu arasında civciv çıkış oranı bakımından fark yokken, pozitif kontrol ve fipronil gruplarının civciv çıkış oranı kontrol grubundan önemli oranda düşüktür ($p<0.05$). Diğer bir deyişle AFB₁ ve tüm dozlarda fipronil yumurtadan çıkış oranını azaltmıştır. Çıkışta elde edilen civcivler birkaç gün süreyle takip edilmiş, pozitif kontrol, 161 µg/yum ve 40.25 µg/yum fipronil gruplarında parmakları çarpık ve ayakta duramayan civcivler gözlenmiştir (Şekil 12a-d). Bununla birlikte anormal civciv oranı bakımından kontrol grubu ile diğer gruplar arasında önemli fark belirlenmemiştir ($p>0.05$). Bu gruplarda çıkış olmayan yumurtalarda anormal embriyo belirlenmediği için istatistik uygulama yapılmamış, mortalite ise negatif kontrol grubu dışında, hem pozitif kontrol hem de fipronil gruplarında kontrol grubundan önemli düzeyde yüksek çıkmıştır ($p<0.05$, Tablo 15). Çıkışta elde edilen civcivlerin çıkış ve 10. gün ağırlıkları ile 10. gün karaciğer ağırlıkları Tablo 16’da verilmiştir. Civciv çıkış ağırlığı bakımından kontrol grubu ile negatif kontrol grubu arasında fark gözlenmezken, pozitif kontrol ve fipronil grupları kontrol grubundan önemli düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.001$). Civciv 10. gün ağırlığı bakımından kontrol grubu ile negatif kontrol ve 40.25 µg/yum fipronil grubu arasında fark belirlenmezken, pozitif kontrol, 161 µg/yum ve 80.50 µg/yum fipronil gruplarının önemli düzeyde düşük olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). Civciv karaciğer ağırlığı bakımından ise sadece pozitif kontrol grubu kontrol grubundan önemli düzeyde azalma göstermiş ($p<0.05$), diğer gruplar ile kontrol grubu arasında fark belirlenmemiştir (Tablo 16). Çıkışta elde edilen civcivlerden negatif kontrol grubuna ait bir civciv 10. güne ulaşmadan doğal sebeplerden ölmüştür.

Kuluçka başlangıcında enjeksiyon yapılan bu denemeye ait kuluçkanın 7. ve 14. günlerinde ve çıkışta elde edilen sonuçlar total olarak Tablo 17’de verilmiştir. Tablo 17’de görülebileceği gibi total anormal embriyo ve civciv oranı bakımından ilginç bir sonuç olarak sadece 40.25 µg/yum yani en düşük dozdaki fipronil grubu kontrol grubundan önemli düzeyde yüksek bulunmuş ($p<0.05$), kontrol grubu ve diğer gruplar arasında önemli fark gözlenmemiştir. Total mortalite bakımından ise

tüm gruplar kontrol grubundan önemli düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$, Tablo 17).

Kuluçka başlangıcında enjeksiyon yapılan bu denemeye ait kuluçkanın 7. ve 14. günlerindeki ve çıkış olmayan yumurtalardaki ölü embriyoların HH skalasına göre gelişme evreleri dağılımı Tablo 18’de verilmiştir. Tablo 18’de görülebileceği gibi negatif ve pozitif kontrol ile 161 µg/yum ve 80.50 µg/yum fipronil gruplarında ölümlerin özellikle erken embriyonik dönemde, yani HH skalasına göre ilk 20 evrede diğer bir deyişle kuluçkanın ilk üç gününde yoğunlaştığı dikkat çekmektedir. 40.25 µg/yum fipronil ve pozitif kontrol grubunda ise HH skalasına göre 46. evrede diğer bir deyişle kabuk altı ölümün yoğunlaştığı görülmektedir. Diğer ölümler ise ara evrelerde dağılım göstermektedir (Tablo 18). Kabuk altı ölümü gerçekleşen yumurtalarda çoğunlukla civcivlerin gelişimlerini tamamlayarak yumurta kabuğunu çatlattığı ancak çıkış yapamadığı gözlenmiştir (Şekil 12f).

4.2.2. Kuluçkanın 8. Gününde Üç Farklı Dozda (161 µg/yum, 80.50 µg/yum ve 40.25 µg/yum) Yumurtaya Verilen Saf Fipronilin Tavuk Embriyoları ve Kuluçka Sonu Elde Edilen Erken Dönem Civcivleri Üzerindeki Etkileri

Beyaz yumurtacı damızlıklara ait yumurtaların kullanıldığı çalışmanın bu kısmında, hiçbir işlem uygulanmayan kontrol grubu yumurtalarındaki kuluçkanın 11. gününde gerçekleşen ağırlık kaybı oranı %6.20, 18. gününde gerçekleşen ağırlık kaybı oranı %10.35 olarak, total infertilite ise %4.76 olarak hesaplanmıştır.

Bu denemeye ait grupların kuluçkanın 11. gününde açılan yumurta sayısı, infertil ve fertil yumurta sayıları, anormal ve ölü embriyo sayıları ile infertilite hariç anormal embriyo oranları ve mortalite değerleri Tablo 19’da verilmiştir. Hem kontrol grubundaki (Şekil 13a) hem de deney gruplarındaki canlı ve anormallik göstermeyen embriyoların gelişimi kuluçkanın 11. gününde HH skalasına uygun olarak 37. evrede gerçekleşmiştir. Kuluçkanın bu gününde hiçbir işlem uygulanmayan kontrol ve çözücü grubu olarak negatif kontrol (%70’lik aseton) gruplarındaki embriyolarda herhangi bir anormallik gözlenmezken, pozitif kontrol I (80 ng/yum AFB₁), pozitif

kontrol II (50 µg/yum CP), pozitif kontrol III (250 µg/yum CP), pozitif kontrol IV (500 µg/yum CP) ve fipronil gruplarında hafif ve aşırı hemoraji, ödem ve beynin dışarıda gelişmesi gibi malformasyon tipleri gözlenmiştir (Şekil 13b-h). Özellikle CP gruplarında hemoraji en yoğun gözlenen anormallik tipi olmuştur. Tablo 19’da görülebileceği gibi pozitif kontrol III ve IV gruplarının anormal embriyo oranı kontrol grubundan önemli düzeyde yüksekken ($p<0.001$), kontrol grubu ile diğer gruplar arasında önemli fark belirlenmemiştir. Mortalite bakımından ise kontrol grubu ile negatif kontrol, pozitif kontrol I ve II grupları arasında fark görülmezken, pozitif kontrol III ve IV ile fipronil gruplarının mortalitesi kontrol grubundan önemli seviyede yüksek çıkmıştır ($p<0.05$, Tablo 19). Kuluçkanın 11. gününde gruplardaki embriyoların ortalama canlı ve nispi embriyo ağırlıkları, CRL değerleri ile karaciğer ağırlıkları Tablo 20’de verilmiştir. Tablo 20’de görülebileceği gibi canlı embriyo ağırlığı bakımından kontrol grubu ile negatif ve pozitif kontrol grupları arasında fark yokken, diğer gruplar kontrol grubundan önemli düzeyde düşüktür ($p<0.001$). Nispi embriyo ağırlığı bakımından kontrol grubu ile negatif kontrol, pozitif kontrol I, III ve IV grupları arasında fark yokken, diğer gruplar kontrol grubundan önemli düzeyde düşüktür ($p<0.001$). CRL değerlerine bakıldığında negatif kontrol ve pozitif kontrol I grupları dışında diğer tüm gruplar kontrol grubundan önemli düzeyde azalma göstermiştir ($p<0.001$). Karaciğer ağırlığı ise negatif kontrol grubu dışında diğer tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde azalmıştır ($p<0.001$, Tablo 20). Alizarin Red-S ile yapılan iskelet boyamalarında özellikle fipronil gruplarından alınan örneklerin hepsinde makroskopik olarak kontrol ve negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında iskelet gelişimlerinde dikkat çekici gecikme gözlenmiştir (Şekil 14a ve b).

Bu denemeye ait grupların kuluçkanın 18. gününde açılan yumurta sayısı, infertil ve fertil yumurta sayıları, anormal ve ölü embriyo sayıları ile infertilite hariç anormal embriyo oranları ve mortalite değerleri Tablo 21’de verilmiştir. Hem kontrol grubundaki (Şekil 15a) hem de deney gruplarındaki canlı ve anormallik göstermeyen embriyoların gelişimi kuluçkanın 18. gününde HH skalasına uygun olarak 44. evrede gerçekleşmiştir. Kuluçkanın bu gününde sadece 161 µg/yum fipronil grubunda, ödem, genel gelişim geriliği, çapraz gaga, çarpık parmak, tek göz anormalliği gibi malformasyonlara sahip anormal embriyolar gözlenmiş (Şekil 15a-c), diğer gruplarda

herhangi bir anormalliğe rastlanmamıştır. Bununla birlikte Tablo 21’de görülebileceği gibi anormal embriyo oranı bakımından kontrol grubu ile 161 µg/yum fipronil grubu arasında önemli fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Mortalite ise negatif ve pozitif kontrol gruplarında kontrol grubundan fark göstermezken, tüm fipronil gruplarında kontrol grubundan önemli düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$, Tablo 21). Kuluçkanın 18. gününde gruplardaki embriyoların ortalama canlı ve nispi embriyo ağırlıkları, CRL değerleri ile karaciğer ağırlıkları Tablo 22’de verilmiştir. Tablo 22’de görülebileceği gibi canlı ve nispi embriyo ağırlıkları bakımından kontrol grubu ile negatif ve pozitif kontrol grubu istatistiksel olarak önemli fark göstermezken, fipronil grupları kontrol grubundan önemli düzeyde azalma göstermiştir ($p<0.001$). CRL değerleri bakımından kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$). Karaciğer ağırlığı bakımından ise kontrol grubu ile negatif kontrol grubu arasında önemli fark belirlenmezken, pozitif kontrol ve fipronil grupları kontrol grubundan önemli düzeyde azalma göstermişlerdir ($p<0.001$, Tablo 22). Bu denemeye ait gruplardan alınan örneklerin üyelerine uygulanan Alizarin Red-S boyaması sonucu, fipronil gruplarından alınan bazı örneklerin makroskobik olarak kontrol ve negatif kontrol gruplarına kıyasla kemik gelişimlerinde gecikmeler gözlenmiştir (Şekil 16a-c).

Kuluçkanın 8. günü enjeksiyon yapılan bu denemede çıkışa bırakılan yumurtalardan elde edilen civciv ve anormal civciv sayıları, anormal ve ölü embriyo sayıları ile bunlara ait oranlar Tablo 23’de verilmiştir. Tablo 23’de görülebileceği gibi kontrol grubunda %91.67 gibi yine yüksek bir oranda çıkış elde edilmiş bununla birlikte 161 µg/yum ve 80.50 µg/yum fipronil gruplarından çıkış elde edilememiştir. Negatif kontrol grubunda civciv çıkış oranı azalmakla birlikte kontrol grubu ile arasında önemli fark belirlenmezken, pozitif kontrol ve tüm fipronil gruplarının civciv çıkış oranı kontrol grubundan önemli düzeyde düşük çıkmıştır ($p<0.05$). Bu denemede de AFB₁ ve özellikle fipronil yumurtadan çıkış oranını azaltmıştır. Bu denemedeki çıkışta elde edilen civcivler de birkaç gün süreyle takip edilmiş, pozitif kontrol ve 40.25 µg/yum fipronil gruplarında parmakları çarpık ve ayakta duramayan civcivler gözlenmiş (Şekil 12e) ve pozitif kontrol grubunun anormal civciv oranı kontrol grubundan önemli düzeyde yüksek çıkmıştır ($p<0.05$). Bu gruplarda çıkış

olmayan yumurtalardaki anormal embriyo oranları kontrol grubu ile diğer gruplar arasında fark göstermemiştir ($p>0.05$). Mortalite ise pozitif kontrol ve fipronil gruplarında kontrol grubundan önemli düzeyde yüksek çıkmıştır ($p<0.05$, Tablo 23). Çıkışta elde edilen civcivlerin çıkış ve 10. gün ağırlıkları ile 10. gün karaciğer ağırlıkları Tablo 24’de verilmiştir. Civciv çıkış ve civciv 10. gün ağırlığı bakımından kontrol grubu ile negatif kontrol grupları arasında fark gözlenmezken, pozitif kontrol ve 40.25 µg/yum fipronil gruplarında kontrol grubundan önemli düzeyde azalma belirlenmiştir ($p<0.05$). Civciv karaciğer ağırlığı bakımından ise ilginç bir sonuç olarak 40.25 µg/yum fipronil grubunda kontrol ve negatif kontrol gruplarına kıyasla bir artış olmakla birlikte, gruplar arasında önemli bir fark belirlenmemiştir ($p>0.05$, Tablo 24). Çıkışta elde edilen civcivlerden pozitif kontrol grubuna ait bir civciv ise 10. güne ulaşmadan ölmüştür.

Kuluçkanın 8. gününde enjeksiyon yapılan bu denemeye ait kuluçkanın 11. ve 18. günlerinde ve çıkışta elde edilen sonuçlar total olarak Tablo 25’de verilmiştir. Tablo 25’de görülebileceği gibi total anormal embriyo ve civciv oranı bakımından pozitif kontrol ve 161 µg/yum fipronil grubu kontrol grubundan önemli düzeyde yüksek bulunmuş ($p<0.05$), diğer gruplar ise kontrol grubundan fark göstermemiştir. Total mortalite bakımından ise tüm gruplar kontrol grubundan önemli düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$, Tablo 25).

Kuluçkanın 8. gününde diğer bir deyişle HH skalasına göre 34. evrede enjeksiyon yapılan bu denemeye ait kuluçkanın 11. ve 18. günlerinde ve çıkış olmayan yumurtalardaki ölü embriyoların HH skalasına göre gelişme evreleri dağılımı Tablo 26’da verilmiştir. Tablo 26’da görülebileceği gibi kontrol grubunda bir yumurtada kabuk altı ölüm gözlenmiştir. Diğer tüm gruplarda ölümler özellikle 34. ve 35. evrede yani enjeksiyondan kısa süre sonra gerçekleşmiştir. Diğer ölümler ise kabuk altı ölüm olarak yoğunlaşmış, az sayıdaki ölüm ise diğer evrelerde yayılış göstermiştir (Tablo 26).

Aynı dozlarda fakat farklı enjeksiyon zamanındaki muamelenin kıyaslanması amacıyla, kuluçka öncesi ve kuluçkanın 8. günlerinde enjeksiyon yapılan grupların civciv çıkış ve anormal civciv oranlarının karşılaştırılması Tablo 27’de verilmiştir.

Tablo 27’de görülebileceği gibi kuluçkanın 8. günü enjekte edilen aynı dozlardaki fipronil (161 µg/yum ve 80.50 µg/yum fipronil) kuluçka başlangıcında enjekte edilene kıyasla civciv çıkış oranını önemli düzeyde azaltmıştır ($p<0.05$). Anormal civciv oranı bakımından ise enjeksiyon zamanının farklı olması hiçbir grupta önem göstermemiştir (Tablo 27). Kuluçka öncesi ve kuluçkanın 8. günlerinde enjeksiyon yapılan grupların embriyonik dönemde ve çıkışta elde edilen total verilerinin karşılaştırılması ise Tablo 28’de verilmiştir. Tablo 28’de görülebileceği gibi enjeksiyon zamanının farklı olması anormal embriyo ve civciv oranı bakımından fipronil grupları arasında farka sebep olmamıştır. Bununla birlikte aynı dozlarda 8. günde yapılan enjeksiyon kuluçka başlangıcında yapılan enjeksiyona kıyasla tüm fipronil gruplarında mortaliteyi önemli oranda artırmıştır (161 µg/yum ve 80.50 µg/yum fipronil grupları için $p<0.001$ ve 40.25 µg/yum fipronil grubu için $p<0.05$, Tablo 28).

4.2.3. Kuluçkanın 8. Günü Enjekte Edilen Fipronilin Tavuk Embriyolarının 11. Gününde Periferal Alyuvarlarındaki MN ve Anormal Çekirdek Oluşumu Üzerine Etkileri

Kuluçkanın 11. gününde embriyolardan alınan periferal kan örneklerinden hazırlanan preparatlardaki hücre populasyonunu çok büyük oranda sekonder alyuvarların (E II) oluşturduğu (özellikle olgun normokromatik ve geç-polikromatik alyuvarlar olmak üzere erken- ve orta-polikromatik alyuvarlar), bunun yanı sıra geri kalan düşük oranda ise pirimitif normokromatik alyuvarların bulunduğu gözlenmiştir. Bu hücre tiplerine ve bu hücrelerde gözlenen MN ve NA’lara ait fotoğraflar Şekil 17-22’de görülmektedir. Trombositler ve özellikle diğer hücre tipleri nadiren gözlenebilmiştir.

Kuluçkanın 8. gününde enjeksiyon gerçekleştirilen ve 11. gününde kan örnekleri alınan gruplara ait MN, NA, hem MN hem de NA ihtiva eden alyuvarların ortalama oranları ile alyuvarlardaki ortalama total anormallik ve mitotik figür oranları Tablo 29’da verilmiştir. Pozitif kontrol IV (500 µg/yum CP) grubunda

sadece bir canlı embriyo belirlenmiş bundan da kan örneği alınamadığı için bu grupta değerlendirme yapılamamıştır.

Tablo 29’da görülebileceği gibi, hiçbir işlem uygulanmayan kontrol grubunda çok düşük oranda olmakla birlikte doğal MN ve NA’lar gözlenmiştir. Çözücü grubu olarak negatif kontrol (%70’lik aseton) ve embriyotoksiste açısından pozitif kontrol amacıyla kullandığımız 80 ng/yum AFB₁ (pozitif kontrol I) gruplarında gözlenen MN, NA ve total anormallik oranı kontrol grubuna göre bir artış göstermekle birlikte, kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli düzeyde fark belirlenmemiştir ($p>0.05$). Ayrıca MN ve NA’yı birlikte ihtiva eden hücre oranı ve mitotik figür oranı bakımından da negatif kontrol ve 80 ng/yum AFB₁ grupları kontrol grubundan önemli fark göstermemiştir ($p>0.05$, Tablo 29).

Tablo 29’da görülebileceği gibi, MN testi için pozitif kontrol grubu olarak oluşturduğumuz 50 µg/yum CP (pozitif kontrol II) ve 250 µg/yum CP (pozitif kontrol III) gruplarında MN oranı kontrol grubuna kıyasla çok büyük oranda artış göstermiştir ve aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). CP dozundaki artışa paralel olarak 250 µg/yum CP dozunda, 50 µg/yum CP grubuna göre artış çok daha yüksek düzeyde olmuş ve bu iki grup arasındaki fark da önemli bulunmuştur ($p<0.05$). NA oranı bakımından 50 µg/yum CP grubundaki artış kontrol grubuna kıyasla önemsiz bulunmuş ($p>0.05$), 250 µg/yum CP grubunda çok daha yüksek bir oranda artış gözlenmiş ve aradaki fark önemli bulunmuştur ($p<0.05$). NA oranı bakımından bu iki CP dozu arasındaki fark da önemli bulunmuştur ($p<0.05$). MN ve NA’yı birlikte ihtiva eden hücre oranı bakımından kontrol grubuna kıyasla yine sadece 250 µg/yum CP grubundaki artış önemli bulunmuştur ($p<0.05$). MN ve NA’yı birlikte ihtiva eden hücre oranı bakımından iki CP dozu arasındaki fark da önemlidir ($p<0.05$). Total anormallik oranı bakımından her iki CP grubunda da kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde artış olmuştur ($p<0.05$). Total anormallikler bakımından iki CP grubu arasındaki fark da önemlidir ($p<0.05$). Mitotik figür oranı bakımından ise kontrol grubu ile 50 µg/yum CP grubu arasında fark yokken ($p>0.05$), 250 µg/yum CP grubu arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0.05$, Tablo 29).

Tablo 29’da görülebileceği gibi, 161 µg/yum, 80.50µg/yum ve 40.25 µg/yum olmak üzere üç farklı dozda uygulanan fipronil gruplarının hepsinde MN oranı kontrol ve negatif kontrol gruplarına kıyasla artış göstermiş, bununla birlikte her üç dozdaki bu artış istatistiksel olarak kontrol grubuna kıyasla önemli ($p<0.05$), negatif kontrol grubuna kıyasla önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). MN oranı bakımından üç fipronil grubu arasındaki farklar ise önemsizdir ($p>0.05$). NA oranı bakımından 161 µg/yum ve 80.50µg/yum fipronil grupları hem kontrol hem de negatif kontrol gruplarından önemli fark göstermezken ($p>0.05$), 40.25 µg/yum fipronil grubundaki artış kontrol grubundan önemli ($p<0.05$), negatif kontrol grubundan önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). NA oranı bakımından üç fipronil grubu arasındaki farklar ise önemsizdir ($p>0.05$). MN ve NA’yı birlikte ihtiva eden hücre oranı bakımından fipronil gruplarıyla kontrol ve negatif kontrol grupları arasında ve fipronil gruplarının kendi aralarında fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). Total anormallik oranı bakımından NA oranındaki sonuçlara benzer şekilde, 161 µg/yum ve 80.50µg/yum fipronil gruplarının hem kontrol hem de negatif kontrol gruplarından önemli fark göstermediği ($p>0.05$), 40.25 µg/yum fipronil grubundaki artışın ise kontrol grubundan önemli ($p<0.05$), negatif kontrol grubundan önemsiz olduğu bulunmuştur ($p>0.05$). Total anormallikler bakımından fipronil gruplarının kendi aralarında da fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). Mitotik figür oranı bakımından ise sadece 40.25 µg/yum fipronil grubundaki artış hem kontrol hem de negatif kontrol grubuna kıyasla önemli bulunmuştur, ancak bu verideki bireysel farklılıkların çokluğu dikkat çekmektedir ($p<0.05$, Tablo 29).

4.2.4. Kuluçka Başlangıcında Letal (LD₅₀-161 µg/yum) ve Subletal Dozlarda (80.50 µg/yum ve 40.25 µg/yum) Saf Fipronil Verilen Yumurtalardan Elde Edilen Cıvcivlerin 10. Gün Alyuvar ve Akyuvar Sayıları ile Lenfosit ve ANAE(+) Lenfosit Oranları

Kuluçka başlangıcında (LD₅₀-161 µg/yum) ve subletal dozlarda (80.50 µg/yum ve 40.25 µg/yum) saf fipronil verilen yumurtalardan elde edilen cıvcivlerden 10. günde alınan kan örneklerindeki ortalama alyuvar ve akyuvar sayıları Tablo 30’da verilmiştir. Bu veriler içerisinde hiçbir işlem uygulanmayan kontrol grubuna ait

akyuvar sayındaki bireysel farklılıklar dikkat çekmektedir. Tablo 30'da görülebileceği gibi alyuvar sayısı kontrol grubuna kıyasla çözücü grubu olan negatif kontrol (%100'lük aseton) grubunda bir artış göstermiş ancak bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). Fipronil gruplarında ise azalma olmakla birlikte yine aradaki farklar önemli değildir ($p>0.05$). Sadece 161 $\mu\text{g}/\text{yum}$ fipronil grubundaki azalma negatif kontrol grubuna kıyasla önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Fipronil gruplarının kendi aralarındaki farklar ise önemli düzeyde bulunmamıştır ($p>0.05$). Pozitif kontrol (40 ng/yum AFB₁) grubu da kontrol grubundan önemli fark göstermemiştir ($p>0.05$, Tablo 30). Akyuvar sayısı bakımından ise yine kontrol grubuna kıyasla negatif kontrol grubunda bir artış gözlenmiş ancak bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). Ayrıca kontrol ve negatif kontrol gruplarındaki bireysel farklılıklar dikkat çekmektedir. Fipronil gruplarında hem kontrol hem de negatif kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde azalma gerçekleşmiştir ($p<0.05$). Sadece 80.50 $\mu\text{g}/\text{yum}$ fipronil grubundaki azalma kontrol grubundan önemli fark göstermemiştir ($p>0.05$). Fipronil gruplarının kendi aralarındaki farklar önemli düzeyde bulunmamıştır ($p>0.05$). Pozitif kontrol grubu ise kontrol grubundan önemli düzeyde azalma göstermiştir ($p<0.05$, Tablo 30).

Alınan kan örneklerinden hazırlanan frotilerdeki küçük, orta ve büyük tip lenfositlerin fotoğrafı Şekil 23'de, enzim demonstrasyonu sonucu belirlenen ANAE(-) ve ANAE(+) lenfositler ile diffüze pozitiviteye sahip bir monosite ait fotoğraflar Şekil 24'de görülmektedir. Frotilerdeki değerlendirmeler sonucu elde edilen ortalama lenfosit ve ANAE(+) lenfosit oranları da Tablo 30'da görülmektedir. Lenfosit oranı bakımından kontrol grubuna kıyasla negatif kontrol grubunda az bir artış gözlenmiş ancak bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). Kontrol ve negatif kontrol gruplarına kıyasla diğer gruplarda azalmalar olmakla birlikte ilginç bir şekilde sadece en düşük doz olan 40.25 $\mu\text{g}/\text{yum}$ fipronil grubu kontrol ve negatif kontrol grubundan önemli fark göstermiştir ($p<0.05$). 80.50 $\mu\text{g}/\text{yum}$ fipronil grubu ise negatif kontrol grubundan önemli fark göstermiştir ($p<0.05$). Fipronil gruplarının kendi aralarındaki farklar önemli düzeyde bulunmamıştır ($p>0.05$). İlginç bir sonuç olarak pozitif kontrol grubu da kontrol grubundan önemli fark göstermemiştir ($p>0.05$, Tablo 30). ANAE(+) lenfosit oranı bakımından da kontrol grubuna kıyasla negatif kontrol grubunda az bir artış

gözlenmiş ancak bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). Fipronil gruplarının hepsinde hem kontrol hem de negatif kontrol gruplarına kıyasla ANAE(+) lenfosit oranı önemli düzeyde azalma göstermiştir ($p<0.05$). Fipronil gruplarına bakıldığında ise, 161 $\mu\text{g}/\text{yum}$ ve 40.25 $\mu\text{g}/\text{yum}$ fipronil grupları ile 80.50 $\mu\text{g}/\text{yum}$ ve 40.25 $\mu\text{g}/\text{yum}$ fipronil grupları arasındaki farklar önemsizdir ($p>0.05$). Pozitif kontrol grubu da kontrol grubundan önemli düzeyde azalma göstermiştir ($p<0.05$, Tablo 30).

4.2.5. Kuluçkanın 8. Gününde Üç Farklı Dozda (161 $\mu\text{g}/\text{yum}$, 80.50 $\mu\text{g}/\text{yum}$ ve 40.25 $\mu\text{g}/\text{yum}$) Saf Fipronil Verilen Yumurtalardan Elde Edilen Cıvcıvlerin 10. Gün Alyuvar ve Akyuvar Sayıları ile Lenfosit ve ANAE(+) Lenfosit Oranları

Kuluçka başında verilen dozlarla aynı olmakla birlikte kuluçkanın 8. gününde üç farklı dozda verilen fipronil gruplarındaki yüksek mortalite sebebiyle, 161 $\mu\text{g}/\text{yum}$ ve 80.50 $\mu\text{g}/\text{yum}$ fipronil gruplarında çıkış elde edilememiş, sadece 40.25 $\mu\text{g}/\text{yum}$ fipronil grubundan 3 civciv elde edilmiş, grup ve birey sayısı az olmakla birlikte değerlendirme yapılmıştır. Gruplardan elde edilen civcivlerden 10. günde alınan kan örneklerindeki ortalama alyuvar ve akyuvar sayıları Tablo 31’de verilmiştir. Tablo 31’de görülebileceği gibi alyuvar sayısı bakımından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). Akyuvar sayısı bakımından da pozitif kontrol (80 ng/yum AFB₁) ve fipronil grubunda azalmalar olmakla birlikte yine gruplar arasındaki fark önemli bulunmamıştır ($p>0.05$, Tablo 31).

Frotillerdeki değerlendirmeler sonucu elde edilen ortalama lenfosit ve ANAE(+) lenfosit oranları da Tablo 31’de görülmektedir. Lenfosit oranı bakımından hiçbir işlem uygulanmayan kontrol ve çözücü grubu olan negatif kontrol (%70’lik aseton) grupları arasındaki fark önemli değildir ($p>0.05$). 40.25 $\mu\text{g}/\text{yum}$ fipronil grubu ise hem kontrol hem de negatif kontrol gruplarından önemli düzeyde azalma göstermiştir ($p<0.05$). Pozitif kontrol grubunda kontrol grubuna kıyasla önemli azalma belirlenmiştir ($p<0.05$, Tablo 31). ANAE(+) lenfosit oranı bakımından

negatif kontrol grubunda azalma olmakla birlikte kontrol grubuyla aradaki fark önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). 40.25 µg/yum fipronil grubunda gözlenen azalma ise kontrol grubundan fark göstermiş ($p<0.05$), bununla birlikte negatif kontrol grubundan fark göstermemiştir ($p>0.05$). Pozitif kontrol grubunda ise kontrol grubuna göre önemli düzeyde azalma belirlenmiştir ($p<0.05$, Tablo 31).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

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) dömlü 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. CHEST-I'de; uygun çözücüde $1/10^2$ - $1/10^6$ oranlarında onluk geometrik dizide farklı konsantrasyonları hazırlanmış test maddeleri HH skalasına göre 10-11. evredeki sağlıklı embriyoların kaudal bölgesi altına mikroskop altında özel mikroenjektör ile enjekte edilir. 24 saat daha kuluçka işleminden sonra yumurtalar açılarak vitellüs atardamarları ile kuyruk sonu arasındaki mesafe oküler mikrometreli diseksiyon mikroskopunda ölçülür ve anormal embriyolar tespit edilir. Negatif bir doz-cevap ilişkisi uygulanan maddenin etkili olduğunu gösterir. Etkisiz son doz ve etkili ilk doz arasındaki bölge embriyotoksik saha olarak belirlenir. CHEST-II'de ise CHEST-I'de elde edilen embriyotoksik aralıktaki dozlar HH skalasına göre 11-14. evredeki embriyolara subgerminal olarak, 17-20. evredeki ve 21-24. evredeki embriyolara intraamniyotik yolla enjekte edilir. Kuluçkaya 8. güne kadar devam edilerek teratojenik açıdan değerlendirmeler yapılır (Jelinek ve ark. 1985, Davies ve Freeman 1995). CHEST-I oldukça hassas olmakla birlikte manipülasyon zorluğu ve kusursuz bir sterilizasyon sağlanması gibi güçlüklerle sahiptir. Ayrıca embriyonun sadece arka bölümü değerlendirmeye alındığından, başka vücut bölümlerindeki etkilerin gözden kaçması ihtimali de yüksektir. 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 gözlemiştir.

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. Örneğin; embriyotoksik konsantrasyon sınırları 10^{-4} - 10^{-3} arası olan bir madde, çarpma işlemi sonucu $(10^{-4}-10^{-3})\times 10^{-2}=10^{-6}$ - 10^{-5} embriyoyoksik doz aralığına sahiptir. Bu aralık 1-10 mg/kg (anne ağırlığı için) aralığına karşılık gelmektedir ki, madde bu doz aralığında gebeye verildiğinde memeli embriyosunda toksisiteye sebep olabilir. Her ne kadar CHEST'in sonuçlarının memelilere ve özellikle insana uygulanmasında tür farklılığı karşımıza çıkarsa da, bütün türlerde morfogenetik olaylar ve bunların seyri ortaktır (Jelinek 1977). Zira diğer embriyotoksikite testlerinde de insan harici memeliler kullanılmaktadır.

CHEST'in yanı sıra dömlü tavuk yumurtası kullanılarak çeşitli modifikasyonlarla, Kemper ve Luepke (1986) Tavuk Yumurtası Testini (Hen's Eggs Test, HET), Nishigori ve ark. (1992) Dömlü 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 1991, Özcan 1992, Jelinek ve Marhan 1994, Davies ve Freeman 1995). Bununla birlikte tavuk embriyosu kullanılan bu modellerde plasenta ve memelilerdeki anne-fötüs ilişkisi olmaması, ayrıca bazı bileşiklerin nonspesifik bir hassasiyet göstererek hatalı pozitif sonuçlar verebilmesi dezavantajları olarak kabul edilmektedir (Özcan 1992). Kemper ve Luepke (1986) HET ile ölüm oranının (LD_{50}), gelişme geriliğinin (yumurtadan çıkış ağırlığı, kemik uzunlukları ve organ ağırlıkları), teratojenitenin (iskelet gelişimi anormallikleri, makroskopik ve anatomik

anormallikler), sistemik etkilerin (kan kimyasal parametreleri, 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) İritant Etki İçin 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 iritasyon potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Rosenbruch ve Holst (1990) ise HET-CAM'a alternatif, yumurta sarısı kesesi kan damarları sistemi ile benzer bir model geliştirmişlerdir. Benzer şekilde Neumann ve ark. (1997), tavşan göz iritasyon 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.

Denemelerimizde kontrol grubu yumurtalarında kuluçka boyunca gerçekleşen ağırlık kayıpları önerilen oranlara yakındır. Mauldin'e (1993) 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 durum bu çalışmada sağlanan kuluçka şartlarının optimal olduğunu göstermektedir. Kuluçka şartlarının uygunluğuna işaret eden bir diğer nokta denemelerimizde kuluçkanın 7., 11., 14., 15. ve 18. günlerinde hiçbir işlem uygulanmayan kontrol grubuna ait ortalama canlı embriyo ağırlıklarının, bu günler için Romanoff'un (1997) bildirdiği değerlere oldukça yakın olmasıdır.

In ovo embriyotoksosite 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 embriyotoksosite çalışmalarında test edilecek maddenin yumurtaya verilişinde hava kamarasına, embriyonun kaudal bölgesine, albümine ve yumurta sarısına enjeksiyon yöntemleri uygulanmış, bu çalışmada hava kamarasına enjeksiyon yöntemi tercih edilmiştir. 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 basıncıdaki artışın embriyoda meydana getirebileceği mekanik hasarları ortadan kaldırdığı için hava kamarası ideal enjeksiyon bölgesi olarak kabul edilmektedir (Prelusky ve ark. 1987, Çelik ve ark. 2000, Sur 2001, Öznurlu 2003). Ayrıca çeşitli pestisitlerle yapılan çalışmalarda da kuluçkanın değişik günlerinde hava kamarasına enjeksiyon tercih edilmiştir (Wyttenbach ve Thompson 1985, Varga ve ark. 1999, Varga ve ark. 2002, Varnagy 1999, Varnagy ve ark. 2001, Budai ve ark. 2001, Budai ve ark. 2002, Fejes ve ark. 2002). Tüm bu avantajlarına rağmen, hava kamarasına yapılan enjeksiyonda maddenin tamamının embriyoya ulaşip ulaşmadığının belirlenememesi bu yöntemin önemli bir dezavantajıdır (Prelusky ve ark. 1987).

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). 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 olmakta 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 vurgulamışlar, promutajenler ile yaptıkları genotoksisite çalışmalarında enjeksiyonları kuluçkanın 8. gününde gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada öncelikle saf ve ticari fipronilin metabolize olmamış yani doğal formunun etkilerinin belirlenmesi amaçlandığından kuluçka başlangıcında enjeksiyon tercih edildi. Bu dönemde tavuk embriyosu (blastoderm), blastula aşamasındadır ve yaklaşık 400.000 adet, henüz diferansiyasyonun başlangıcındaki hücrelerden oluşan hücre topluluğu halindedir (Kucera ve Burmond 1987). Hücreler şeffaf bir area pellucida'nın etrafındaki yüzük biçimli bir sahada area opaca'da toplanmışlardır. Area opaca'nın yüzey hücrelerinin altında ikinci bir hücre katmanı yani hipoblast hücre katmanı bulunur (Etches 1996). 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 morfojenetik olay, kuluçkanın bu erken evresinde gerçekleşir (Kucera ve Burmond 1987, Etches 1996). Bu dönemde ortaya çıkan ve embriyonik gelişmeyi bozan fiziksel yada kimyasal etkiler, embriyonik ölümlere sebep olmaları yanında, önemli yapısal ve fonksiyonel bozukluklara da sebep olmaktadır (Kucera ve Burmond 1987). Bazı maddeler metabolik etkiler sonucunda toksisite ve teratojenite kazandıklarından yada bu etkileri daha da güçleneceğinden, erken dönemde yapılacak enjeksiyonla elde edilecek hatalı-negatif sonuçlar söz konusu olabilir. Hatalı-pozitif sonuçlar ise daha az tehlikelidir. Zira bu hatalı sonuçlar sadece para ve zaman israfına sebep olacaktır (Johnson 1986). Bu tür hatalı sonuç ihtimalleri göz önüne alınarak, fipronilin ve metabolitlerinin olası embriyotoksik, teratojenik ve genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla çalışmanın diğer aşamasında, tavuk embriyolarında metabolik

aktivasyonun yoğun olduğu kuluçkanın 8. günü enjeksiyon zamanı olarak belirlenmiştir.

Enjekte edilecek solüsyon için farklı çalışmalarda 3-100 µl/yum arasında değişen solüsyon hacimleri kullanılırken, hava kamarasına yapılacak enjeksiyonlar için Çelik ve ark.'nın (2000) 20 µl'den daha fazla hacimdeki test solüsyonunun yumurta içi basıncı artırarak zararlı etkilerinin olabileceğini ve bu durumun test maddesinin etkisini maskeleyebileceğini bildirmesi dikkate alınarak, bu çalışmada kuluçka başlangıcında enjeksiyon yapılan denemelerde 20 µl/yum solüsyon hacmi kullanılmıştır. 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), Budai ve ark. (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. Diğer bir deyişle, mekanik hasarların daha az etkili olduğu kuluçkanın ilerleyen günlerinde çok daha yüksek solüsyon hacimleri tercih edilmiştir. Tüm bu çalışmalar ışığı altında, bu çalışmada kuluçkanın 8. gününde yapılan enjeksiyonlar için embriyonun tolere edebileceği düşünölen 40 µl/yum solüsyon hacmi tercih edilmiştir.

Jelinek ve ark. (1985) enjekte edilen solüsyonların 4-9 arasındaki pH değerlerinin embriyolar tarafından iyi tolere edildiğini bildirmişler, bu çalışmada da kullanılan solüsyonların pH'sı 5.5-6.5 arası olarak belirlenmiştir.

Bir maddenin embriyotoksitesinin belirlenmesi amacıyla yapılacak olan çalışmalarda test edilecek maddenin farklı dozları denenmelidir. Brown ve ark. (1986) en az üç farklı dozun denenmesi gerektiğine işaret etmiş, Çelik ve ark.'da (2000) AFB₁ ile gerçekleştirdikleri benzer bir embriyotoksitesite çalışmasında en az üç farklı doz kullanmışlardır. Daha önce fipronilin tavuk embriyoları üzerindeki etkilerine ait bir literatür bulunmadığı için bu çalışmadan önce geniş doz

aralıklarındaki solüsyonlarla ön denemeler yapılmış, elde edilen verilere dayanılarak bu çalışmada dört farklı doz kullanılarak LD₅₀ tayini denemeleri yapılmış, elde edilen LD₅₀ değeri ve iki subletal doz kullanılarak diğer denemeler gerçekleştirilmiştir.

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 güvenilirliği açısından her grup için en az 20 yumurta kullanılmasını önermişlerdir. Bu çalışmada da LD₅₀ tayininin yapıldığı denemelerde gruplar 20'şer yumurtadan oluşturulmuş, diğer denemelerde ise her grup 36 yumurtadan oluşturulmuş, embriyonik dönemlerde her gruptan 12 yumurta açılmış ve çıkışa da 12'şer yumurta bırakılmıştır.

CHEST ve modifikasyonlarının uygulandığı çalışmalarda, test edilecek maddelerin uygun çözücülerde çözdürülmeleri gerekir. Çözücü olarak serum fizyolojik, bidistile su, %30'luk etanol, %10'luk dimetilsülfoksit (DMSO), ayçiçeği yağı ve %1'lik karboksimetilselüloz (CMC) kullanılmakla birlikte (Davies ve Freeman 1995), bu çözücülerde fipronilin iyi çözünmemesinden dolayı, bu çalışmada fipronil aktif maddesi için en iyi çözücü olan aseton tercih edilirken, ticari fipronil için tarla şartlarındaki kullanım şekli dikkate alınarak bidistile su çözücü olarak tercih edilmiştir. Aseton; su ile iyi karışması, yüksek evaporasyon özelliği ve düşük viskoziteli olması nedeniyle iyi bir organik çözücü olarak kabul edilmektedir (Krasavage ve ark. 1982). Asetonun test edilecek kimyasal maddelerin olası genotoksik etkilerini değiştirdiğine dair deliller bulunmadığından özellikle genotoksisite çalışmalarında çözücü olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (ATSDR 1994). Bunun yanı sıra tavuk embriyoları üzerinde yapılan bazı çalışmalarda da, organik klorlu bir insektisit olan DDT'nin, mikotoksinlerden AFB₁'in, bir herbisit olan 2,4-diklorofenoksiasetik asit'in ve piretroit grubu bir insektisit olan sipermetrin'in tavuk yumurtasına enjeksiyonunda çözücü olarak aseton kullanılmıştır (Dunachie ve Fletcher 1969, Neldon-Ortiz ve Qureshi 1992, Arias 2003, Anwar 2003). Korhonen ve ark. (1983) 5 µl/yum aseton enjeksiyonunun mortalite ve embriyo anormallikleri üzerinde etkili olmadığını göstermişlerdir. Ameenuddin ve Sunde (1984) ise çeşitli çözücülerin tavuk embriyoları üzerindeki

etkilerine ait çalışmalarında hava kamarası yolu ile 100 µl/yum aseton enjeksiyonunun kuluçkanın ilk haftası %42.1, ikinci haftasında %7.8, üçüncü haftasında ise %0 mortalite ile sonuçlandığını ayrıca yumurtadan çıkma oranının da azaldığını belirlemişlerdir. Neldon-Ortiz ve Qureshi (1992) ise kuluçkanın 6. gününde hava kamarası yoluyla 10 µl aseton enjeksiyonunun kuluçka sonunda %13.33 mortalite ile sonuçlandığını belirlemişlerdir. Kuluçka başlangıcında enjeksiyon yaptığımız denemelerde negatif kontrol grubu (çözücü grubu) olarak oluşturduğumuz %100'lük aseton enjekte edilen yumurtalardaki mortalite, anormal embriyo oranları, canlı ve nispi embriyo ağırlıkları, CRL değerleri, karaciğer ağırlıkları, civciv çıkış ve anormal civciv oranları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında azalma veya artış gösterse de istatistiksel olarak önemli fark belirlenmemiştir. Sadece total mortalite bakımından kontrol grubundan önemli düzeyde azalma gözlenmiştir. Bu gruplarda asetona dayalı ölümler HH skalasına göre özellikle erken embriyonik dönemde gerçekleşmiştir. Elde edilen veriler asetonun EEÖ'lere sebep olmasının dışında kuluçka başında 20 µl hacminde enjeksiyon yapılan çalışmalar için uygun bir çözücü olduğuna işaret etmektedir. Kuluçkanın 8. gününde enjeksiyon yaptığımız denemede negatif kontrol grubu olarak oluşturduğumuz %70'lik aseton enjekte edilen yumurtalardan elde ettiğimiz verilere bakıldığında ise yine kontrol grubuna kıyasla azalmalar gözlenirse de istatistiksel olarak önemli fark belirlenmemiştir. Sadece kuluçkanın 18. günündeki CRL değerleri kontrol grubundan önemli düzeyde düşük çıkmış, ancak aynı evredeki canlı ve nispi embriyo ağırlıkları bu azalmayı desteklememiştir. Total mortalite bakımından da kontrol grubundan önemli düzeyde azalma gözlenmiştir. Bu gruptaki ölümler ise özellikle HH skalasına göre 34. evrede diğer bir deyişle enjeksiyonun hemen ardından ve 46. evrede kabuk altı ölümü olarak gerçekleşmiştir. Elde edilen bu verilere göre kuluçkanın 8. gününde 40 µl hacminde %70'lik aseton enjeksiyonunun önemli bir yan etkisi gözükmemektedir. Çalışmamızda bu şartlar altında çözücü olarak kullanılan asetonun test edilen fipronilin etkisini maskeleyebilecek bir etkisi olduğunu düşünmüyoruz. Ayrıca kuluçka başlangıcında 20 µl %100'lük aseton ve kuluçkanın 8. gününde 40 µl %70'lik aseton enjeksiyonunun civciv çıkış oranı ve total mortalite bakımından da önemli fark göstermediği belirlenmiştir.

Embriyotoksisite çalışmalarında embriyotoksik etkisi önceden bilinen bir madde kullanarak pozitif kontrol grubu oluşturmak çalışmanın güvenilirliğini daha da artırmaktadır. AFB₁ kanatlılarda toksik etkileri çok iyi belirlenmiş ve metabolize olmamış doğal formunda bile yüksek derecede embriyotoksik etki gösteren bir madde olup, özellikle erken embriyonik dönem ölümlerine sebep olmaktadır (Çelik ve ark. 2000). Çelik ve ark. (2000) AFB₁'in embriyotoksik etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada kahverengi yumurtacı damızlıklara ait döller tavuk yumurtalarına hava kamarası yoluyla kuluçka başlangıcında 10 ng/yum, 100 ng/yum ve 1000 ng/yum dozlarında AFB₁ (çözücü %30'luk etanol) enjekte ederek, kuluçka sonunda sırasıyla %74.50, %98.03 ve %100 mortalite belirlemişler ve özellikle yüksek dozda ölümlerin erken embriyonik dönemde yoğunlaştığını gözlemişlerdir. Sur (2001) AFB₁'in etkileri ile ilgili çalışmasında kahverengi yumurtacı damızlıklara ait döller tavuk yumurtalarına aynı metotla 5 ng/yum, 10 ng/yum, 20 ng/yum ve 40 ng/yum dozlarında AFB₁ enjekte etmiş, kuluçka sonunda sırasıyla %41.66, %43.47, %80.43 ve %91.22 mortalite gözlemiş ve benzer şekilde en yüksek dozda ölümlerin erken embriyonik dönemde yoğunlaştığını bildirmiştir. Öznurlu (2003) ise aynı metotla kuluçka sonunda 5 ng/yum, 10 ng/yum ve 20 ng/yum AFB₁ dozlarında sırasıyla %23.65, %31.52 ve %65.21 mortalite belirlemiştir. Durmuş ve ark. (2005) yine aynı metotla metal alaşımların embriyotoksik etkilerini inceledikleri çalışmalarında, pozitif kontrol amacıyla 10 ng/yum, 100 ng/yum ve 1000 ng/yum dozlarında AFB₁ kullanmışlar ve kuluçkanın son gününde sırasıyla %27.02, %94.73 ve %100 mortalite tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ise kuluçka başlangıcı enjeksiyon yapılan denemede 40 ng/yum, kuluçkanın 8. gününde enjeksiyon yapılan denemede 80 ng/yum dozlarında AFB₁ pozitif kontrol amacıyla kullanılmıştır. AFB₁ için bu tür çalışmalarda embriyotoksisitesi düşük olduğu için en ideal çözücü %30'luk etanol olarak bildirilmiş (Prelusky ve ark. 1987, Çelik ve ark. 2000), bu çalışmada da %30'luk etanol kullanılmıştır. Pozitif kontrol grubu olarak oluşturduğumuz 40 ng/yum AFB₁ grubunda embriyonik dönemde kontrol grubundan önemli düzeyde yüksek mortalite gözlenmiştir. Çalışmasında kahverengi yumurtacı damızlıklara ait yumurtalar kullanan Sur (2001), bu çalışmada kuluçka başlangıcı enjeksiyonda kullanılan yöntemle 40 ng/yum AFB₁'i enjekte ederek kuluçka sonunda %91.22 mortalite belirlemişken, bu çalışmada total % 41.18'lik bir mortalite gözlenmiştir.

Aynı dozlarda ve aynı yöntemle mortalitenin daha düşük çıkması, bu çalışmada beyaz yumurtacı (*Bovans white*) damızlıklara ait yumurtaların kullanılmasına bağlı olabilir. Tavukçuluk sektöründe bu ırk özellikle dayanıklılığı ve yüksek verimi ile tanınmaktadır. Kuluçkanın 7. gününde 40 ng/yum AFB₁ grubunda embriyo ve nispi embriyo ağırlıkları kontrol grubundan önemli düzeyde düşükken, 14. günde kontrol grubundan fark göstermemiştir. Öznurlu (2003) ise aynı yöntemle gerçekleştirdiği çalışmasında 20 ng/yum ve 17.5 ng/yum gibi daha düşük dozdaki AFB₁ gruplarında kuluçkanın 5., 13., 15. ve diğer günlerinde nispi embriyo ağırlığının önemli düzeyde azaldığını belirlemiştir. Sonuçlarımızla benzerlikler olmakla birlikte farklılıklar yine kullanılan tavuk ırklarının aynı olmamasından kaynaklanabilir. 40 ng/yum AFB₁ grubundan elde edilen civciv çıkış ve 10. gün ağırlığı ile 10. gün karaciğer ağırlıklarına ait veriler kontrol grubundan önemli düzeyde azalma göstermiştir. Aynı metotla çalışan Aydın ve ark.'da (2005) benzer şekilde 10 ng/yum ve 7.5 ng/yum gibi daha düşük dozlardaki AFB₁ gruplarının civciv çıkış ve nispi civciv ağırlıklarında önemli düzeyde azalma belirlemişlerdir.

LD₅₀ bir deney hayvanı grubunun %50'sini öldürebilen bir kimyasal maddenin tek bir dozunun istatistiksel olarak değerlendirilmesidir. LD₅₀ tayininde Trevan yöntemi, Behrens Karber yöntemi, Miller Tainter yöntemi ve Litchfield Wilcoxon yöntemi gibi yöntemler uygulanmaktadır (Tuncer 2002). Bu çalışmada hem saf hem de ticari fipronille yapılan denemelerde %100'e yakın yüksek bir mortalite gözlenmediği için regresyon analizi tercih edilmiştir. Saf fipronilin LD₅₀ değeri ticari fipronilden çok daha düşük bulunmuş, diğer bir deyişle saf fipronil daha güçlü toksik etki göstermiştir. Bu durum fipronil aktif maddesi için en iyi çözücü olan asetonda çözdürülmesi ile ilişkili olabilir. Asetonda iyi çözünme toksik etkiyi artırmıştır. Ameenuddin ve Sunde (1984) tavuk embriyotoksitesite testlerinde kullanılacak olan çözücünün seçiminde, öncelikle test edilecek maddenin o çözücüde çok iyi çözünmesine, daha sonra çözücünün uygun seviyede toksitesiteye sahip olmasının önemine dikkat çekmişlerdir. Daha önce bahsedilen sebeplerle asetonun bu çalışmada uygun bir çözücü olduğu gözlenmiştir. Pestisit aktif maddeleri zirai mücadelede zararlılara karşı daha emniyetli, daha ekonomik, insan ve çevre sağlığı açısından daha az zararlı olacak şekilde bazı yardımcı maddeler (emülgatörler ve dolgu maddeleri gibi) ile karıştırılarak ticari formülasyon şeklinde kullanılır (SBYKP

2001). Fipronilin ticari formülasyonunda bulunan yardımcı maddeler ve ticari formülasyonun sulandırılarak kullanılması embriyotoksitesini etkilemiş olabilir. İnsektisit olarak kullanılan ticari formülasyonun daha düşük toksisiteye sahip olması hedef olmayan canlılara daha az zarar vereceği için arzu edilen bir durumdur. Benzer şekilde ticari formülasyonun sıçanlar üzerinde yapılan laboratuvar testlerinde çok az nörotoksik etkiye sahip olduğu, saf fipronilin ise çok daha kuvvetli nörotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Tingle ve ark. 2003).

LD₅₀ tayini yaptığımız denemelerde hem saf hem de ticari fipronil gruplarında anormal embriyolar gözlenmekle birlikte bunların oranları kontrol gruplarından istatistiksel olarak önemli düzeyde fark göstermemiştir. Bu durum kuluçka başlangıcında verilen hem saf hem de ticari fipronilin tavuklar üzerinde teratojenik bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir. Ayrıca LD₅₀ ve subletal dozlarda saf fipronille kuluçka başlangıcında enjeksiyon yapılarak gerçekleştirilen denemede fipronil gruplarında anormal embriyolar ve civcivler gözlenmekle birlikte bunların oranları da kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli düzeyde fark göstermemiştir. Bu denemede sadece 40.25 µg/yum fipronil grubunda total anormal embriyo ve civciv oranı kontrol grubundan önemli düzeyde yüksek bulunmuştur. Kuluçkanın 8. gününde enjeksiyon yapılarak gerçekleştirilen denemede de fipronil gruplarında anormal embriyolar ve civcivler gözlenmekle birlikte bunların oranları da kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli düzeyde fark göstermemiş, sadece 161 µg/yum fipronil grubunda total anormal embriyo ve civciv oranı kontrol grubundan önemli düzeyde yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar fipronil ve metabolitleri için teratojenik bir etkiye işaret etmekle birlikte, fipronil için teratojen sonucuna ulaşmaya yeterli görünmemektedir. Tüm bu veriler ışığında belli bir anormallik tipinde yoğunlaşma olmaması ve istatistiksel sonuçlar da dikkate alınarak fipronilin hem doğal halinin hem de metabolitlerinin tavuklarda teratojenik etkiye sahip olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Yüksek dozlardaki fipronille sıçanlarda yapılan üreme çalışmalarında da teratojenik etki gözlenmemiş, ancak gebelik sonu yavru boyutlarında ve vücut ağırlıklarında azalma ve fiziksel gelişmede gecikmelerin söz konusu olduğu bildirilmiştir (Hovda ve Hooser 2002, Tingle ve ark. 2003). Ticari fipronille dişi sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise hormon analiz sonuçları fipronilin normal endokrin sistem fonksiyonlarını bozduğunu göstermiş,

bununla birlikte gebelik sonu yavru sayısı ve yavru ağırlıklarının etkilenmediği sadece yüksek dozdaki fipronil grubunda gebelik indeksinin önemli düzeyde azaldığı bildirilmiştir (Ohi ve ark. 2004). LD₅₀ tayini yaptığımız denemelerde elde ettiğimiz sonuçlarla yukarıda bahsedilen literatürler arasında benzerlikler ve farklılıklar olmakla birlikte, saf ve ticari fipronilin tüm dozlarında embriyoların canlı ve nispi ağırlıkları ile CRL değerleri kontrol grubuna kıyasla önemli oranda azalmıştır. LD₅₀ ve subletal dozlarda saf fipronille hem kuluçka başlangıcında hem de kuluçkanın 8. gününde enjeksiyon yapılarak gerçekleştirilen denemelerde de fipronil gruplarında canlı ve nispi embriyo ağırlıkları, CRL değerleri ile karaciğer ağırlıklarında kontrol grubuna kıyasla azalmalar gözlenmiş ve bunların çoğunluğu istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmuştur. Ayrıca civciv çıkış ve civciv 10. gün ağırlıkları da önemli düzeyde azalmıştır. Ksenobiyotiklerle yapılan çalışmalarda deney hayvanlarının vücut ağırlığı, organ ağırlığı ve organ/vücut ağırlığı oranları toksisitenin değerlendirilmesinde önemli yer tutmaktadır. Bu sonuçlar ve ölüm oranları dikkate alındığında kullanılan bu dozlardaki fipronilin hem doğal halinin hem de metabolitlerinin tavuklarda önemli düzeyde embriyotoksik etkiye sahip olduğu görülmektedir.

Fipronilin embriyotoksik etkisine işaret eden bir diğer nokta LD₅₀ tayini yapılan denemelerdeki ölümlerin erken embriyonik dönemde yoğunlaşmasıdır. Saf fipronille gerçekleştirilen denemede dozlardaki artışa paralel olarak tüm dozlarda, ticari fipronille gerçekleştirilen denemede ise en yüksek dozda embriyo ölümleri özellikle HH skalasına göre ilk üç günde meydana gelmiştir. Bu durum, mitoz bölünme ve hücre farklılaşmasının son derece hızlı olduğu erken gelişme evrelerinde, embriyonun fiziksel ve kimyasal uyarılara karşı son derece duyarlı olmasıyla açıklanabilir. Kuluçkanın ilk üç gününde ortaya çıkan ve embriyonik gelişmeyi bozan etkiler, embriyonik ölümlere sebep olmaları yanında, önemli yapısal ve fonksiyonel bozukluklara da sebep olmaktadır (Kucera ve Burnand 1987). Daha geç dönemlerdeki ölümler ise albümine bağlanan fipronilin, albüminin embriyo tarafından kullanılması sonucu etkisini daha geç göstermesinden ileri gelebilir. LD₅₀ ve subletal dozlarda saf fipronille kuluçka başlangıcında gerçekleştirilen denemede de yüksek dozlarda ölümler erken embriyonik dönemde yoğunlaşmıştır. Kuluçkanın 8. gününde enjeksiyon yapılan denemede ise tüm fipronil gruplarında ölümler yoğun

bir şekilde HH skalasına göre 34. ve 35. evrede diğer bir deyişle enjeksiyondan kısa süre sonra gerçekleşmiştir. Bu durum fipronilin metabolitlerinin veya metabolitleri ile birlikte kendisinin çok kuvvetli embriyotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Kuluçkanın 8. gününde aynı dozlarda verilen fipronil kuluçka başlangıcında verilene göre yumurtadan çıkma oranını önemli düzeyde azaltmış, total mortaliteyi ise önemli oranda artırmıştır. Bu sonuçlar da fipronilin metabolitlerinin tavuk embriyoları için doğal halinden daha toksik olduğuna işaret etmektedir.

USEPA (1998) tarafından [phenyl(U)-¹⁴C]-fipronil kullanılarak yapılan kanatlı metabolizma çalışmasında fipronil yumurtacı tavuklara oral yolla 0.02 ppm, 2 ppm ve 10 ppm olmak üzere üç farklı dozda 28 gün boyunca uygulanmıştır. Tavuk dokularında ve yumurtalarında yapılan analizler sonucu rezidülerin özellikle yağ dokuda ve yumurtada yüksek olduğu belirlenmiştir. Dokulardaki ve yumurtalardaki rezidülerin içerisinde en yüksek oranda fipronilin metabolitlerinden MB46136 (fipronil-sulfone, fipronilin oksidasyon ürünü) bulunduğu tespit edilmiştir. Düşük oranda olmakla birlikte yumurta sarısında, deri, yağ ve karaciğer dokularında fipronile de rastlanmıştır. MB46136'nın kanatlılarda fipronilin doğal halinden çok daha fazla toksik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Akut toksisite testleri sonucu bu metabolitin tavuksu kuşlara çok yüksek düzeyde, su kuşlarına ise orta düzeyde toksik olduğu gösterilmiştir. MB46136 tatlı su omurgasızlarına ve tatlı su balıklarına karşı da fipronilden daha fazla toksik etkiye sahiptir (USEPA 1996a). Bu çalışmada yumurtalara kuluçkanın 8. gününde verilen fipronilin kuluçka başlangıcında verilenden çok daha yüksek embriyotoksik etki göstermesinin sebebi, verilen fipronilin kuluçkanın bugünlerinde karaciğerin fonksiyonel olgunlaşması ve geniş bir metabolik aktivite sahası bulunmasıyla bağlantılı olarak daha toksik MB46136 veya benzeri metabolitlerine dönüştürülmesi şeklinde açıklanabilir. Bununla birlikte fipronilin tavuk embriyolarındaki akıbeti ve metabolitleriyle ilgili biyokimyasal çalışmalara ihtiyaç vardır.

Canlı ve nispî embriyo ağırlıkları ile CRL değerlerindeki azalmalara paralel olarak, Alizarin Red-S ile yapılan iskelet boyamalarında, özellikle kuluçkanın 8. gününde enjekte edilen fipronil gruplarındaki embriyo örneklerinin hepsinde kemik

gelişiminde bariz bir gecikme gözlenmiştir. Bu durum fipronilin metabolitlerinin veya metabolitleriyle birlikte kendisinin iskelet gelişimini olumsuz yönde etkilediğine işaret etmektedir. Ancak ayrıntılı veri elde etmek için histolojik düzeyde histometrik çalışmalar yapılmalıdır.

Tavuk embriyoları ile yapılan bu tür embriyotoksisite çalışmalarında denemelerden önce fumigasyon yolu ile yumurtaların dezenfeksiyonu önemli bir basamaktır ve çoğunlukla 21 g potasyum permanganat+42 ml formaldehit/m³ buharıyla 20 dakika dezenfeksiyon tercih edilir. Hayretdağ (2004) çalışmasında bu doz ve süredeki fumigasyon uygulaması sonucu son dönem embriyolarında %5 anormallik belirlemiştir. Bu çalışmada fumigasyon aynı dozda fakat özellikle önceki tecrübelerimize dayanarak daha az süre yani 15 dakika olarak uygulanmıştır. Bu çalışmada hem kontrol hem de negatif kontrol gruplarında anormal embriyo gözlenmemesi sebebiyle, istatistiksel olarak önemli oranda olmasa da fipronil gruplarında ve pozitif kontrol gruplarında görülen embriyo anormalliklerinin fipronil, AFB₁ ve CP'den kaynaklandığını ve fumigasyonun olumsuz bir etkisi olmadığını düşünüyoruz. Fipronil gruplarında istatistiksel olarak önemsiz düzeyde görülen anormalliklerin sebebi, embriyoların bireysel duyarlılığı şeklinde açıklanabilir.

Proliferatif bir hücre popülasyonundaki MN'li hücre frekansının değerlendirilmesi yani MN testi, sayısal ve yapısal kromozom anormalliklerinin basit ve hızlı bir indirek ölçümünü sağlamaktadır ve memelilerde en çok kullanılan genotoksisite testlerinden biridir (Wolf ve Luepke 1997, Wolf ve ark. 2002). Bununla birlikte genotoksisite çalışmalarında kanatlı embriyolarının kullanıldığı çeşitli çalışmalar da mevcuttur. Todd ve Bloom (1980), Wilmer ve Bloom (1991), Arias (1996 ve 2003) kardeş kromatit değişimleri, Novotna ve Jelinek (1986 ve 1990) kromozom anormallikleri, Hamilton ve Bloom (1986) DNA hasarı, Tempel ve ark. (1992) ise primer hücre kültürlerinde programlı ve programsız DNA ve RNA sentezine ait çalışmalarında tavuk embriyolarını kullanmışlardır. MN testinde tavuk kanı kullanımına ait özellikle insektisitler ile yapılmış çalışmalar da mevcuttur. Bhunya ve Jena (1992) organik klorlu bir insektisit olan lindane'ın genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla 5-7 günlük civcivlere intraperitoneal ve oral yolla uygulamışlar, uygulamanın ardından belli süreler sonra kemik iliği hücrelerindeki

kromozom anormalliklerini ve MN frekanslarını ayrıca periferel kan alyuvarlarındaki MN frekanslarını belirlemişlerdir. Yaptıkları bu çalışma ile araştırcılar bu insektisit genotoksik olduğunu ve bu sistemin memeli sistemlerde gerçekleştirilen testlere alternatif olabileceğini bildirmişlerdir. Aynı araştırcılar başka bir çalışmalarında ise organik fosforlu insektisit monocrotophos'u aynı test yöntemiyle genotoksisite açısından incelemişler ve bu insektisit civciv kemik iliği hücrelerindeki kromozom anormalliklerini ve MN oranını ayrıca periferel kan alyuvarlarındaki MN oranını kontrol grubuna kıyasla artırdığını belirlemişlerdir (Bhunya ve Jena 1993). Giri ve ark. (2002b) organik fosforlu insektisit malathion'un genotoksik etkilerini belirlemek için benzer bir metot uygulamışlar ve malathion'un civciv kemik iliği hücrelerinde ve periferel kan hücrelerinde MN frekansını önemli düzeyde artırdığını belirlemişlerdir. Bu araştırcılar da civciv *in vivo* test sistemlerinin çevresel kirleticilerin olası genotoksik etkilerinin belirlenmesinde memeli test sistemlerine alternatif olabileceğini vurgulamışlardır. Wolf ve Leupke (1997) ise kuluçka işlemine tâbi tutulan döllü tavuk yumurtalarındaki embrioların periferel kan alyuvarlarındaki MN oluşumunu tanımlayarak, HET-MN olarak adlandırdıkları testi geliştirmişler ve daha sonra yaptıkları alışma (Wolf ve ark. 2002) ile bu testi modifiye etmişlerdir. Olduğca ucuz, basit ve hızlı bir genotoksisite testi olan bu yöntem, hayvan koruma hakları ve etik açıdan da uygun kabul edilmektedir. HET-MN'nin gerçekleştirildiği evrede beyin aktivitesi başlamazken, yüksek bir metabolik aktivitenin bulunması bu testi hayvan kullanılmayan diğer genotoksisite çalışmalarına da üstün kılmaktadır. Bununda ötesinde korioallantoik membranın sinirlerle temasının olmaması ve acı reseptörlerinden yoksun olması testin olumlu yanlarındandır. Yumurtadaki embriyo ortamının fizyolojik koşullara daha yakın olması bu testi *in vitro* testlere de üstün kılmaktadır. Tavuk embriyosunun dolaşımdaki alyuvar hücre kompozisyonunun ergin memelilerdeki kemik iliği hücre kompozisyonuna benzemesi, fare periferel kanında %5 oranında polikromatik alyuvar bulunurken 11 günlük tavuk embriyolarında bu oranın %25-50 olması, ayrıca çoğu memelide anormal alyuvarları elimine eden dalağın tavuk embriyosunda HET-MN'nin gerçekleştirildiği evrelerde tamamıyla gelişmemesi ve dolayısıyla MN'lerin dolaşımda yoğunlaşması bu yöntemin diğer önemli özellikleridir. Bu yöntemin

bilgisayarlı resim analiz sistemleriyle otomatikleştirilebileceği de belirtilmiştir (Wolf ve Leupke 1997, Wolf ve ark. 2002, Wolf ve ark. 2003).

Wolf ve ark. (2002) HET-MN'yi modifiye etmek için CP ve 7,12-dimethyl-benz[α]anthracene (DMBA) ile yaptıkları çok sayıdaki denemelerde, test edilecek solüsyonları kuluçkanın 8., 9. veya 10. günlerinde, birinci yöntemde yumurtanın sivri ucundan albümine hipodermik iğne ile enjekte etmişler, ikinci yöntemde ise hava kamarasını açarak kabuk altı zarı üzerine pipetle vermişlerdir. Uygulamaları takiben 24, 48 veya 72 saat daha kuluçka işleminden sonra embriyolardan (arteria umbilicalis sinistradan) kan örnekleri alarak, frotilerini hazırlayıp, modifiye May-Grünwald Giemsa yöntemiyle boyamışlar ve alyuvarlardaki MN oranlarını belirlemişlerdir. Hava kamarasına yapılan enjeksiyonlar sonucunda albümine yapılanlara kıyasla daha yüksek oranda MN gözlenmiştir. Ayrıca 8. günde yapılan enjeksiyondan sonraki 72. saatte alınan kan örneklerindeki MN oranının en yüksek düzeyde olduğu, diğer saatlerdeki oranların ise daha düşük olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar ışığında HET-MN için hava kamarası yöntemiyle, test solüsyonunun kuluçkanın 8. gününde enjekte edilerek 11. günde kan örneklerinin alınması optimum olarak kabul edilmiş (Wolf ve ark. 2002), fipronilin test edildiği bu çalışmada da aynı yöntem uygulanmıştır. Wolf ve ark. (2002) çalışmalarında ayrıca primitif alyuvarlarda (E I) kuluçkanın 6. ve 7. günleri arasında proliferasyon sona erdiği için kuluçkanın 8. günü enjeksiyon yapılan çalışmalarda bu hücrelerin mutajenik muameleden etkilenmediğini, MN oluşturamadığını ve MN oranı bakımından kontrol grubundan fark göstermediğini tespit etmişlerdir. Bu sonuçlara dayanarak MN'li E II (sekonder alyuvarlar) hücrelerinin tüm olgunlaşma evreleri (eritroblastlar, proeritroblastlar, erken-, orta- ve geç-polikromatik alyuvarlar ve olgun normokromatik alyuvarlar) dahil olmak üzere total frekansı HET-MN'de genotoksisitenin parametresi olarak kabul etmişlerdir. Fipronilin test edildiği bu çalışmada da sadece E II hücrelerindeki MN oranı belirlenmiştir. Bununla birlikte Wolf ve ark. (2002)'nin NA değerlendirilmesi için belirli bir alyuvar tipinden bahsetmemesi sebebiyle, ayrıca bu çalışmada primitif normokromatik alyuvarlarda da NA'lar gözlemlendiği için E II hücrelerinin yanı sıra primitif normokromatik alyuvarlardaki NA'lar da sayıma dahil edilmiştir. Kuluçkanın 11. gününde deney gruplarından alınan kan örneklerinden hazırlanan frotilerdeki alyuvar hücre kompozisyonuna ait genel gözlemlerimiz Wolf

ve Leupke (1997), Wolf ve ark. (2002) ve Wolf ve ark.'nın (2003) gözlemleri ile aynıdır.

Wolf ve ark. (2002) HET-MN'yi modifiye etmek için, white leghorn (strain Lohmann selected, LSL) damızlıklara ait her grupta 5-6 yumurta kullanarak ve kuluçkanın 8. günü enjeksiyon ve 11. günü kan örneği alarak yaptıkları çalışmalarında, 100 µl bidistile su içerisindeki 50 µg/yum CP dozunu üç denemede kullanmışlardır. E II hücrelerinde birinci denemede %13.2±4.9, ikinci denemede %7.3±4.0 ve üçüncü denemede %9.3±1.4 oranında MN gözlemişlerdir. Bu çalışmada önceden genotoksik etkisi bilenen ve pozitif kontrol amacıyla kullanılan 40 µl bidistile su içerisindeki 50 µg/yum CP grubunda E II hücrelerinde gözlediğimiz MN oranı kontrol ve negatif kontrol gruplarından önemli düzeyde yüksek olmakla birlikte, Wolf ve ark.'nın (2002) oranlarından daha düşüktür. Bunun sebebi kullanılan tavuk ırklarının ve enjeksiyon hacimlerinin farklı olmasına bağlanabilir. Yine pozitif kontrol amacıyla kullandığımız 250 µg/yum CP grubunda ise dozdaki artışa bağlı olarak 50 µg/yum CP grubundan yaklaşık 2.5 kat daha yüksek oranda MN gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada MN oranı yanı sıra NA oranları da belirlenmiş ve MN ile NA oranlarının toplamı da kontrol ve negatif kontrol gruplarından önemli düzeyde yüksek çıkmıştır. Dikkat çekici bir diğer nokta 250 µg/yum CP grubunda NA oranının çok yükselmesidir. Benzer şekilde Wolf ve Leupke (1997) yüksek dozlardaki CP ve Ifosphamide (IF) muamelesinden sonra çekirdek anormalliklerinin ve özellikle karyoreksis'in çok arttığını ve bunun muhtemel sebebinin bu maddelerin sitotoksik etkilerine bağlı hücre ölümlerinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Negatif kontrol grubunun kontrol grubundan MN, NA ve total anormallik oranı bakımından önemli fark göstermemesi, bu çalışmada fipronil için çözücü olarak kullanılan %70'lik asetonun önemli düzeyde olumsuz bir etki göstermediğine ve fipronilin olası genotoksik etkisini maskeleyemediğine işaret etmektedir. Hiçbir işlem uygulamadığımız kontrol grubunda düşük oranda olmakla birlikte doğal MN oluşumları ve NA gözlenmiştir. Muamele edilmeyen sıçanların polikromatik alyuvarlarında da %0-11 oranları arasında doğal MN frekansı belirlendiği, özellikle *in vitro* deneylerde doğal MN frekansının daha da yüksek olduğu bildirilmektedir (Müller ve Streffer 1994). Wolf ve Leupke (1997) aynı yöntemle gerçekleştirdikleri çalışmalarında, negatif kontrol grubu olarak

kullandıkları 150-200 µl su enjekte edilen yumurtalardan oluşan gruplarda alyuvarlarda total olarak (MN dahil) %0.0-0.3 oranları arasında anormallik belirlemişlerdir. Kontrol grubundaki total anormallik oranımız bu sınırlar arasındayken negatif kontrol grubumuzun oranı bunun biraz üzerindedir. Wolf ve ark. (2002) ve Wolf ve ark. (2003) ise 100 µl su enjekte edilen yumurtalardan oluşan negatif kontrol gruplarında E II hücrelerinde %0.4-1.3 oranları arasında MN gözlemişlerdir. Kontrol ve negatif kontrol grubundaki MN oranlarımız ise bu oranların oldukça altındadır.

Bu çalışmada kullandığımız üç farklı dozdaki fipronil gruplarının hepsinde E II hücrelerindeki MN oranı kontrol grubundaki doğal MN oranına kıyasla önemli düzeyde artarken, çözücü grubu olarak kullandığımız negatif kontrol (%70'lik aseton) grubuna kıyasla önemli artış göstermemiştir. Negatif kontrol MN oranında doğal MN oranına kıyasla bir artış görülmekle birlikte önemli düzeyde fark yoktur. Bu durum, çözücü olarak kullandığımız asetonun kontrol grubuna kıyasla MN oranında istatistiksel olarak önemli artışa sebep olmamasına rağmen, fipronil gruplarındaki yükselmeleri etkilediğine işaret etmektedir. Wolf ve Leupke (1997), Wolf ve ark. (2002) ve Wolf ve ark. (2003) HET-MN çalışmalarında test ettikleri maddelerden elde ettikleri sonuçları çözücü grubu ile karşılaştırmışlardır. Bu sebeplerle, fipronil gruplarının negatif kontrolle fark göstermemesi, ayrıca dozlardaki artışa rağmen fipronil grupları arasında MN oranı bakımından önemli fark olmaması ve fipronil gruplarının pozitif kontrol CP gruplarındaki gibi yüksek bir artış göstermemesi, fipronilin ve metabolitlerinin bu dozlarda ve bu şartlar altında genotoksik etkiye sahip olmadığına işaret etmektedir.

MN ve NA'yı ihtiva eden hücre oranı bakımından tüm fipronil grupları hem kontrol hem de negatif kontrolden fark göstermemektedir. NA ve total anormallik oranı bakımından ise sadece en düşük dozdaki fipronil grubu kontrol grubundan önemli düzeyde artış göstermiş, bunun dışında fipronil grupları hem kontrol hem de negatif kontrol grubundan fark göstermemiştir. MN oranı yanı sıra diğer bu veriler de fipronilin bu deney şartlarında genotoksik bir etkiye sahip olmadığına işaret etmektedir. Ancak daha yüksek ve daha düşük dozlardaki fipronille tavuk embriyolarında yapılacak MN çalışmaları ile sonuçların teyit edilmesi güvenilirliği

daha artıracaktır. MN testinden elde ettiğimiz sonuçlara paralel olarak, *Salmonella typhimurium*/memeli mikrozom ters gen mutasyon testi (S-9 aktivasyonlu ve aktivasyonsuz), *in vitro* insan lenfosit kültürü sitotoksisite çalışmaları, Çin hamster ileri gen mutasyon testi ve fare MN testi gibi çok sayıdaki genotoksisite/mutajenite çalışmalarında fipronilin negatif sonuçlar verdiği gözlenmiş ve bu veriler ışığında fipronilin mutajenik olmadığı ve kromozom anormalliklerine sebep olmadığı sonucuna ulaşıldığı bildirilmiştir (Tingle ve ark. 2003).

Mitotik figür oranı bakımından sadece en düşük dozdaki fipronil grubu bireysel farklılıklar sebebiyle kontrol ve negatif kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde artış göstermiş, diğer bir deyişle fipronil bu deney şartlarında tek bir dozda mitojenik etki sergilemiştir. Bununla birlikte bireysel farklılıklara dayanan bu veriye dayanarak fipronilin genel olarak mitojenik etkiye sahip olduğu sonucuna varılmamıştır.

Tavuklar (*Gallus gallus domesticus*) için normal alyuvar sayısı $2.5-3.5 \times 10^6/\mu\text{l}$ arasında, normal akyuvar sayısı $12-30 \times 10^3/\mu\text{l}$ arasında, normal lenfosit oranı ise %45-70 arasında kabul edilmektedir (Jain 1993). Bu çalışmada hiçbir işlem uygulanmayan kontrol grubuna ait 10 günlük civcivlerin kan örneklerindeki belirlediğimiz ortalama alyuvar ve akyuvar sayıları ile lenfosit oranları bu sınırlar arasındadır. Bununla birlikte akyuvar sayısındaki bireysel farklılıklar dikkat çekmiştir.

Kuluçka başlangıcında enjekte edilen en yüksek dozdaki fipronil grubundan elde edilen civcivlerin, negatif kontrol grubuna kıyasla alyuvar sayısındaki önemli düzeydeki düşüş, fipronilin alyuvar yapımında (eritropoiez) olumsuz etkisine işaret etmektedir. Kuluçkanın 8. gününde enjeksiyon yapılan denemeden elde edilen civcivlerin alyuvar sayıları arasında fark gözlenmemekle birlikte, fipronil açısından grup ve birey sayısının çok az olması yorum yapmak için yeterli görünmemektedir.

T-lenfosit olgunlaşması sırasında kazanılan enzimlerden biri olan ANAE insan, köpek, sığır ve farelerde olduğu gibi tavuklarda da T-lenfositleri için spesifik bir enzim olduğundan, ışık mikroskopik seviyede hem kan frotilerinde ve hem de doku kesitlerinde T- ve B- lenfositlerin ayırımında kullanılmaktadır. ANAE tavuklarda embriyonik gelişmenin son günlerinde, yaklaşık 18. günde ortaya çıkan bir enzimdir

(Basso ve ark. 1980, Pruthi ve ark. 1987, Maiti ve ark. 1990, Sur 2001). Sur (2001) kahverengi yumurtacı tavuk embriyolarının periferal kanında kuluçkanın 18. gününde %2.00, kuluçkadan çıkışın ilk gününde %37.18 ve kuluçkadan çıkışı takip eden 4. hafta sonunda %55.67 oranında ANAE(+) lenfosit tespit etmiştir. Aynı çalışmada periferal kandaki lenfosit oranları da kuluçkadan çıkışın ilk gününde %16.33 ve kuluçkadan çıkışı takip eden 4. hafta sonunda %50.01 olarak belirlenmiştir. Sur (2001) çalışmasında ayrıca 5 ng/yum ve 10 ng/yum AFB₁ gruplarında kuluçkadan çıkışın ilk gününde periferal kandaki lenfosit oranının ve ANAE(+) lenfosit oranının kontrol ve negatif kontrol gruplarına kıyasla önemli düzeyde azaldığını, kuluçkadan çıkışın 4. haftasında aldığı kan örneklerinde ise önemli fark olmadığını belirlemiştir. Bu çalışmada ise pozitif kontrol amacıyla kuluçka başlangıcında 40 ng/yum AFB₁ enjekte ettiğimiz ve çıkışın 10. gününde kan örneği aldığımız grupta lenfosit oranında önemli düzeyde azalma gözlenmezken, ANAE(+) lenfosit oranında önemli düzeyde azalma belirlenmiştir. Kuluçkanın 8. günü 80 ng/yum AFB₁ enjekte ettiğimiz ve çıkışın 10. gününde kan örneği aldığımız grupta ise hem lenfosit hem de ANAE(+) lenfosit oranında önemli düzeyde azalma belirlenmiştir.

Kuluçka başlangıcında enjeksiyon yapılan denemeden elde edilen 10 günlük civcivlerin periferal kanına bakıldığında, fipronil gruplarından ikisinde akyuvar sayısında, fipronil gruplarından birisinde lenfosit oranında ve özellikle tüm fipronil gruplarında ANAE(+) lenfosit (T-lenfosit) oranında hem kontrol hem de negatif kontrol gruplarına kıyasla önemli düzeyde düşüş gerçekleşmesi, kuluçka başlangıcında enjekte edilen fipronilin diğer bir deyişle metabolize olmamış fipronilin kuluçka sonu erken dönem civcivlerinde hücrel immünite üzerinde süpresyona sebep olduğuna işaret etmektedir. Bununla birlikte dozlar arasındaki farkların önemli olmaması sebebiyle daha geniş doz aralıklarında yapılacak çalışmalara, ayrıca periferal kandaki ANAE pozitifitesinin belirlenmesinin yanı sıra timus ve bursa Fabricii gibi primer lenfoid organlar ile dalak gibi sekonder lenfoid organlarda bu ve benzeri enzimlerin lokalizasyonlarının belirlendiği çalışmalara ihtiyaç vardır. Sur (2001) ANAE, asit fosfatase ve beta glukuronidase gibi enzimlerin embriyonik dönemin hangi evresinde kazanıldığı ve kuluçkadan çıkışı takip eden erken dönemlerde periferal kandaki bu enzimler için pozitif reaksiyon veren lenfosit

oranları ile bu hücrelerin lenfoid organlardaki lokalizasyonlarının bilinmesinin önemini vurgulamıştır. Çünkü lenfoid organların gelişimini olumsuz yönde etkileyecek olan faktörler bu enzimlerin ortaya çıkışında aksamalara sebep olacaktır. Lenfositlerin enzimatik pozitivite oranları ile lenfoid dokulardaki lokalizasyonlarının bilinmesi, toksik maddelerin hem embriyonik hem de kuluçkadan çıkışı takip eden dönemlerde sebep olacakları zararlı etkilerinin, olası etki mekanizmaları ile sonuçlarının ortaya çıkarılmasında ipuçları sağlamaktadır.

Kuluçkanın 8. gününde enjeksiyon yapılan denemede yüksek mortalite sebebiyle fipronil gruplarından yeterli çıkış elde edilememiş, sadece 40.25 µg/yum fipronil grubundan elde edilen 3 civcivin periferal kanı değerlendirilebilmiştir. Bu dozda lenfosit oranı kontrol ve negatif kontrole kıyasla önemli düzeyde azalma gösterirken, ANAE(+) lenfosit (T-lenfosit) oranı kontrol grubuna kıyasla önemli düzeyde azalma göstermiş, negatif kontrol grubu ile fark göstermemiştir. Grup ve birey sayısının az olması sebebiyle veriler yetersiz görülmüş, kuluçkanın 8. gününde enjekte edilen fipronilin ve dolayısıyla metabolitlerinin hücrel immünite üzerindeki etkilerine ait kesin bir yargıya varılamamıştır. Fipronilin ve metabolitlerinin immün sistem üzerindeki etkilerine ait herhangi bir literatür bilgisine ise rastlanmamıştır.

Fipronilin yanı sıra fenil pirazol grubuna dahil olan diğer insektisitler acetoprole, ethiprole, tebufenpyrad, tolfenpyrad ve vaniliprole'dur. Fipronilden elde ettiğimiz sonuçları nispeten daha yeni olan bu ilaçlar ile kıyaslayabilecek literatür bilgisi azdır. Fipronilden elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde, tebufenpyrad ve tolfenpyrad ile sığınlarda yapılan üreme çalışmalarında herhangi bir teratojenik etki gözlenmediği, ayrıca MN testi dahil *in vitro* ve *in vivo test* sistemleriyle yapılan çeşitli genotoksisite çalışmalarında da negatif sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (USEPA 2002, FSC 2004).

Sonuç olarak dömlü tavuk yumurtalarının kullanıldığı bu çalışmada;

- Kuluçka başlangıcında yumurtalara verilen saf fipronilin LD₅₀ değeri 161 µg/yum olarak, ticari fipronilin ise 383 µg/yum olarak hesaplanmış ve ticari fipronilin daha zayıf embriyotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

- Hem kuluçka başlangıcında hem de kuluçkanın 8. gününde yumurtalara verilen fipronil istatistiksel olarak önemli düzeyde teratojenik etki göstermezken, kuvvetli embriyotoksik etki göstermiştir.

- Kuluçkanın 8. günü yumurtaya verilen saf fipronilin, aynı dozda kuluçka başlangıcında verilene kıyasla daha kuvvetli toksik etki göstermesi, fipronilin metabolitlerinin tavuk embriyoları için daha toksik olduğuna işaret etmektedir.

- Özellikle kuluçkanın 8. gününde enjekte edilen saf fipronil kuluçkanın 11. gününde embriyoların iskelet gelişiminde gecikmelere sebep olmuştur.

- HET-MN sonuçları kullanılan dozlarda fipronilin ve metabolitlerinin genotoksik etkiye sahip olmadığına işaret etmektedir.

- Kuluçka başlangıcında yumurtalara LD₅₀ ve subletal dozlarda verilen saf fipronilin kuluçka sonu erken dönem civcivlerinin hücresel immünitesi üzerinde olumsuz etkisi belirlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

- ACP. 1999. Evaluation of fipronil use as a public hygiene insecticide. Advisory Committee on Pesticides. Food and Environment Protection Act 1985, part III. Control of Pesticides Regulations 1986. No. 187. Issue No. 52. Pesticides Safety Directorate, MAFF, York, UK.
- Ahmed, A.A., Soliman, M.M., Khelifa, B.A.A., El-Sadek, S.E. and Nounou, A.H. 1988. Embryocidal and teratogenic effects of paraquat on chick embryos and white rats. Arch. Exper. Vet. Med. Leipzig. 42: 848-853.
- Ameenuddin, S. and Sunde, M.L. 1984. Sensitivity of chick embryo to various solvents used in egg injection studies. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 175: 176-178.
- Anwar, K. 2003. Cypermethrin, a pyrethroid insecticide induces teratological and biochemical changes in young chick embryos. Pakistan J. Biol. Sci. 6 (19): 1698-1705.
- Arias, E. 1996. Effects of the phenoxyherbicide MCPA on SCE frequency and cell kinetics in developing chick embryos. Ecotox. Environ. Safe. 33: 25-29.
- Arias, E. 2003. Sister chromatid exchange induction by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in chick embryos. Ecotox. Environ. Safe. 55: 338-343.
- ATSDR. 1994. Toxicological profile for acetone. Atlanta, Georgia, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp21-p.pdf>
- Aydın, M.F., Çelik, İ., Sur, E., Özparlak, H. ve Telatar, T. 2005. Yumurtaya verilen Aflatoksin B₁'in civciv çıkış ağırlığı üzerindeki etkileri. Vet. Bil. Derg. 21 (1-2): 85-89.
- Aydınoğlu, H., Dursun, H.Y. ve Bayraktar, L. 2002. Bitki Koruma Ürünleri. T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü Yayınları, Ankara.

- Basso, G., Cocito, M.G., Semenzato, G., Pezzutto, A. and Zanesco, L. 1980. Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes. *Brit. J. Haematol.* 44: 577-582.
- Becker, S.R.B. and Shibley, I.A. 1998. Teratogenicity of ethanol in different chicken strains. *Alcohol Alcoholism* 33 (5): 457-464.
- Bhunya, S.P. and Jena, G.B. 1992. Genotoxic potential of the organochlorine insecticide lindane (γ -BHC): An *in vivo* study in chicks. *Mutat. Res.* 272: 175-181.
- Bhunya, S.P. and Jena, G.B. 1993. Studies on the genotoxicity of monocrotophos, an organophosphate insecticide, in the chick *in vivo* test system. *Mutat. Res.* 292: 231-239.
- Bonassi, S., Fenech, M., Cecilia, L., Lin, Y-P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T-K., Migliore, L., Miklavich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Müller, W-U., Odagiri, Y., Scarfi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. 2001. HUMAN MicroNucleus Project: International database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ. Mol. Mutagen.* 37: 31-45.
- Brown, L.P., Flint, O.P., Orton, T.C. and Gibson, G.G. 1986. Chemical teratogenesis: Testing methods and the role of metabolism. *Drug Metab. Rev.* 17 (3-4): 221-260.
- Bruel, M.T. and David, D. 1980. Effects of an organophosphorous pesticide, dichlorvos, on germ cells of the undifferentiated gonads of young quail embryos. *Com. Ren. Des Sean. Soc. Biol. Ses Fil.* 174 (2): 163-169.
- Bruns, G.A.P. and Ingram, V.M. 1973. The erythroid cells and haemoglobins of the chick embryo. *Philos. Trans. R. Soc.* 266: 225-305.
- 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.

- Bryan, T.E., Gildersleeve, R.P. and Wiard, R.P. 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.
- Budai, P., Fejes, S., Varnagy, L., Somlyay, I.M. 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.
- Campana, M.A., Panzeri, A.M., Moreno, V.J. and Dulout, F.N. 1999. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.* 438: 155-161.
- Campbell, T.W. 1995. *Avian Hematology and Cytology*. 2nd edition, Iowa State Press.
- Casida, J.E. and Quistad, G.B. 2004. Why insecticides are more toxic to insects than people: The unique toxicology of insects. *J. Pestic. Sci.* 29: 81-86.
- Chibber, G. and Gilani, S.H. 1986. Acrolein and embryogenesis: An experimental study. *Environ. Res.* 39: 44-49.
- Cicchetti, R., Bari, M. and Argentin, G. 1999. Induction of micronuclei in bone marrow by two pesticides and their differentiation with CREST staining: An *in vivo* study in mice. *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.* 439: 239-248.
- Cilievisci, 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.
- Conover, W.J. 1980. *Practical Nonparametric Statistics*. 2nd edition, John Wiley&Sons, New York.

- Countryman, R.I. and Heedle, J.A. 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.* 41: 321-332.
- Çavaş, T. and Ergene-Gözükara, S. 2003a. Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.* 534: 93-99.
- Çavaş, T. and Ergene-Gözükara, S. 2003b. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.* 538: 81-91.
- Çelik, İ., Aştı, R.N. ve Ergene, N. 1991. İnsan perifer kanındaki B, T ve Null lenfositlerinin esteraz sitokimyası ve yüzey immüno globülinlerinin immünoenzimatik yöntemle boyanarak belirlenmesi. *S.Ü. Tıp Fak. Derg.* 7 (4): 497-503.
- Çelik, İ., Aştı, R.N. ve Boyraz, M.Ü. 1992. Sığır fetal perifer kan lenfositlerinin alfa-naftil asetat esteraz aktivitesi üzerinde ışık mikroskopik çalışmalar. *S.Ü. Vet. Fak. Derg.* 8 (2): 41-44.
- Çelik, İ., Oğuz, H., Demet, Ö., Boydak, M., Dönmez, H.H., Sur, E. and Nizamlioğlu, F. 2000. Emryotoxicity assay of aflatoxin produced by *Aspergillus parasiticus* Nrrl 2999. *Brit. Poult. Sci.* 41 (4): 401-409.
- Çelik, A., Mazmanci, B., Çamlıca, Y., Aşkin, A. and Çömelekoğlu, Ü. 2003. Cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on Wistar rat bone marrow. *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.* 539: 91-97.
- David, D. 1982. Influence of technical and commercial decamethrin, a new synthetic pyrethroid, on the gonadic germ population in quail embryos. *Arch. d'Anat. d'Hist. d'Embryol. Norm. Exp.* 65: 99-110.
- Davies, W.J. and Freeman, S.J. 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.

- Deli, E., Somlaly, I. and Varnagy, L. 1985. Biochemical study of muscle samples from chicken embryos affected by Wofatox 50 EC. Arch. Toxicol. Suppl. 8: 277-279.
- Deli, E. and Kiss, Z. 1988. Effect of parathion and methylparathion on protein content of chicken embryo muscle *in vivo*. Biochem. Pharm. 37 (17): 3251-3256.
- Dunachie, J.F. and Fletcher, W.W. 1969. An investigation of the toxicity of insecticides to birds' eggs using the egg-injection technique. Ann. Appl. Biol. 64: 409-423.
- Durmus, E., Inan, O., Çelik, I., Sur, E., Özkan, Y., Acar, A. and Aydın, M.F. 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.
- Dusek, Z., Holejsovska, I., Novotna, B. and Zemanova, Z. 2001. Embryotoxicity of 1,2-dibromoethane in chick embryos *in ovo*: Early and late effects. Eur. J. Morphol. 39 (2): 105-112.
- Dusek, Z., Novotna, B., Vodickova, L., Naprstkova, I., Dostal, M. and Vilhelmova, M. 2003. Effects of 1,2-dibromoethane on haematopoiesis in the chick embryo. Xenobiotica 33 (4): 443-458.
- Ecobichon, D.J. 1996. Toxic effects of pesticides. In: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. Klaassen, C.D. (ed), 5th edition, McGraw-Hill, New York, pp. 643-689.
- Elavarasi, D., Ramakrishnan, V., Subramemam, R.H, Cherian, K.M. and Emanuel, C. 2002. Chemotoxicity study in lymphocytes of markers in wooden furniture industry. Curr. Sci. India 82 (7): 868-873.
- 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.
- El-Sayyad, H.I., El-Gammal, S.A. and Kariem, S.A. 1996. Some aspects of growth deformities of chick embryos induced by flufenoxuron. J. Union. Arab. Biol. 5 (A): 313-329.

- Etches, R. 1996. *Reproduction in Poultry*. CAB International, Cambridge.
- Farage-Elawar, M. and Francis, B.M. 1988. Effects of fenthion, fenitrothion and desbromoleptophos on gait, acetylcholinesterase, and neurotoxic esterase in young chicks after *in ovo* exposure. *Toxicology* 49: 253-261.
- Farage-Elawar, M. and Blaker, W.D. 1992. Chick embryo exposure to carbamates alters neurochemical parameters and behavior. *J. Appl. Toxicol.* 12 (6): 421-426.
- 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.
- Fenech, M., Crott, J., Turner, J. and Brown, S. 1999. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: Description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis* 14 (6): 605-612.
- Fenech, M. 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.* 435: 81-95.
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. 2003. Human Micronucleus Project. HUMN Project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.* 534: 65-75.
- Fischer, L.D. and Van Belle, G. 1993. *Biostatistics: A Methodology for The Health Sciences*. John Wiley&Sons, New York.
- Fox, L.L. and Grasman, K.A. 1999. Effects of PCB 126 on primary immune organ development in chicken embryos. *J. Toxicol. Environ. Health A* 58: 233-244.
- FSC. 2004. Tolfenpyrad. Evaluation report. Food Safety Commission, Pesticides Expert Committee, Japan. http://www.fsc.go.jp/english/pesticides/evaluation_report_tolfenpyrad.pdf

- Garrison, J.C. and Wytttenbach, C.R. 1985. Notochordal Development as influenced by the insecticide dicrotophos (Bidrin). J. Exp. Zool. 234: 243-250.
- Gebel, T., Kevekordes, S., Pav, K., Edenharder, R. and Dunkelberg, H. 1997. *In vivo* genotoxicity of selected herbicides in the mouse bone-marrow micronucleus test. Arch. Toxicol. 71: 193-197.
- Gilani, S.H. and Alibhai, Y. 1990. Teratogenicity of metals to chick embryos. J. Toxicol. Environ. Health 30 (1): 23-31.
- Giri, S., Giri, A., Sharma, G.D. and Prasad, S.B. 2002a. Mutagenic effects of carbosulfan, a carbamate pesticide. Mutat. Res.-Gen. Tox. En. 519: 75-82.
- Giri, S., Sharma, G.D., Giri, A. and Prasad, S.B. 2002b. Genotoxic effects of malathion in chick *in vivo* micronucleus assay. Cytologia 67: 53-59.
- GPT. 2006. Micronucleus assay. GenPharmTox. http://www.genpharmtox.com/services/Toxicology/micro_advanced_test.html
- Grisolia, C.K. 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. Mutat. Res.-Gen. Tox. En. 518: 145-150.
- Grisolia, C.K. and Cordeino, C.M.T. 2000. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. Genet. Mol. Biol. 23: 1235-239.
- Güven, G.S. 2005. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. I. Tıbbi Biyolojik Bilimler Kongresi. 04-07 Ocak 2005. İstanbul.
- Hamburger, V. and Hamilton, H.L. 1951. A series of normal stages in the development of chick embryo. J. Morphol. 88: 49-92.
- Hamilton, H.L. 1952. Lillie's Development of Chick. Henry Holt and Company, New York.
- Hamilton, J.V., Denison, M.S. and Bloom, S.E. 1983. Development of basal and induced aryl hydrocarbon (benzo(a)pyrene) hydroxylase activity in the chick embryo *in ovo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3372-3376.

- Hamilton, J.W. and Bloom, S.E. 1986. Correlation between induction of xenobiotic metabolism and DNA damage from chemical carcinogens in the chick embryo. *Carcinogenesis* 7: 1101-1106.
- Hamon, N.M., Gamboa, H. and Garcia, J.E.M. 1996. Fipronil: A major advance for the control of boll weevil in Columbia. In: Herzog, G.A. Hardee, D.A. (chairs), Ottens, R.J., Ireland, C.S., Nelms, J.V. (eds.). *Proceedings, Beltwide Cotton Conferences USA, Vol. 2, Jan. 9-12 1996, Nashville, T.N. Cotton Insect Research and Control Conference. N.C.C., Memphis, TN, pp. 990-994.*
- Harold, T.T., Bruyere, J., Steve, J., Kargas, A., Nishikawa, T., Takagi, Y. and Gilbert, E.F. 1987. Alcohol induces cardiovascular malformations in the chick embryo. *Teratology* 35: 95-103.
- Hashizume, R., Noda, A., Itoh, M., Yamamoto, Y., Masui, S., Oka, M. and Nakamura, T. 1992. Studies on teratological testing using chicken embryos-effects of solvents, injection sites and the age of the embryo. *Jikken Dobutsu* 41 (3): 349-356.
- Hayretdağ, S. 2004. Kuluçkalık yumurtalara inkübasyon öncesi formaldehit fumigasyonunun gelişen embriyolardaki teratojenik etkilerinin araştırılması. H.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- Heinrich-Hirsch, B. and Neubert, D. 1991. Effect of Aciclovir on the development of the chick embryo *in ovo*. *Arch. Toxicol.* 65: 402-408.
- Henry, M.H and Wyatt, R.D. 2001. The toxicity of fumonisin B₁, B₂ and B₃, individually and in combination, in chicken embryos. *Poultry Sci.* 80 (4): 401-407.
- Higgy, K.E., Burns, G.F. and Hayhoe, F.G.J. 1977. Discrimination of B, T and Null lymphocytes by esterase cytochemistry. *Scand. J. Haematol.* 18: 437-448.
- Hovda, L.R. and Hooser, S.B. 2002. Toxicology of newer pesticides for use in dogs and cats. *Vet. Clin. Small Anim.* 32: 455-467.
- Ishaaya, I. 1998. Insecticides with novel modes of action: An overview. In: *Insecticides with Novel Modes of Action Mechanisms and Application.* Degheele, D. (ed.), Springer-Verlag Berlin, pp. 1-24.

- Ishaaya, I. 2001. Biochemical processes related to insecticide action: An overview. In: Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance. Ishaaya, I. (ed.) Springer-Verlag Berlin, pp. 1-16.
- Jain, N.C. 1993. Essentials of Veterinary Hematology. Lea&Febiger.
- 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, Stuttgart, 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.
- Johnson, E.M. 1986. False positives false negatives in developmental toxicology and teratology. Teratology 34: 361-362.
- Julian, D. and Abbott, U.K. 1998. An avian model for comparative studies of insulin teratogenicity. Anat. Histol. Embryol. 27 (5): 313-321.
- Kajikawa, O., Koyama, H., Yashikawa, T., Tsubaki, S. and Saito, H. 1983. Use of alpha-naphthyl acetate acid esterase staining to identify T lymphocytes in cattle. Am. J. Vet. Res. 44 (8): 1549-1552.
- Karabay, N.Ü. 2000. Bazı sinerjistik etkili insektisitlerin memeli sistemleri üzerinde toksik etkilerinin araştırılması. E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir.
- Kaya, S., Alabay, B., Baydan, E. ve Altunay, H. 1995. Ağır metallerin tavuk embriyolarında teratojenik etkileri: Arsenik, ve kurşun ayrı ayrı ve birlikte kullanılmasının etkileri. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 42: 225-233.
- Kemper, F.H. and Luepke, N.P. 1986. Toxicity testing by the hen's egg test (HET). Food Chem. Toxicol. 24 (6/7): 647-648.

- Kirsch-Volders, M. and Fenech, M. 2001. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis* 16 (1): 51-58.
- Kligerman, A.D., Doerr, C.L., Tennant, A.H. and Peng, B. 2000. Cytogenetic studies of three triazine herbicides II. *In vivo* micronucleus studies in mouse bone marrow. *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.* 471: 107-112.
- Knowles, D.M. and Holck, S. 1978. Tissue localization of T-lymphocytes by the histochemical demonstration of acid α -naphthyl acetate esterase. *Lab. Invest.* 39 (1): 70-76.
- Knowles, D.M., Hoffman, H.T., Ferrarini, M. and Kunkel, H.G. 1978. The demonstration of acid α -naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes: Usefulness as a T-cell marker. *Cell Immunol.* 35: 112-123.
- Knowles, D.M. and Halper, J.P. 1980. Human medullary and cortical thymocytes are distinguishable according to the presence or absence of cytochemically demonstrable acid α -naphthyl acetate esterase (ANAE) activity. *J. Immunol.* 125 (6): 2823-2825.
- Konuk, T. 1981. *Pratik Fizyoloji*. A.Ü. Vet. Fak. Yayınları, 378, A.Ü. Basımevi, Ankara.
- 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 Vainio, H. 1983. Embryotoxicity of industrial chemicals on the chicken embryo: Dithiocarbamates. *Teratogen. Carcin. Mut.* 3 (2): 163-175.
- Krasavage, W.J., O'Donoghue, J.L. and Divencenzo, G.D. 1982. Ketone. In: *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*. Clayton, G.D. and Clayton, F.E. (eds.), Vol. 2C, 3rd edition, New York, NY: John Wiley and Sons, pp. 4709-4800.
- Kucera, P. and Burnand, M.B. 1987. Routine teratogenicity test that uses chick embryos *in vitro*. *Teratogen. Carcin. Mut.* 7: 427-447.

- Kumar, K.B. and Devi, K.S. 1992. Teratogenic effects of methyl parathion in developing chick embryos. *Vet. Hum. Toxicol.* 34 (5): 408-410.
- Kury, B.G. and Craig, J.M. 1967. The effects of Mitomycin C on developing chick embryos. *J. Embryol. Exper. Morph.* 17 (1): 229-237.
- Lenselink, D.R., Midtling, J.E. and Kolesari, G.L. 1993. Teratogenesis associated with oxydemeton-methyl in the stage 12 chick embryo. *Teratology* 48: 207-211.
- Lesser, J., Blodgett, D. and Ehrich, M. 2000. Comparison of oxime-initiated reactivation of organophosphorous-inhibited acetylcholinesterase in brains of avian embryos. *J. Toxicol. Environ. Health A* 59: 57-66.
- Li, C.Y., Yam, L.T. and Crosby, W.H. 1972. Histochemical characterization of cellular and structural elements of human spleen. *J. Histochem. Cytochem.* 20 (12): 1049-1058.
- Lucas, A.M. and Jamroz, C. 1961. *Atlas of Avian Hematology*. Agriculture Monograph 25, United States Department of Agriculture, U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- Lucero, L., Pastor, S., Suarez, S., Durban, R., Gomez, C., Parron, T., Creus, A. and Marcos, R. 2000. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: Micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.* 464: 255-262.
- Luepke, N.P. 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 fungicide maneb on chick embryos. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 13: 169-173.
- Maiti, N.K., Saini, S.S. and Sharma, S.N. 1990. Histochemical studies on chicken peripheral blood lymphocytes. *Vet. Res. Commun.* 14: 207-210.
- 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.

- Mauldin, J.M. 1993. Quality control procedures for the hatchery. *Poult. Sci.* 93 (1): 1-24.
- Meiniel, R., Lavergne, J. and Autissier-Navarro, C. 1979. Teratogenic effect of dicotophos on the embryonic chick tibia; histological and cytological studies. *Toxicol. Eur. Res.* 2 (3): 133-140.
- Meneely, G.A. and Wyttenbach, C.R. 1989. Effects of the organophosphate insecticides diazinon and parathion on bobwhite quail embryos: Skeletal defects and acetylcholinesterase activity. *J. Exp. Zool.* 252: 60-70.
- Misawa, M., Doull, J. and Uyeki, E.M. 1982. Teratogenic effects of cholinergic insecticides in chick embryos. III. Development of cartilage and bone. *J. Toxicol. Environ. Health* 10 (4-5): 551-563.
- Mueller, J., Brundel G., Buerki, H., Keller, H.U., Hess, M.W. and Cottier, H. 1975. Nonspecific acid esterase activity: A criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Eur. J. Immunol.* 5: 270-274.
- Müller, W.-U. and Streffer, C. 1994. Micronucleus assays. In: *Advances in Mutagenesis Research*. Obe, G. (ed.), Vol 5, Springer-Verlag, pp. 1-134.
- Neldon-Ortiz, D.L. and Qureshi, M.A. 1992. Effects of AFB₁ embryonic exposure on chicken mononuclear phagocytic cell functions. *Dev. Comp. Immunol.* 16 (2/3): 187-196.
- Neumann, N.J., Hölzle, E., Lehmann, P., Rosenbruch, M., Klauic, 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.
- Novotna, B. and Jelinek, R. 1986. A comparison of mutagenic and embryotoxic effects of cyclophosphamide on the chick embryo. *Environ. Mutagen.* 8: 241-252.

- Novotna, B. and Jelinek, R. 1990. Mutagenic and teratogenic effects of cyclophosphamide on the chick embryo. *Teratogen. Carcin. Mut.* 10: 341-350.
- Ohi, M., Dalsenter, P.R., Andrade, A.J.M. and Nascimento, A.J. 2004. Reproductive adverse effects of fipronil in Wistar rats. *Toxicol. Lett.* 146: 121-127.
- Özcan, M. 1992. Hidrokinon'un gelişim toksisitesinin döllenen tavuk embriyosunda analiz ve değerlendirilmesi. G. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Öznurlu, Y. 2003. Yumurtaya verilen Aflatoksin B1'in, etçi piliçlerin kemik dokularının embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi. S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya.
- Öztürk, S. 1997. Tarım İlaçları. Ak Basımevi, İstanbul.
- Pangalis, G.A., Waldman, S.R. and Rappaport, H. 1978. Cytochemical findings in human nonneoplastic blood and tonsillar B and T lymphocytes. *Am. J. Clin. Pathol.* 69: 314-318.
- Pastor, S., Gutierrez, S., Creus, A., Cebulska-Wasilewska, A. and Marcos, R. 2001. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.* 495: 147-156.
- Patten, B.M. 1971. *Early Embryology of the Chick.* McGraw-Hill Book Company.
- Paul, B.S. and Vadlamudi, V.P. 1976. Teratogenic studies of fenitrothion on white leghorn chick embryos. *Bull. Env. Cont. Toxicol.* 15 (2): 223-229.
- Peterka, M., Jelinek, R. and Pavlik, A. 1992. Embryotoxicity of 25 psychotropic drugs: A study using CHEST. *Reprod. Toxicol.* 6: 367-364.
- Pinkus, G.S., Hargreaves, H.K., McLeod, J.A., Madler, L.M., Rosenthal, D.S. and Said, J.V. 1979. α -naphthyl acetate esterase activity. A cytochemical marker for T-lymphocytes. *Am. J. Pathol.* 97:17-42.
- Powell, D.C., Aulerich, R.J., Meadows, J.C., Tillitt, D.E., Giesy, J.P., Stromberg, K.L. and Bursian, S.J. 1996. Effects of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) injected into the yolks of

chicken (*Gallus domesticus*) eggs prior to incubation. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31 (3): 404-409.

Powell, D.C., Aulerich, R.J., Meadows, J.C., Tillitt, D.E., Stromborg, K.L., Kubiak, T.J., Giesy, J.P. and Bursian, S.J. 1997. Organochlorine contaminants in double-crested cormorants from Green Bay, Wisconsin: II. Effects of an extract derived from cormorant eggs on the chicken embryo. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 32: 316-322.

Prelusky, D.B., Hamilton, R.M.G., Foster, B.C., Trenholm, H.L. and Thompson, B.K. 1987. Optimization of chick embryotoxicity bioassay for testing toxicity potential of fungal metabolites. J. Assoc. Anal. Chem. 70 (6): 1049-1055.

Pruthi, A.K., Gupta, R.K.P. and Sadana, J.R. 1987. Acid alpha naphthyl acetate esterase activity in peripheral blood lymphocytes and monocytes of chickens. J. Vet. Med. A. 34: 390-392.

Ramos, J.A., Ramis, A.J., Marco, A., Domingo, M., Rabanal, R. and Ferrer, L. 1992. Histochemical and immunohistochemical study of the mucosal lymphoid system in swine. Am. J. Vet. Res. 53 (8): 1418-1426.

Ranki, A. 1978. Non-specific esterase activity in human lymphocytes. Clin. Immunol. Immunopathol. 10: 47-58.

Rao, J.V., Swamy, A.N., Yamin, S., Rao, S.H. and Rahman, M.F. 1992. Teratism induced in the developing chick by RPR-V, an organophosphate. Food Chem. Toxicol. 30 (11): 945-951.

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

Romanoff, A.L. 1997. Life in Twenty-one Days. Extension Bulletin, 205. <http://www.msstate.edu/dept/poultry/avianemb.htm>

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.
- Roskopf, W.J. and Woerpel, R.W. 1996. *Diseases of Cage and Aviary Birds*. Williams&Wilkins.
- Sahu, C.R. and Ghatak, S. 2002. Effects of dimecron on developing chick embryo: Malformations and other histopathological changes. *Anat. Histol. Embryol.* 31: 15-20.
- Sato, S. and Tomita, I. 2001. Short-term screening method for the prediction of carcinogenicity of chemical substances: Current status and problems of an *in vivo* rodent micronucleus assay. *J. Health Sci.* 47 (1): 1-8.
- Savage, J.R.K. 2000. Micronuclei: Pitfalls and problems. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Deep/MicronucleiID20016.html>
- SBYKP. 2001. Kimya Sanayi Özel İhtisas Komisyonu Raporu, Tarım İlaçları Alt Komisyon Raporu. Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı, Ankara.
- Schom, C.B. and Abbott, U.K. 1977. Temporal, morphological, and genetic responses of avian embryos to azodrin, an organophosphate insecticide. *Teratology* 15 (1): 81-87.
- Seifert, J. 1989. Teratogenesis of polychlorocycloalkane insecticides in chicken embryos resulting from their interactions at the convulsant recognition sites of the GABA (Pro) receptor complex. *Bull. Env. Cont. Toxicol.* 42: 707-715.
- Sheets, L. and Norton, S. 1985. Peripheral nerve damage in chicks following treatment with organophosphorus compounds *in ovo*. *Toxicol. Appl. Pharm.* 78: 412-420.
- Smith, T.W. 1997. Avian reproductive system. <http://www.msstate.edu/dept/poultry/avianemb.htm>

- Stevens, A. 1990. Pigments and minerals. In: The Theory and Practice of Histological Techniques. Bancroft, J.D. and Stevens, A. (eds.), pp. 245-267.
- Sur, E. 2001. Yumurtaya verilen Aflatoksin B₁ (AFB₁)'in tavukların lenfoid organlarının embriyonal gelişimi üzerindeki etkilerinin enzim histokimyasal yöntemlerle araştırılması. S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya.
- Sümbüloğlu, K. ve Sümbüloğlu, V. 1990. Biyoistatistik. Hatipoğlu Yayınevi, 3. Baskı, Ankara.
- Tempel, K.H., Ignatius, A. and Stammberger, I. 1992. A short-term test for nucleotoxicity that uses chick embryo cells treated *in vitro* and *in vivo*-physico-chemical and biochemical investigations. Comp. Biochem. Physiol. 103C: 73-78.
- Tian, Y., Ishikawa, H. and Yamauchi, T. 2000. Analysis of cytogenetic and developmental effects on pre-implantation, mid-gestation and near-term mouse embryos after treatment with trichlorfon during zygote stage. Mutat. Res.-Gen. Tox. En. 471: 37-44.
- Tingle, C.C.D., Rother, J.A., Dewhurst, C.F., Lauer, S. and King, W.J. 2003. Fipronil: Environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 176: 1-66.
- Todd, L.A. and Bloom, S.E. 1980. Differential induction of sister chromatid exchanges by indirect-acting mutagen-carcinogens at early and late stages of embryonic development. Environ. Mutagen. 2: 435-445.
- Tomlin, C.D.S. 2000. The pesticide manual 2000. British Crop Protection Council, 12th edition.
- Tuncer, A. 2002. Zaman aşımında ilaç aktivitesindeki değişikliklerin LD₅₀ tayin yöntemiyle araştırılması. T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Edirne.
- USEPA. 1996a. Fipronil. Pesticide fact sheet. EPA 737-F-96-005. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, USA. <http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/199ay-12/pr-736DIR/Facts/Factsheet.txt.html>

- USEPA. 1996b. *In vivo* mammalian cytogenetics test: Erythrocyte micronucleus assay. Health effects test guidelines EPA OPPTS 870. 5395. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, USA. http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/870-5395.pdf
- USEPA. 1998. Fipronil for use on rice (Regent, Icon) and pets (Frontline). HED risk assessment. Chemical 129121, Barcodes D242090, D245656, D245627, & D241676, Cases 288765, 031271, 060305, & 061662, Submissions S535772, S541670, S541551, S534929. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, USA.
- USEPA. 2002. Name of chemical: Tebufenpyrad. Pesticide fact sheet. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, USA. <http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/tebufenpyrad.pdf>
- 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, J-P., 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. 1992. Teratological examination of the insecticide methylparathion (Wofatox 50 EC) on pheasant embryos. 2. Biochemical study. *Acta Vet. Hung.* 40 (3): 203-206.
- Varnagy, L. 1995. Teratogenicity testing of pesticides on bird fetuses. *Hungarian Agricultural Research* 2: 30-33.
- Varnagy, L. 1999. Degradation of some pesticides in avian embryos. *Acta Vet. Hung.* 47 (1): 117-122.

- Varnagy, L., Budai, P., Molnar, E., Füzési, 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.
- Verret, M.J., Scott, W.F., Reynaldo, E.F., Alterman, E.K. and Thomas, C.A. 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. 1991. The use of chick embryo for prediction of some embryotoxic effects of mycotoxins in mammals. *Vet. Med. Praha* 36 (3): 175-181.
- Wilmer, J.L. and Bloom, S.E. 1991. A cytogenetic approach for detecting the selective toxicity of drugs in avian embryonic B and T lymphocytes. *Mutat. Res.* 253: 161-172.
- Wolf, T. and Luepke, N.P. 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, N.-P. 2002. Some new methodological aspects of the hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN). *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.* 514: 59-76.
- Wolf, T., Niehaus-Rolf, C. and Luepke, N.-P. 2003. Investigating genotoxic and hematotoxic effects of *N*-nitrosodimethylamine, *N*-nitrosodiethylamine and *N*-nitrosodiethanolamine in the hen's egg-micronucleus test (HET-MN). *Food Chem. Tox.* 41: 561-573.
- Wulff, J.C., Sale, G.E. Deeg, H.J. and Storb, R. 1981. Nonspecific acid esterase activity as a marker for canine T-lymphocytes. *Exp. Hematol.* 9 (8): 850-870.

- Wytenbach, C.R. and Hwang, J.D. 1984. Relationship between insecticide-induced short and wry neck and cervical defects visible histologically shortly after treatment of chick embryos. *J. Exp. Zool.* 229: 437-446.
- Wytenbach, 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.
- Yang, T.J., Jantzen, P.A. and Williams, L.F. 1979. Acid α -naphthyl acetate esterase: Presence of activity in bovine and human T- and B lymphocytes. *Immunology* 38: 85-93.
- Yılmaz, Ş. 1997. Bazı metal kombinasyonlarının tavuk embriyolarında teratojenik etkileri-Bakır, molibden ve kadmiyumun etkileri. A. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Zang, Y. Zhong, Y., Luo, Y. and Kong, Z.M. 2000. Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environ. Pollut.* 108: 271-278.
- 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.
- Zicca, A., Zeprini, A., Cadoni, A., Franzi, A.T., Ferrarini, M. and Grossi, C.E. 1981. Ultrastructural localization of alpha-naphthyl acetate acid esterase in human T_m lymphocytes. *Am. J. Pathol.* 105 (1): 40-46.

EK A (Tablolar)

Tablo 1. Kuluçka başlangıcında saf fipronil enjeksiyonu ile gerçekleştirilen birinci denemede oluşturulan gruplar ve yumurtalara uygulanan işlemler ($\mu\text{g}/\text{yum}=\text{mikrogram}/\text{yumurta}$).

Gruplar	Gruptaki Her Bir Yumurtaya Uygulanan İşlem
Kontrol (n=20)	Hiçbir işlem uygulanmadı.
Negatif kontrol (%100'lük aseton) (n=20)	20 μl hacminde saf aseton enjekte edildi.
31.25 $\mu\text{g}/\text{yum}$ saf fipronil (n=20)	20 μl hacminde saf asetonda çözdürülmüş 31.25 μg saf fipronil enjekte edildi.
62.50 $\mu\text{g}/\text{yum}$ saf fipronil (n=20)	20 μl hacminde saf asetonda çözdürülmüş 62.50 μg saf fipronil enjekte edildi.
125 $\mu\text{g}/\text{yum}$ saf fipronil (n=20)	20 μl hacminde saf asetonda çözdürülmüş 125 μg saf fipronil enjekte edildi.
250 $\mu\text{g}/\text{yum}$ saf fipronil (n=20)	20 μl hacminde saf asetonda çözdürülmüş 250 μg saf fipronil enjekte edildi.

Tablo 2. Kuluçka başlangıcında ticari fipronil enjeksiyonu ile gerçekleştirilen ikinci denemede oluşturulan gruplar ve yumurtalara uygulanan işlemler ($\mu\text{g}/\text{yum}=\text{mikrogram}/\text{yumurta}$).

Gruplar	Gruptaki Her Bir Yumurtaya Uygulanan İşlem
Kontrol (n=20)	Hiçbir işlem uygulanmadı.
Negatif kontrol (Bidistile su) (n=20)	20 μl hacminde steril bidistile su enjekte edildi.
50 $\mu\text{g}/\text{yum}$ ticari fipronil (n=20)	20 μl hacminde steril bidistile suda sulandırılmış 50 μg ticari fipronil enjekte edildi.
125 $\mu\text{g}/\text{yum}$ ticari fipronil (n=20)	20 μl hacminde steril bidistile suda sulandırılmış 125 μg ticari fipronil enjekte edildi.
250 $\mu\text{g}/\text{yum}$ ticari fipronil (n=20)	20 μl hacminde steril bidistile suda sulandırılmış 250 μg ticari fipronil enjekte edildi.
500 $\mu\text{g}/\text{yum}$ ticari fipronil (n=20)	20 μl hacminde steril bidistile suda sulandırılmış 500 μg ticari fipronil enjekte edildi.

Tablo 3. Kuluçka başlangıcında LD₅₀ ve subletal dozlarda saf fipronil enjeksiyonu gerçekleştirilen deneme için oluşturulan gruplar ve uygulanan işlemler (µg/yum=mikrogram/yumurta, ng/yum=nanogram/yumurta).

Gruplar	Gruptaki Her Bir Yumurtaya Uygulanan İşlem
Kontrol (n=36)	Hiçbir işlem uygulanmadı.
Negatif kontrol (%100'lük aseton) (n=36)	20 µl hacminde saf aseton enjekte edildi.
Pozitif kontrol (40 ng/yum AFB ₁) (n=36)	20 µl hacminde %30'luk etanol içerisinde çözdürülmüş 40 ng aflatoksin B ₁ enjekte edildi.
161 µg/yum saf fipronil (n=36)	20 µl hacminde saf asetonunda çözdürülmüş 161 µg saf fipronil enjekte edildi.
80.50 µg/yum saf fipronil (n=36)	20 µl hacminde saf asetonunda çözdürülmüş 80.50 µg saf fipronil enjekte edildi.
40.25 µg/yum saf fipronil (n=36)	20 µl hacminde saf asetonunda çözdürülmüş 40.25 µg saf fipronil enjekte edildi.

Tablo 4. Kuluçkanın 8. gününde üç farklı dozda saf fipronil enjeksiyonu gerçekleştirilen deneme için oluşturulan gruplar ve uygulanan işlemler (µg/yum=mikrogram/yumurta, ng/yum=nanogram/yumurta).

Gruplar	Gruptaki Her Bir Yumurtaya Uygulanan İşlem
Kontrol (n=36)	Hiçbir işlem uygulanmadı.
Negatif kontrol (%70'lik aseton) (n=36)	40 µl hacminde %70'lik aseton enjekte edildi.
Pozitif kontrol I (80 ng/yum AFB ₁) (n=36)	40 µl hacminde %30'luk etanol içerisinde çözdürülmüş 80 ng aflatoksin B ₁ enjekte edildi.
Pozitif kontrol II (50 µg/yum CP) (n=12)	40 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 50 µg siklofosfamid enjekte edildi.
Pozitif kontrol III (250 µg/yum CP) (n=12)	40 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 250 µg siklofosfamid enjekte edildi.
Pozitif kontrol IV (500 µg/yum CP) (n=12)	40 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 500 µg siklofosfamid enjekte edildi.
161 µg/yum saf fipronil (n=36)	40 µl hacminde %70'lik asetonunda çözdürülmüş 161 µg saf fipronil enjekte edildi.
80.50 µg/yum saf fipronil (n=36)	40 µl hacminde %70'lik asetonunda çözdürülmüş 80.50 µg saf fipronil enjekte edildi.
40.25 µg/yum saf fipronil (n=36)	40 µl hacminde %70'lik asetonunda çözdürülmüş 40.25 µg saf fipronil enjekte edildi.

Tablo 5. Birinci denemedeki gruplardan kuluçkanın 15. gününde elde edilen sonuçlar.

Gruplar	İnfertil yumurta sayısı	Fertil yumurta sayısı	Anormal embriyo sayısı	Anormal embriyo oranı* (%)	Ölü embriyo sayısı	Mortalite (%)	Düzeltilmiş mortalite (%)
Kontrol (n=20)	0	20	0	0	1	5.00	-
Negatif kontrol (%100'lük aseton) (n=20)	1	19	0	0	3	15.79	-
31.25 µg/yum saf fipronil (n=20)	1	19	2	10.53	5	26.32	22.30
62.50 µg/yum saf fipronil (n=20)	2	18	2	11.11	6	33.33**	29.70
125 µg/yum saf fipronil (n=20)	0	20	2	10.00	8	40.00**	36.70
250 µg/yum saf fipronil (n=20)	2	18	1	5.56	12	66.67**	64.80

*Anormal embriyo oranı bakımından kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsizdir ($p>0.05$)

**Kontrol grubu mortalitesi ile aradaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

Tablo 6. İkinci denemedeki gruplardan kuluçkanın 15. gününde elde edilen sonuçlar.

Gruplar	İnfertil yumurta sayısı	Fertil yumurta sayısı	Anormal embriyo sayısı	Anormal embriyo oranı* (%)	Ölü embriyo sayısı	Mortalite (%)	Düzeltilmiş mortalite (%)
Kontrol (n=20)	2	18	0	0.00	1	5.56	-
Negatif kontrol (Bidistile su) (n=20)	1	19	1	5.26	1	5.26	-
50 µg/yum ticari fipronil (n=20)	0	20	2	10.00	5	25.00	20.60
125 µg/yum ticari fipronil (n=20)	1	19	2	10.53	6	31.58**	27.60
250 µg/yum ticari fipronil (n=20)	2	18	0	0.00	8	44.44**	41.20
500 µg/yum ticari fipronil (n=20)	2	18	1	5.56	11	61.11**	58.90

*Anormal embriyo oranı bakımından kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsizdir ($p>0.05$)

**Kontrol grubu mortalitesi ile aradaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

Tablo 7. Birinci denemedeki gruplarda gözlenen embriyonik ölümlerin HH skalasına göre dağılımı (EEÖ: Erken Embriyonik Ölüm).

Gruplar	HH Skalasına Göre Evreler					
	HH-1-20 (EEÖ)	HH-22	HH-30	HH-36	HH-37	HH-39
Kontrol (n=1)	1	-	-	-	-	-
Negatif kontrol (%100'lük aseton) (n=3)	3	-	-	-	-	-
31.25 µg/yum saf fipronil (n=5)	4	-	-	-	1	-
62.50 µg/yum saf fipronil (n=6)	4	-	-	-	-	2
125 µg/yum saf fipronil (n=8)	6	-	-	1	1	-
250 µg/yum saf fipronil (n=12)	10	1	1	-	-	-

Tablo 8. İkinci denemedeki gruplarda gözlenen embriyonik ölümlerin HH skalasına göre dağılımı (EEÖ: Erken Embriyonik Ölüm).

Gruplar	HH Skalasına Göre Evreler							
	HH-1-20 (EEÖ)	HH-21	HH-26	HH-27	HH-28	HH-33	HH-35	HH-38
Kontrol (n=1)	1	-	-	-	-	-	-	-
Negatif kontrol (Bidistile su) (n=1)	-	-	-	1	-	-	-	-
50 µg/yum ticari fipronil (n=5)	2	-	1	-	-	-	1	1
125 µg/yum ticari fipronil (n=6)	3	-	1	-	-	-	2	-
250 µg/yum ticari fipronil (n=8)	2	-	-	-	1	1	4	-
500 µg/yum ticari fipronil (n=11)	8	1	-	-	1	-	1	-

Tablo 9. Birinci denemede ki gruplardan kuluçkanın 15. gününde elde edilen ortalama ağırlık ve uzunluk ölçüm sonuçları.

Gruplar	Canlı embriyo ağırlığı (g) $\bar{x} \pm SS$	Nispî embriyo ağırlığı (g) $\bar{x} \pm SS$	CRL (mm) $\bar{x} \pm SS$
Kontrol (n=19)	11.92±1.83	21.99±3.59	61.43±2.42
Negatif kontrol (%100'lük aseton) (n=16)	10.98±1.09	20.33±1.99	60.52±1.74
31.25 µg/yum saf fipronil (n=14)	9.61±1.39*	18.07±2.88**	59.24±2.26 [†]
62.50 µg/yum saf fipronil (n=12)	9.52±1.68*	17.47±3.10**	57.88±2.22 [†]
125 µg/yum saf fipronil (n=12)	10.00±1.69*	18.45±3.63**	59.76±1.56 [†]
250 µg/yum saf fipronil (n=6)	8.92±1.18*	16.40±2.43**	57.33±2.23 [†]

*Canlı embriyo ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=26.918, $p<0.001$)

**Nispî embriyo ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=24.685, $p<0.001$)

[†]CRL değerleri bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=26.197, $p<0.001$)

Tablo 10. İkinci denemede ki gruplardan kuluçkanın 15. gününde elde edilen ortalama ağırlık ve uzunluk ölçüm sonuçları.

Gruplar	Canlı embriyo ağırlığı (g) $\bar{x} \pm SS$	Nispî embriyo ağırlığı (g) $\bar{x} \pm SS$	CRL (mm) $\bar{x} \pm SS$
Kontrol (n=17)	11.69±1.00	21.36±2.09	61.88±2.89
Negatif kontrol (Bidistile su) (n=18)	11.03±1.56	19.97±2.80	61.51±1.81
50 µg/yum ticari fipronil (n=15)	9.63±1.11*	17.70±2.10**	59.45±1.34 [†]
125 µg/yum ticari fipronil (n=13)	9.84±1.36*	18.02±2.35**	59.43±1.90 [†]
250 µg/yum ticari fipronil (n=10)	10.55±0.53*	19.14±1.11**	59.63±0.91 [†]
500 µg/yum ticari fipronil (n=7)	9.59±0.89*	17.29±1.86**	57.73±3.54 [†]

*Canlı embriyo ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=27.921, $p<0.001$)

**Nispî embriyo ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=24.797, $p<0.001$)

[†]CRL değerleri bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=32.856, $p<0.001$)

Tablo 11. Kuluçka başlangıcında enjeksiyon yapılan gruplardan kuluçkanın 7. gününde elde edilen veriler.

Gruplar	Açılan yumurta sayısı	İnfertil yumurta sayısı	Fertil yumurta sayısı	Anormal embriyo sayısı	Anormal embriyo oranı* (%)	Ölü embriyo sayısı	Mortalite (%)
Kontrol	12	1	11	0	0.00	0	0.00
Negatif kontrol (%100'lük aseton)	12	0	12	0	0.00	1	8.33
Pozitif kontrol (40 ng/yum AFB ₁)	12	1	11	1	9.09	5	45.45**
161 µg/yum saf fipronil	12	0	12	1	8.33	3	25.00
80.50 µg/yum saf fipronil	12	0	12	1	8.33	1	8.33
40.25 µg/yum saf fipronil	12	0	12	0	0.00	1	8.33

*Anormal embriyo oranı bakımından kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsizdir ($p>0.05$)

**Kontrol grubu mortalitesi ile aradaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

Tablo 12. Kuluçka başlangıcında enjeksiyon yapılan gruplardan kuluçkanın 7. gününde elde edilen ortalama canlı ve nispi embriyo ağırlıkları ile CRL değerleri.

Gruplar	Canlı embriyo ağırlığı (g) $\bar{x} \pm SS$	Nispi embriyo ağırlığı (g) $\bar{x} \pm SS$	CRL (mm) $\bar{x} \pm SS$
Kontrol (n=11)	0.62±0.06	0.99±0.10	19.70±0.87
Negatif kontrol (%100'lük aseton) (n=11)	0.57±0.07	0.91±0.13	20.21±1.46
Pozitif kontrol (40 ng/yum AFB ₁) (n=6)	0.46±0.08*	0.73±0.014**	18.65±2.06
161 µg/yum saf fipronil (n=9)	0.48±0.07*	0.76±0.13**	18.48±1.37
80.50 µg/yum saf fipronil (n=11)	0.46±0.09*	0.72±0.15**	17.73±1.88 [†]
40.25 µg/yum saf fipronil (n=11)	0.48±0.10*	0.76±0.15**	18.85±0.98

*Canlı embriyo ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=24.184, $p<0.001$)

**Nispi embriyo ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=23.255, $p<0.001$)

[†]CRL değerleri bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=14.314, $p<0.05$)

Tablo 13. Kuluçka başlangıcında enjeksiyon yapılan gruplardan kuluçkanın 14. gününde elde edilen veriler.

Gruplar	Açılan yumurta sayısı	İnfertil yumurta sayısı	Fertil yumurta sayısı	Anormal embriyo sayısı	Anormal embriyo oranı* (%)	Ölü embriyo sayısı	Mortalite (%)
Kontrol	12	1	11	0	0.00	0	0.00
Negatif kontrol (%100'lük aseton)	12	0	12	0	0.00	3	25.00
Pozitif kontrol (40 ng/yum AFB ₁)	12	0	12	0	0.00	4	33.33**
161 µg/yum saf fipronil	12	0	12	1	8.33	4	33.33**
80.50 µg/yum saf fipronil	12	0	12	0	0.00	2	16.67
40.25 µg/yum saf fipronil	12	0	12	2	16.67	3	25.00

*Anormal embriyo oranı bakımından kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsizdir ($p>0.05$)

**Kontrol grubu mortalitesi ile aradaki farklar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

Tablo 14. Kuluçka başlangıcında enjeksiyon yapılan gruplardan kuluçkanın 14. gününde elde edilen ortalama canlı ve nispi embriyo ağırlıkları, CRL değerleri ile karaciğer ağırlıkları.

Gruplar	Canlı embriyo ağırlığı (g) $\bar{x} \pm SS$	Nispi embriyo ağırlığı (g) $\bar{x} \pm SS$	CRL [†] (mm) $\bar{x} \pm SS$	Karaciğer ağırlığı (g) $\bar{x} \pm SS$
Kontrol (n=11)	8.02±1.00	12.84±1.45	55.81±2.80	0.2109±0.0144
Negatif kontrol (%100'lük aseton) (n=9)	7.40±0.78	11.85±1.20	54.94±2.11	0.1982±0.0080
Pozitif kontrol (40 ng/yum AFB ₁) (n=8)	7.19±0.57	11.58±1.00	53.65±1.22	0.1957±0.0073 [‡]
161 µg/yum saf fipronil (n=8)	6.83±1.07*	10.98±1.64**	51.38±4.67	0.1829±0.0266 [‡]
80.50 µg/yum saf fipronil (n=10)	6.71±0.38*	11.00±0.67**	53.14±2.18	0.1889±0.0080 [‡]
40.25 µg/yum saf fipronil (n=9)	6.57±0.76*	10.69±1.42**	53.69±1.91	0.1931±0.0103 [‡]

*Canlı embriyo ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=15.534, $p<0.05$)

**Nispi embriyo ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=12.938, $p<0.05$)

[†]CRL değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsizdir (Kruskal-Wallis=9.224, $p>0.05$)

[‡]Karaciğer ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=16.651, $p<0.05$)

Tablo 15. Kuluçka başlangıcında enjeksiyon yapılan gruplardan elde edilen çıkış verileri.

Gruplar	Çıkışa bırakılan yumurta sayısı	İnfertil yumurta sayısı	Fertil yumurta sayısı	Çıkan civciv sayısı	Civciv çıkış oranı (%)	Anormal civciv sayısı	Anormal civciv oranı** (%)	Anormal embriyo sayısı	Anormal embriyo oranı (%)	Ölü embriyo sayısı	Mortalite (%)
Kontrol	12	0	12	12	100.00	0	0.00	0	0	0	0.00
Negatif kontrol (%100'lük aseton)	12	1	11	10	90.91	0	0.00	0	0	1	9.09
Pozitif kontrol (40 ng/yum AFB ₁)	12	1	11	6	54.55*	1	16.67	0	0	5	45.45 [†]
161 µg/yum saf fipronil	12	0	12	7	58.33*	1	14.29	0	0	5	41.67 [†]
80.50 µg/yum saf fipronil	12	0	12	7	58.33*	0	0.00	0	0	5	41.67 [†]
40.25 µg/yum saf fipronil	12	1	11	6	54.55*	2	33.33	0	0	5	45.45 [†]

*Civciv çıkış oranı bakımından kontrol grubu ile aradaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

**Anormal civciv oranı bakımından kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsizdir ($p>0.05$)

[†]Kontrol grubu mortalitesi ile aradaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

Tablo 16. Kuluçka başlangıcında enjeksiyon yapılan yumurtalardan çıkan civcivlerin ortalama çıkış ve 10. gün ağırlıkları ile 10. gün karaciğer ağırlıkları.

Gruplar	Civciv çıkış ağırlığı (g) $\bar{x} \pm SS$	Civciv 10. gün ağırlığı (g) $\bar{x} \pm SS$	Civciv 10. gün karaciğer ağırlığı (g) $\bar{x} \pm SS$
Kontrol	47.19±1.49 (n=12)	69.95±6.53 (n=12)	2.13±0.31 (n=6)
Negatif kontrol (%100'lük aseton)	45.98±1.33 (n=10)	67.54±4.17 (n=9)	1.98±0.14 (n=6)
Pozitif kontrol (40 ng/yum AFB ₁)	42.07±2.85* (n=6)	60.84±3.75** (n=6)	1.81±0.14 [†] (n=6)
161 µg/yum saf fipronil	43.12±1.16* (n=7)	63.90±5.28** (n=7)	2.21±0.47 (n=6)
80.50 µg/yum saf fipronil	44.77±2.41* (n=7)	63.00±4.05** (n=7)	1.89±0.22 (n=6)
40.25 µg/yum saf fipronil	42.54±1.61* (n=6)	65.26±1.44 (n=6)	1.92±0.09 (n=6)

*Civciv çıkış ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=26.278, $p<0.001$)

**10. gün civciv ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=14.681, $p<0.05$)

[†]10. gün civciv karaciğer ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=8.385, $p<0.05$)

Tablo 17. Kuluçka başlangıcında enjeksiyon yapılan gruplardan kuluçkanın 7. ve 14. günlerinde ve çıkışta elde edilen total veriler.

Gruplar	Total kullanılan yumurta sayısı	Total infertil yumurta sayısı	Total fertil yumurta sayısı	Total anormal embriyo ve civciv sayısı	Total anormal embriyo ve civciv oranı (%)	Total ölü embriyo sayısı	Total mortalite (%)
Kontrol	36	2	34	0	0	0	0
Negatif kontrol (%100'lük aseton)	36	1	35	0	0	5	14.29**
Pozitif kontrol (40 ng/yum AFB ₁)	36	2	34	2	5.88	14	41.18**
161 µg/yum saf fipronil	36	0	36	2	5.56	12	33.33**
80.50 µg/yum saf fipronil	36	0	36	1	2.78	8	22.22**
40.25 µg/yum saf fipronil	36	1	35	4	11.43*	9	25.71**

*Anormal embriyo ve civciv oranı bakımından kontrol grubu ile aradaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

**Kontrol grubu mortalitesi ile aradaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

Tablo 18. Kuluçka başlangıcında enjeksiyon yapılan gruplarda kuluçkanın 7. ve 14. günlerindeki ve çıkış olmayan yumurtalardaki gözlenen embriyonik ölümlerin HH skalasına göre dağılımı (EEÖ: Erken Embriyonik Ölüm).

Gruplar	HH Skalasına Göre Evreler							
	HH-1-20 (EEÖ)	HH-22	HH-24	HH-25	HH-30	HH-36	HH-39	HH-46 (Kabuk Altı)
Kontrol (n=0)	-	-	-	-	-	-	-	-
Negatif kontrol (%100'lük aseton) (n=5)	4	-	-	-	-	-	-	1
Pozitif kontrol (40 ng/yum AFB ₁) (n=14)	8	-	-	-	2	-	-	4
161 µg/yum saf fipronil (n=12)	8	2	1	-	-	-	-	1
80.50 µg/yum saf fipronil (n=8)	4	-	1	-	1	-	1	1
40.25 µg/yum saf fipronil (n=9)	1	-	-	2	-	1	-	5

Tablo 19. Kuluçkanın 8. gününde enjeksiyon yapılan gruplardan kuluçkanın 11. gününde elde edilen veriler.

Gruplar	Açılan yumurta sayısı	İnfertil yumurta sayısı	Fertil yumurta sayısı	Anormal embriyo sayısı	Anormal embriyo oranı (%)	Ölü embriyo sayısı	Mortalite (%)
Kontrol	12	2	10	0	0.00	0	0.00
Negatif kontrol (%70'lik aseton)	12	0	12	0	0.00	2	16.67
Pozitif kontrol I (80 ng/yum AFB ₁)	12	1	11	1	9.09	2	18.18
Pozitif kontrol II (50 µg/yum CP)	12	1	11	2	18.18	0	0.00
Pozitif kontrol III (250 µg/yum CP)	12	0	12	8	66.67*	7	58.33**
Pozitif kontrol IV (500 µg/yum CP)	12	1	11	10	90.91*	10	90.91**
161 µg/yum saf fipronil	12	0	12	1	8.33	9	75.00**
80.50 µg/yum saf fipronil	12	0	12	1	8.33	6	50.00**
40.25 µg/yum saf fipronil	12	1	11	1	9.09	4	36.36**

*Anormal embriyo oranı bakımından kontrol grubu ile aradaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.001$)

**Kontrol grubu mortalitesi ile aradaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

Tablo 20. Kuluçkanın 8. gününde enjeksiyon yapılan gruplardan kuluçkanın 11. gününde elde edilen ortalama canlı ve nispi embriyo ağırlıkları, CRL değerleri ile karaciğer ağırlıkları.

Gruplar	Canlı embriyo ağırlığı (g) $\bar{x} \pm SS$	Nispi embriyo ağırlığı (g) $\bar{x} \pm SS$	CRL (mm) $\bar{x} \pm SS$	Karaciğer ağırlığı (g) $\bar{x} \pm SS$
Kontrol (n=10)	2.56±0.27	4.13±0.41	38.50±1.33	0.0538±0.0034
Negatif kontrol (%70'lik aseton) (n=10)	2.46±0.25	3.92±0.38	37.10±1.65	0.0542±0.0082
Pozitif kontrol I (80 ng/yum AFB ₁) (n=9)	2.43±0.10	3.90±0.22	37.78±1.70	0.0486±0.0032 [‡]
Pozitif kontrol II (50 µg/yum CP) (n=11)	2.23±0.11*	3.59±0.18**	35.27±0.82 [†]	0.0408±0.0055 [‡]
Pozitif kontrol III (250 µg/yum CP) (n=5)	2.37±0.08*	3.74±0.22	34.00±1.27 [†]	0.0392±0.0070 [‡]
Pozitif kontrol IV (500 µg/yum CP) (n=1)	2.30±0.00*	3.83±0.00	34.00±0.00 [†]	0.0400±0.0000 [‡]
161 µg/yum saf fipronil (n=3)	2.22±0.08*	3.40±0.10**	36.00±1.00 [†]	0.0453±0.0050 [‡]
80.50 µg/yum saf fipronil (n=6)	2.21±0.32*	3.49±0.57**	35.57±1.43 [†]	0.0461±0.0083 [‡]
40.25 µg/yum saf fipronil (n=7)	2.18±0.14*	3.34±0.17**	34.43±1.46 [†]	0.0407±0.0096 [‡]

*Canlı embriyo ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=47.720, $p<0.001$)

**Nispi embriyo ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=27.537, $p<0.001$)

[†]CRL değerleri bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=37.042, $p<0.001$)

[‡]Karaciğer ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=32.914, $p<0.001$)

Tablo 21. Kuluçkanın 8. gününde enjeksiyon yapılan gruplardan kuluçkanın 18. gününde elde edilen veriler.

Gruplar	Açılan yumurta sayısı	İnfertil yumurta sayısı	Fertil yumurta sayısı	Anormal embriyo sayısı	Anormal embriyo oranı* (%)	Ölü embriyo sayısı	Mortalite (%)
Kontrol	12	1	11	0	0	0	0.00
Negatif kontrol (%70'lik aseton)	12	0	12	0	0	1	8.33
Pozitif kontrol (80 ng/yum AFB ₁)	12	1	11	0	0	3	27.27
161 µg/yum saf fipronil	12	1	11	3	27.27	6	54.55**
80.50 µg/yum saf fipronil	12	0	12	0	0	6	50.00**
40.25 µg/yum saf fipronil	12	0	12	0	0	6	50.00**

*Anormal embriyo oranı bakımından kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsizdir ($p>0.05$)

**Kontrol grubu mortalitesi ile aradaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

Tablo 22. Kuluçkanın 8. gününde enjeksiyon yapılan gruplardan kuluçkanın 18. gününde elde edilen ortalama canlı ve nispi embriyo ağırlıkları, CRL değerleri ile karaciğer ağırlıkları.

Gruplar	Canlı embriyo ağırlığı (g) $\bar{x} \pm SS$	Nispi embriyo ağırlığı (g) $\bar{x} \pm SS$	CRL (mm) $\bar{x} \pm SS$	Karaciğer ağırlığı (g) $\bar{x} \pm SS$
Kontrol (n=11)	19.45±2.11	32.12±3.39	73.50±2.52	0.5832±0.0215
Negatif kontrol (%70'lik aseton) (n=11)	17.78±2.43	29.78±3.63	70.55±4.22 [†]	0.5792±0.0253
Pozitif kontrol (80 ng/yum AFB ₁) (n=8)	20.21±1.21	33.47±2.24	67.75±5.58 [†]	0.5067±0.0826 [‡]
161 µg/yum saf fipronil (n=5)	14.49±2.90*	24.09±4.74**	58.20±4.64 [†]	0.4012±0.1019 [‡]
80.50 µg/yum saf fipronil (n=6)	16.98±2.59*	27.92±4.71**	57.92±1.91 [†]	0.5092±0.0210 [‡]
40.25 µg/yum saf fipronil (n=6)	14.61±0.97*	23.64±1.46**	62.75±1.08 [†]	0.4450±0.0394 [‡]

*Canlı embriyo ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=23.233, $p<0.001$)

**Nispi embriyo ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=24.357, $p<0.001$)

[†]CRL değerleri bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=33.609, $p<0.001$)

[‡]Karaciğer ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=23.640, $p<0.001$)

Tablo 23. Kuluçkanın 8. günü enjeksiyon yapılan gruplardan elde edilen çıkış verileri.

Gruplar	Çıkışa bırakılan yumurta sayısı	İnfertil yumurta sayısı	Fertil yumurta sayısı	Çıkan civciv sayısı	Civciv çıkış oranı (%)	Anormal civciv sayısı	Anormal civciv oranı (%)	Anormal embriyo sayısı	Anormal embriyo oranı [†] (%)	Ölü embriyo sayısı	Mortalite (%)
Kontrol	12	0	12	11	91.67	0	0.00	0	0.00	1	8.33
Negatif kontrol (%70'lik aseton)	12	0	12	8	66.67	0	0.00	0	0.00	4	33.33
Pozitif kontrol (80 ng/yum AFB ₁)	12	1	11	5	45.45*	3	60.00**	0	0.00	6	54.55 [‡]
161 µg/yum saf fipronil	12	1	11	0	0.00*	-	-	1	9.09	11	100.00 [‡]
80.50 µg/yum saf fipronil	12	0	12	0	0.00*	-	-	1	8.33	12	100.00 [‡]
40.25 µg/yum saf fipronil	12	1	11	3	27.27*	1	33.33	0	0.00	8	72.73 [‡]

*Civciv çıkış oranı bakımından kontrol grubu ile aradaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

**Anormal civciv oranı bakımından kontrol grubu ile aradaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

[†]Anormal embriyo oranı bakımından kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsizdir ($p>0.05$)

[‡]Kontrol grubu mortalitesi ile aradaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

Tablo 24. Kuluçkanın 8. gününde enjeksiyon yapılan gruplardan çıkan civcivlerin ortalama çıkış ve 10. gün ağırlıkları ile 10. gün karaciğer ağırlıkları.

Gruplar	Civciv çıkış ağırlığı (g) $\bar{x} \pm SS$	Civciv 10. gün ağırlığı (g) $\bar{x} \pm SS$	Civciv 10. gün karaciğer ağırlığı [†] (g) $\bar{x} \pm SS$
Kontrol	45.25±1.49 (n=11)	68.53±6.46 (n=11)	2.18±0.35 (n=6)
Negatif kontrol (%70'lik aseton)	46.46±1.78 (n=8)	67.81±2.75 (n=8)	2.04±0.13 (n=6)
Pozitif kontrol (80 ng/yum AFB ₁)	42.94±2.84* (n=5)	57.60±7.06** (n=4)	1.79±0.31 (n=4)
161 µg/yum saf fipronil	- (n=0)	- (n=0)	- (n=0)
80.50 µg/yum saf fipronil	- (n=0)	- (n=0)	- (n=0)
40.25 µg/yum saf fipronil	42.67±2.75* (n=3)	53.67±4.37** (n=3)	2.37±0.61 (n=3)

*Civciv çıkış ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=8.034, $p<0.05$)

**Civciv 10. gün ağırlığı bakımından kontrol grubu ile arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=13.628, $p<0.05$)

[†]Civciv 10. gün karaciğer ağırlığı bakımından gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsizdir (Kruskal-Wallis=3.975, $p>0.05$)

Tablo 25. Kuluçkanın 8. günü enjeksiyon yapılan gruplardan kuluçkanın 11. ve 18. günlerinde ve çıkışta elde edilen total veriler.

Gruplar	Total kullanılan yumurta sayısı	Total infertil yumurta sayısı	Total fertil yumurta sayısı	Total anormal embriyo ve civciv sayısı	Total anormal embriyo ve civciv oranı (%)	Total ölü embriyo sayısı	Total mortalite (%)
Kontrol	36	3	33	0	0.00	1	3.03
Negatif kontrol (%70'lik aseton)	36	0	36	0	0.00	7	19.44**
Pozitif kontrol (80 ng/yum AFB ₁)	36	3	33	4	12.12*	11	33.33**
161 µg/yum saf fipronil	36	2	34	6	17.65*	26	76.47**
80.50 µg/yum saf fipronil	36	0	36	2	5.56	24	66.67**
40.25 µg/yum saf fipronil	36	2	34	2	5.88	18	52.94**

*Anormal embriyo ve civciv oranı bakımından kontrol grubu ile aradaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

**Kontrol grubu mortalitesi ile aradaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

Tablo 26. Kuluçkanın 8. günü enjeksiyon yapılan gruplarda kuluçkanın 11. ve 18. günlerindeki ve çıkış olmayan yumurtalardaki gözlenen embriyonik ölümlerin HH skalasına göre dağılımı.

Gruplar	HH Skalasına Göre Evreler					
	HH-34	HH-35	HH-36	HH-38	HH-42	HH-46 (Kabuk Altı)
Kontrol (n=1)	-	-	-	-	-	1
Negatif kontrol (%70'lik aseton) (n=7)	4	-	-	-	-	3
Pozitif kontrol (80 ng/yum AFB ₁) (n=11)	4	2	-	-	-	5
161 µg/yum saf fipronil (n=26)	14	3	1	1	1	6
80.50 µg/yum saf fipronil (n=24)	10	8	-	-	-	6
40.25 µg/yum saf fipronil (n=18)	9	3	-	-	2	4

Tablo 27. Kuluçka başlangıcında ve kuluçkanın 8. günlerinde enjeksiyon yapılan grupların civciv çıkış ve anormal civciv oranlarının karşılaştırılması.

		Gruplar					
	Enjeksiyon zamanı	Kontrol	Negatif kontrol	Pozitif kontrol	161 µg/yum saf fipronil	80.50 µg/yum saf fipronil	40.25 µg/yum saf fipronil
Civciv çıkış oranı (%)	0. gün	100.00	90.91	54.55	58.33*	58.33**	54.55
	8. gün	91.67	66.67	45.45	0.00*	0.00**	27.27
Anormal civciv oranı (%)	0. gün	0.00	0.00	16.67	14.29	0.00	33.33
	8. gün	0.00	0.00	60.00	-	-	33.33

*Aynı sütunda aynı sembolü taşıyan iki grup arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

**Aynı sütunda aynı sembolü taşıyan iki grup arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

Tablo 28. Kuluçka başlangıcında ve kuluçkanın 8. günlerinde enjeksiyon yapılan grupların embriyonik dönemde ve çıkışta elde edilen total verilerinin karşılaştırılması.

		Gruplar					
	Enjeksiyon zamanı	Kontrol	Negatif kontrol	Pozitif kontrol	161 µg/yum saf fipronil	80.50 µg/yum saf fipronil	40.25 µg/yum saf fipronil
Anormal embriyo ve civciv oranı (%)	0. gün	0.00	0.00	5.88	5.56	2.78	11.43
	8. gün	0.00	0.00	12.12	17.65	5.56	5.88
Mortalite (%)	0. gün	0.00	14.29	41.18	33.33*	22.22**	25.71 [†]
	8. gün	3.03	19.44	33.33	76.47*	66.67**	52.94 [†]

*Aynı sütunda aynı sembolü taşıyan iki grup arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.001$)

**Aynı sütunda aynı sembolü taşıyan iki grup arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.001$)

[†]Aynı sütunda aynı sembolü taşıyan iki grup arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

Tablo 29. Kuluçkanın 8. gününde enjeksiyon yapılan gruplardaki embriyolardan kuluçkanın 11. gününde alınan kan örneklerindeki alyuvarlarda (her birey için 5000 alyuvar değerlendirildi) gözlenen MN, NA ve mitotik figürlere ait ortalama oranlar (MN, sadece mikronukleus ihtiva eden alyuvarların oranı; NA, sadece çekirdek anormalliği ihtiva eden alyuvarların oranı; MN ve NA, mikronukleus ve çekirdek anormalliğini birlikte ihtiva eden alyuvarların oranı; Total anormallik, mikronukleus ve çekirdek anormalliklerinin toplamı).

Gruplar	MN* (%) $\bar{x} \pm SS$	NA** (%) $\bar{x} \pm SS$	MN ve NA† (%) $\bar{x} \pm SS$	Total anormallik‡ (%) $\bar{x} \pm SS$	Mitotik figür†† (%) $\bar{x} \pm SS$
Kontrol (n=6)	0.10±0.04 ^a	0.16±0.03 ^a	0.00±0.00 ^a	0.26±0.05 ^a	0.01±0.01 ^{ab}
Negatif kontrol (%70'lik aseton) (n=6)	0.15±0.03 ^{ab}	0.23±0.05 ^{ab}	0.01±0.01 ^a	0.39±0.06 ^{ab}	0.00±0.00 ^a
Pozitif kontrol I (80 ng/yum AFB ₁) (n=6)	0.18±0.06 ^{ab}	0.21±0.04 ^{ab}	0.00±0.00 ^a	0.39±0.07 ^{ab}	0.00±0.00 ^a
Pozitif kontrol II (50 µg/yum CP) (n=6)	4.90±1.09 ^c	0.93±0.68 ^{ab}	0.17±0.19 ^a	6.00±1.80 ^c	0.01±0.01 ^a
Pozitif kontrol III (250 µg/yum CP) (n=5)	12.34±2.03 ^d	6.22±1.38 ^c	3.59±0.94 ^b	22.14±3.86 ^d	0.10±0.10 ^c
Pozitif kontrol IV (500 µg/yum CP) (n=0)	-	-	-	-	-
161 µg/yum saf fipronil (n=3)	0.25±0.03 ^b	0.28±0.14 ^{ab}	0.01±0.01 ^a	0.54±0.17 ^{ab}	0.05±0.03 ^{bc}
80.50 µg/yum saf fipronil (n=6)	0.23±0.06 ^b	0.20±0.07 ^{ab}	0.00±0.00 ^a	0.43±0.12 ^{ab}	0.02±0.02 ^{ab}
40.25 µg/yum saf fipronil (n=6)	0.24±0.06 ^b	0.32±0.06 ^b	0.02±0.01 ^a	0.58±0.11 ^b	0.14±0.11 ^c

*MN oranı bakımından gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (F=331.865, $p<0.001$)

**NA oranı bakımından gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (F=84.618, $p<0.001$)

†MN ve NA oranı bakımından gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (F=132.724, $p<0.001$)

‡Total anormallik oranı bakımından gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (F=259.555, $p<0.001$)

††Mitotik figür oranı bakımından gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (F=11.908, $p<0.001$)

^{a b c} Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

Tablo 30. Kuluçka başlangıcında enjeksiyon yapılan gruplardaki yumurtalardan çıkan civcivlerin 10. gün kan değerleri.

Gruplar	Alyuvar sayısı* (x10 ⁶ /µl) $\bar{x} \pm SS$	Akyuvar sayısı** (x10 ³ /µl) $\bar{x} \pm SS$	Lenfosit oranı † (%) $\bar{x} \pm SS$	ANAE(+) lenfosit oranı ‡ (%) $\bar{x} \pm SS$
Kontrol (n=6)	3.19±0.50 ^{ab}	22.83±7.57 ^{bc}	54.17±2.81 ^{bc}	39.99±3.25 ^c
Negatif kontrol (%100'lük aseton) (n=6)	3.37±0.46 ^b	24.83±6.04 ^c	55.42±5.01 ^c	40.60±5.58 ^c
Pozitif kontrol (40 ng/yum AFB ₁) (n=6)	2.87±0.40 ^{ab}	11.17±4.49 ^a	52.25±5.20 ^{abc}	26.24±2.28 ^{ab}
161 µg/yum saf fipronil (n=6)	2.60±0.41 ^a	11.33±5.75 ^a	50.25±3.52 ^{abc}	22.71±2.82 ^a
80.50 µg/yum saf fipronil (n=6)	3.11±0.25 ^{ab}	15.33±2.33 ^{ab}	48.08±2.62 ^{ab}	29.42±2.12 ^b
40.25 µg/yum saf fipronil (n=6)	2.78±0.18 ^{ab}	11.00±2.36 ^a	46.08±4.25 ^a	27.63±1.27 ^{ab}

*Alyuvar sayısı bakımından gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (F=3.344, $p<0.05$)

**Akyuvar sayısı bakımından gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (F=8.885, $p<0.001$)

†Lenfosit oranı bakımından gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (F=4.762, $p<0.05$)

‡ANAE(+) lenfosit oranı bakımından gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (F=33.140, $p<0.001$)

^{a b c} Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

Tablo 31. Kuluçkanın 8. gününde enjeksiyon yapılan gruplardaki yumurtalardan çıkan civcivlerin 10. gün kan değerleri.

Gruplar	Alyuvar sayısı* (x10 ⁶ /µl) $\bar{x} \pm SS$	Akyuvar sayısı** (x10 ³ /µl) $\bar{x} \pm SS$	Lenfosit oranı [†] (%) $\bar{x} \pm SS$	ANAE(+) lenfosit oranı [‡] (%) $\bar{x} \pm SS$
Kontrol (n=6)	3.19±0.50	22.83±7.57	54.17±2.81 ^b	39.99±3.25 ^b
Negatif kontrol (%70'lik aseton) (n=6)	2.81±0.27	19.33±8.35	53.92±3.54 ^b	32.74±5.17 ^{ab}
Pozitif kontrol (80 ng/yum AFB ₁) (n=4)	2.72±0.47	15.00±3.56	39.25±1.44 ^a	28.07±3.57 ^a
161 µg/yum saf fipronil (n=0)	-	-	-	-
80.50 µg/yum saf fipronil (n=0)	-	-	-	-
40.25 µg/yum saf fipronil (n=3)	3.39±0.17	18.00±3.00	43.17±2.02 ^a	25.56±1.44 ^a

*Alyuvar sayısı bakımından gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsizdir (F=2.540, $p>0.05$)

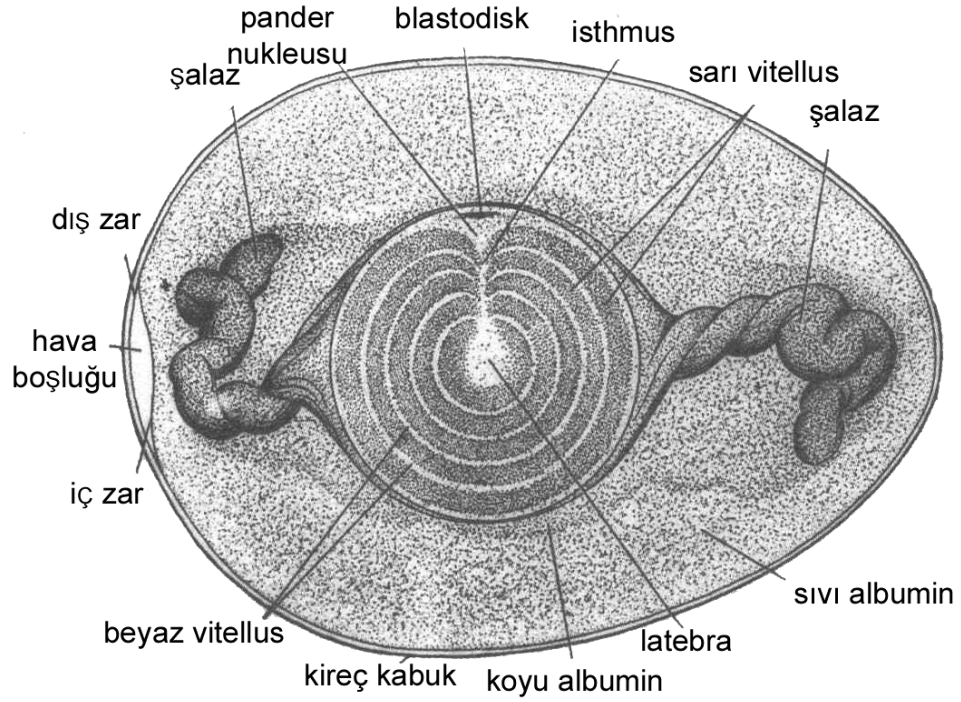
**Akyuvar sayısı bakımından gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsizdir (F=1.112, $p>0.05$)

[†]Lenfosit oranı bakımından gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (F=33.880 $p<0.001$)

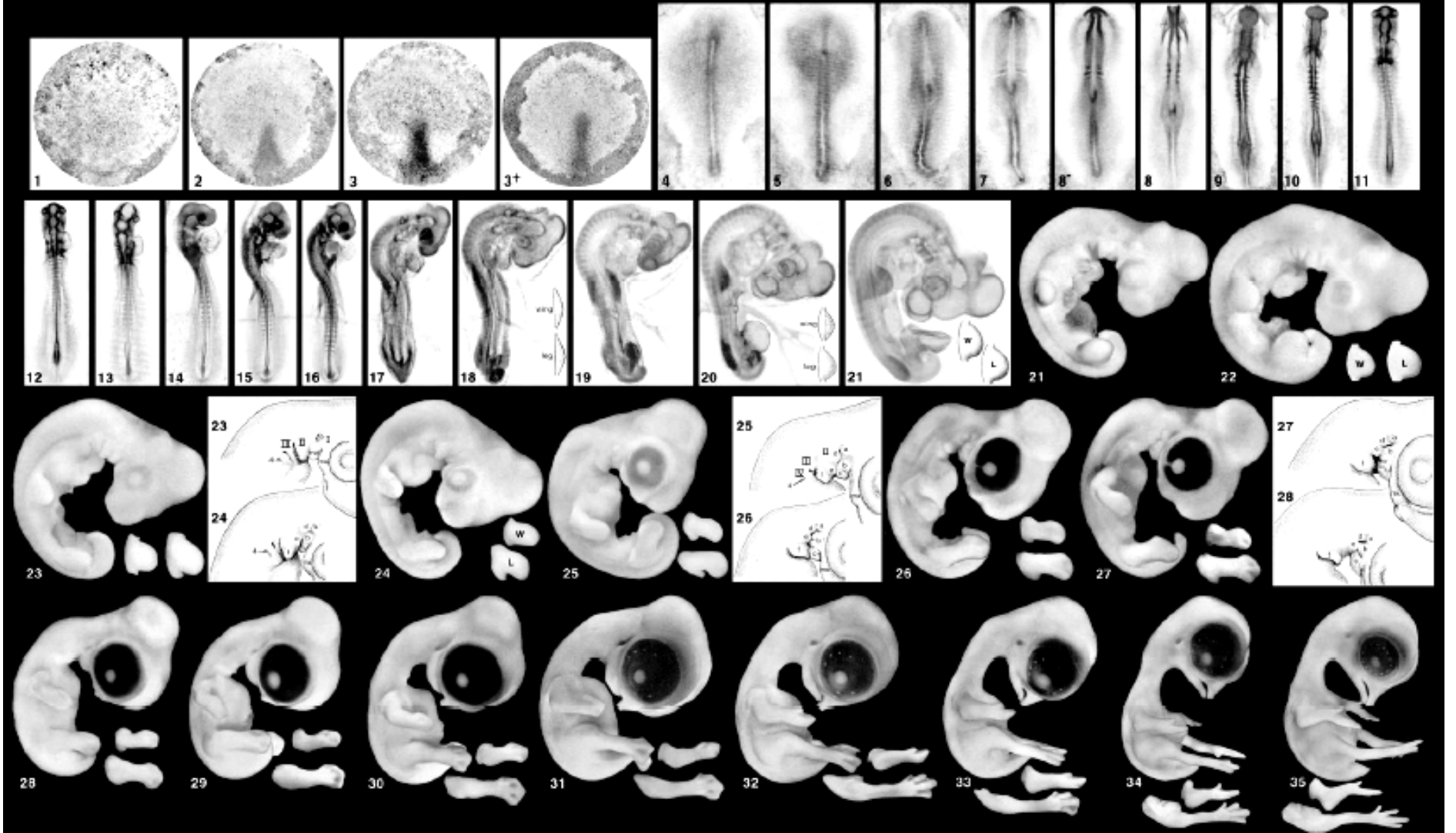
[‡]ANAE(+) lenfosit oranı bakımından gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (F=11.808, $p<0.001$)

^{a b} Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$)

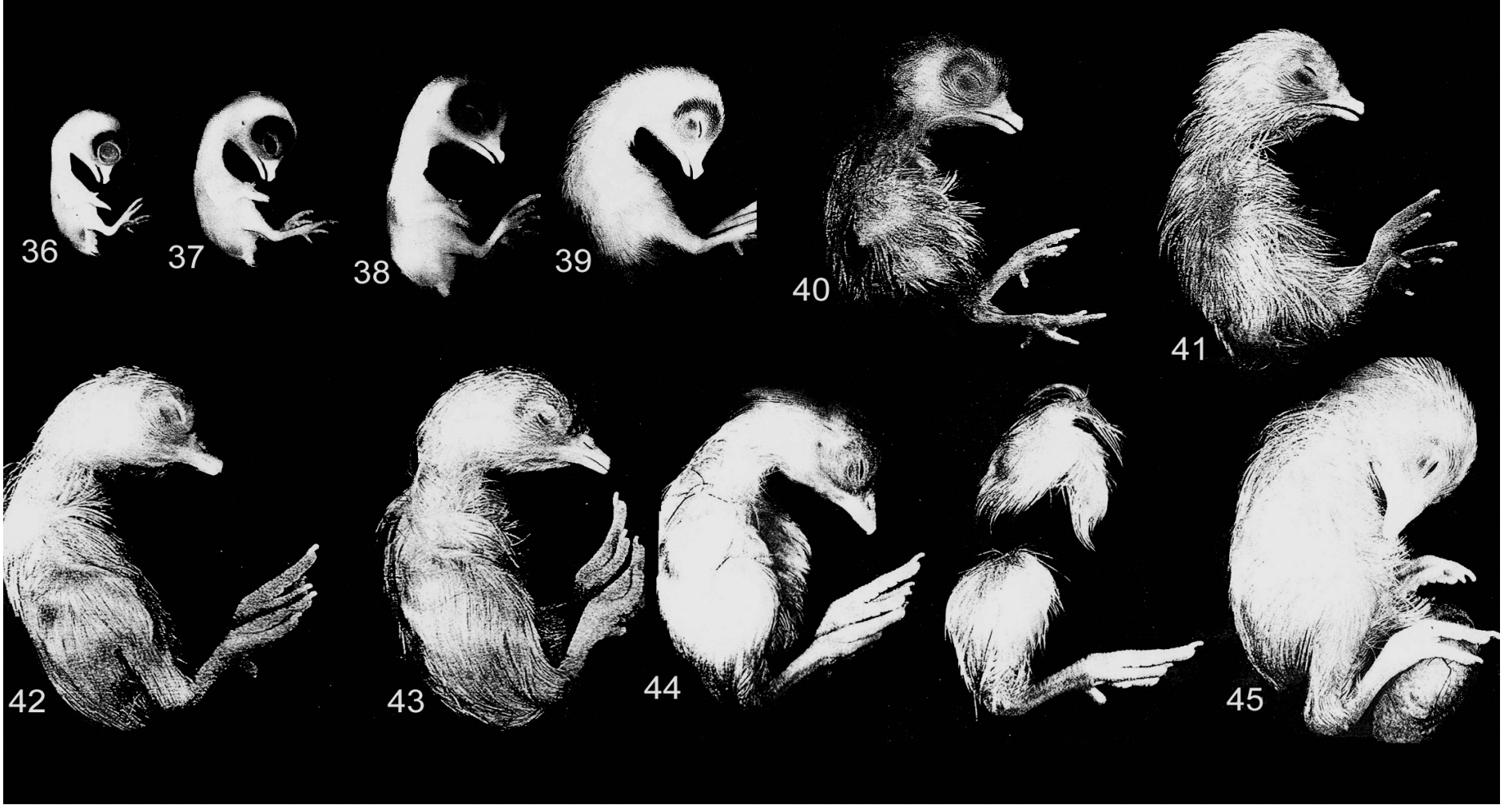
EK B (Şekiller)



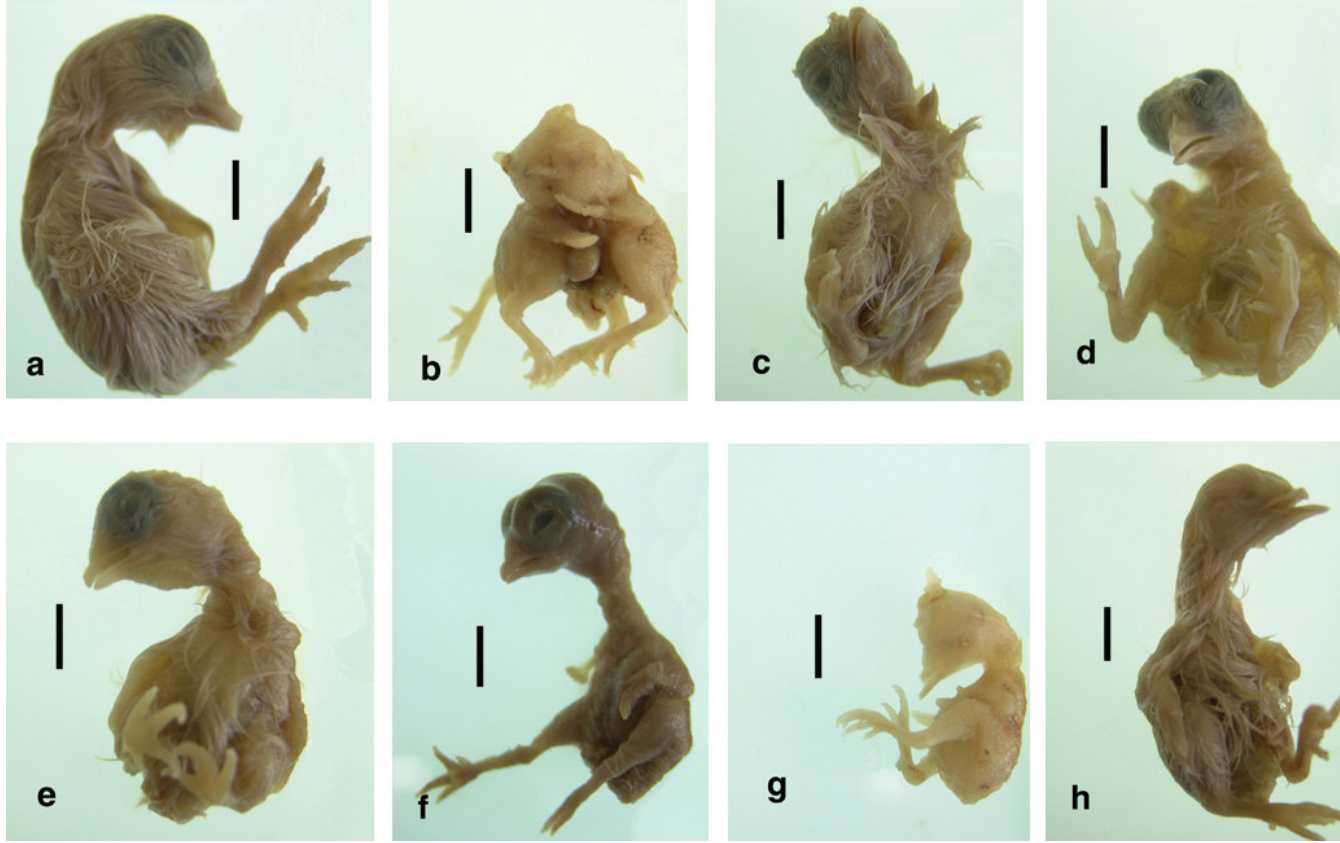
Şekil 1. Tavuk yumurtasının şematize edilmiş yapısı.



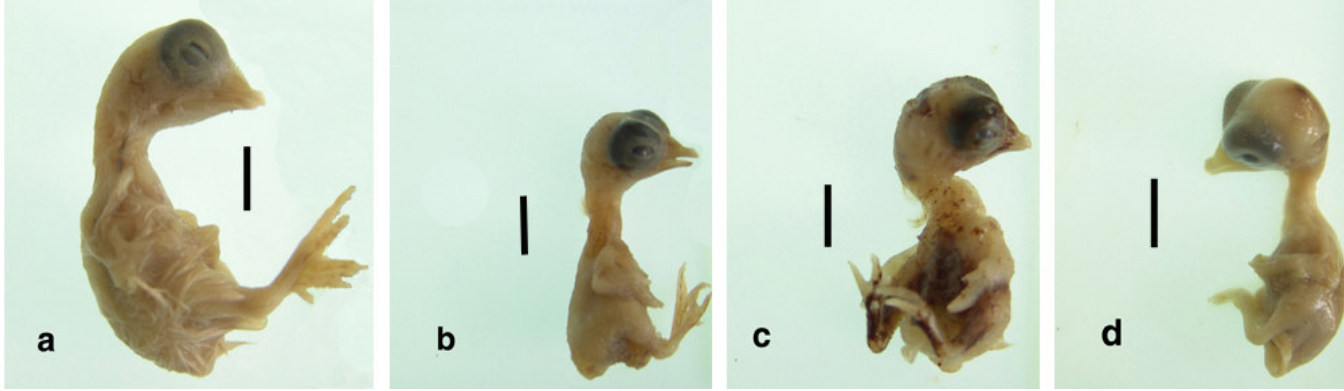
Şekil 2. Hamburger ve Hamilton (1951) skalasına (HH skalası) göre tavuk embriyosunun gelişim evreleri.



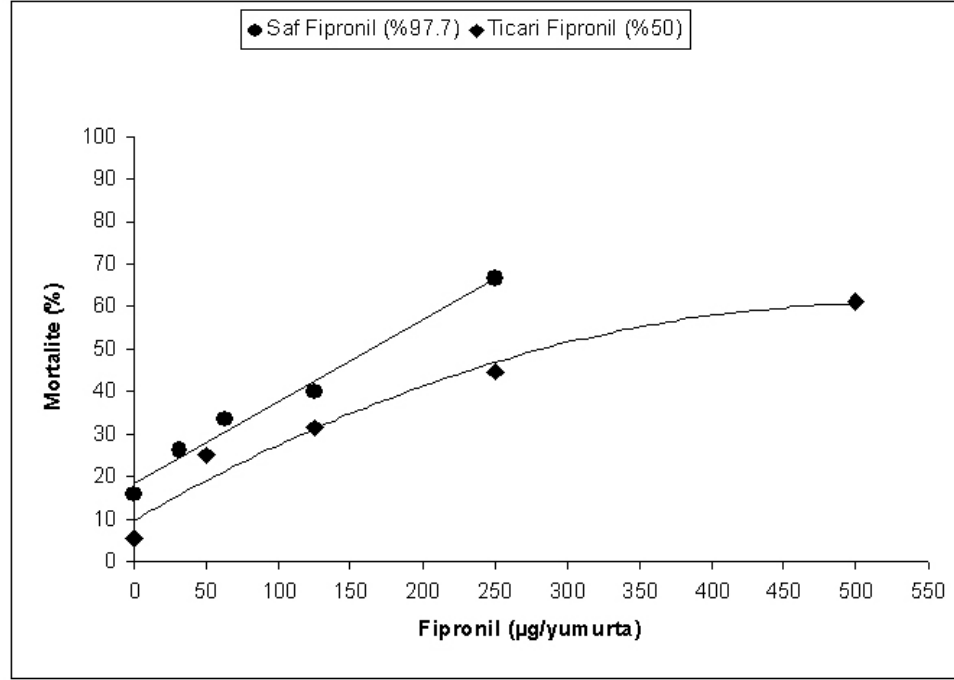
Şekil 2'nin devamı.



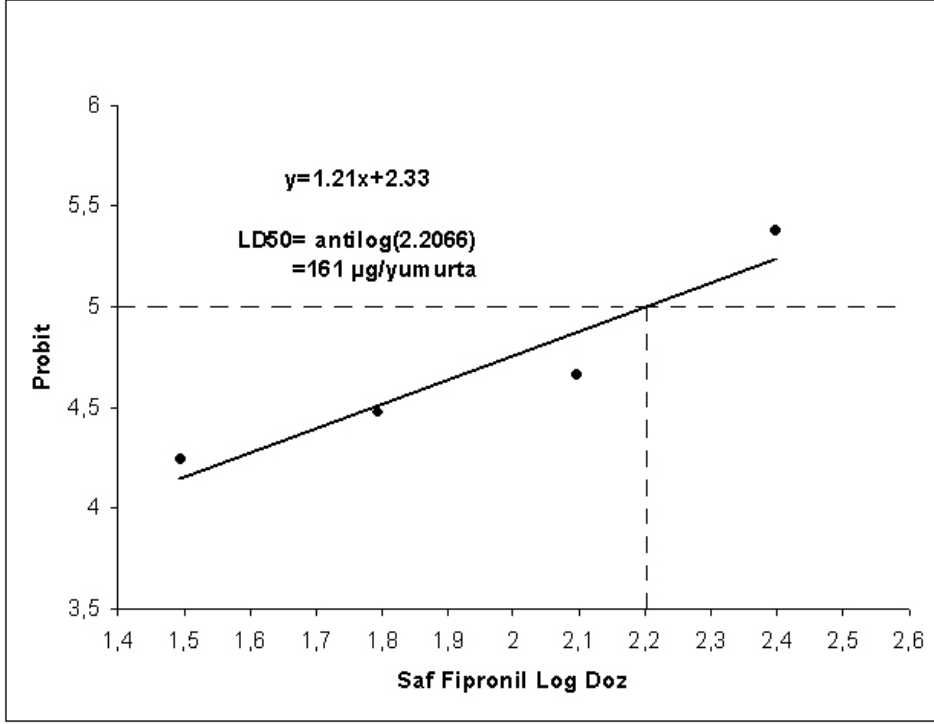
Şekil 3. Kuluçkanın 15. gününde a) kontrol grubundan bir embriyo b) 31.25 µg/yum saf fipronil grubundan iç organları dışa dönük, yapışık çift vücutlu embriyo c) 31.25 µg/yum saf fipronil grubundan boyun ve parmaklarda çarpıklık gözlenen embriyo d) 62.50 µg/yum saf fipronil grubundan aşırı ödemli bir embriyo e) 62.50 µg/yum saf fipronil grubundan boyunda hafif şişlik ve parmaklarda çarpıklık gözlenen embriyo f) 125 µg/yum saf fipronil grubundan bir kanadı gelişmeyen embriyo g) 125 µg/yum saf fipronil grubundan çift göz anormalliği ve çarpık gaga gözlenen embriyo h) 250 µg/yum saf fipronil grubundan tek göz anormalliği ve çarpık gaga gözlenen embriyo (Bar=1 cm).



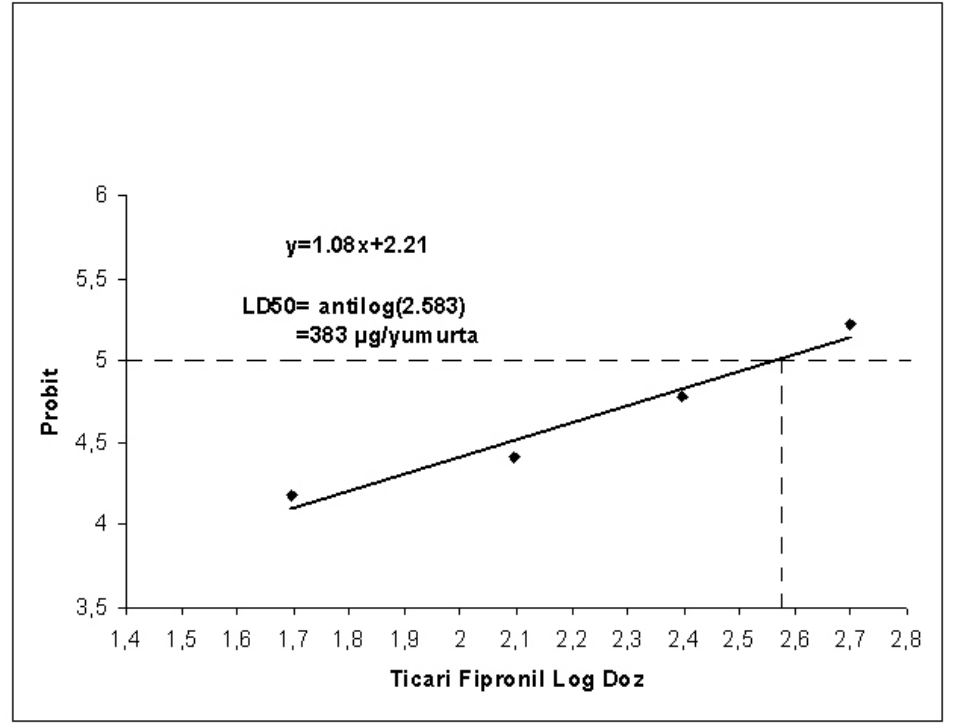
Şekil 4. Kuluçkanın 15. gününde a) kontrol grubundan bir embriyo b) 50 µg/yum ticari fipronil grubundan genel gelişme geriliği gözlenen embriyo c) 50 µg/yum ticari fipronil grubundan yaygın hemoraji gözlenen embriyo d) 125 µg/yum ticari fipronil grubundan baş bölgesinde fokal hemoraji gözlenen embriyo (Bar=1 cm).



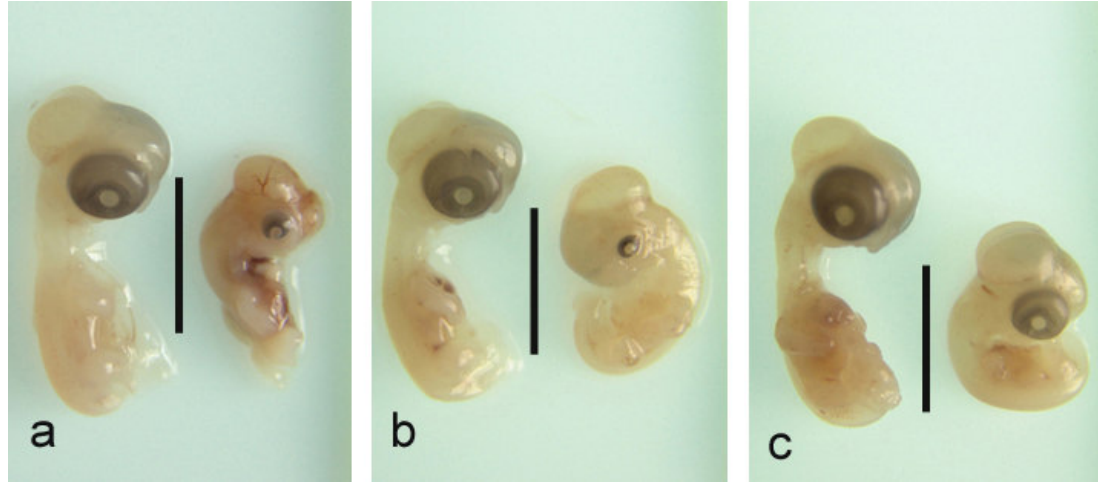
Şekil 5. Saf ve ticari fipronilin doz-cevap ilişkisi.



Şekil 6. Tavuk embriyolarında regresyon analizi ile saf fipronilin LD₅₀ değeri.



Şekil 7. Tavuk embriyolarında regresyon analizi ile ticari fipronilin LD₅₀ değeri.



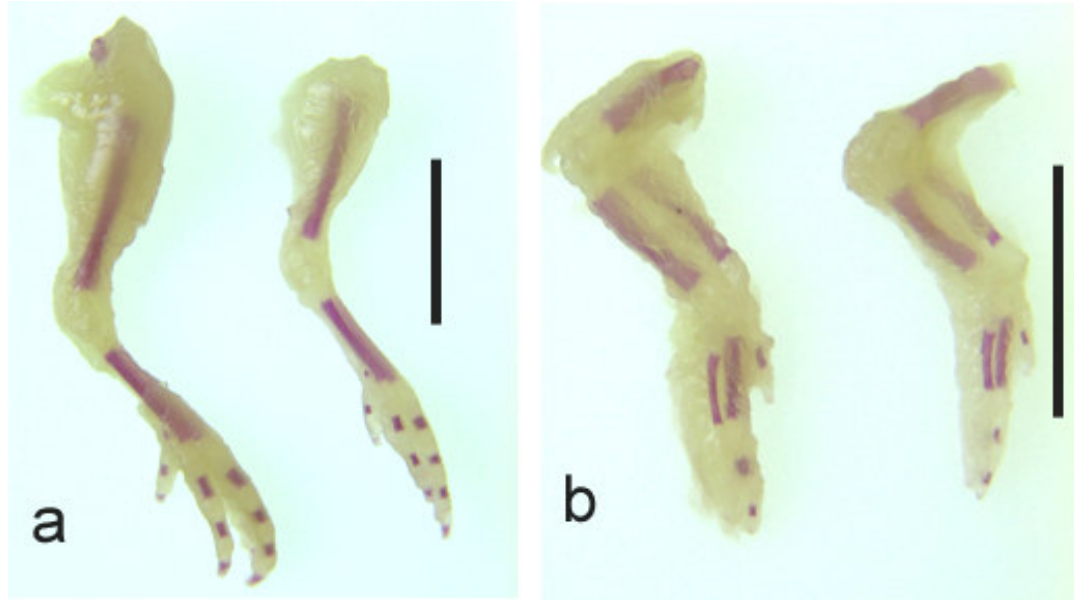
Şekil 8. Kuluçkanın 7. gününde a) kontrol grubundan bir embriyo (solda) ve 80.50 µg/yum saf fipronil grubundan genel gelişme geriliği, karın bölgesinde hemoraji ve çift göz anormalliği gözlenen embriyo (sağda) b) negatif kontrol grubundan bir embriyo (solda) ve 161 µg/yum saf fipronil grubundan tek göz anormalliği ve genel gelişim geriliği gözlenen embriyo (sağda) c) kontrol grubundan bir embriyo (solda) ve 40 ng/yum AFB₁ grubundan genel gelişme geriliği gözlenen embriyo (sağda) (Bar=1 cm).



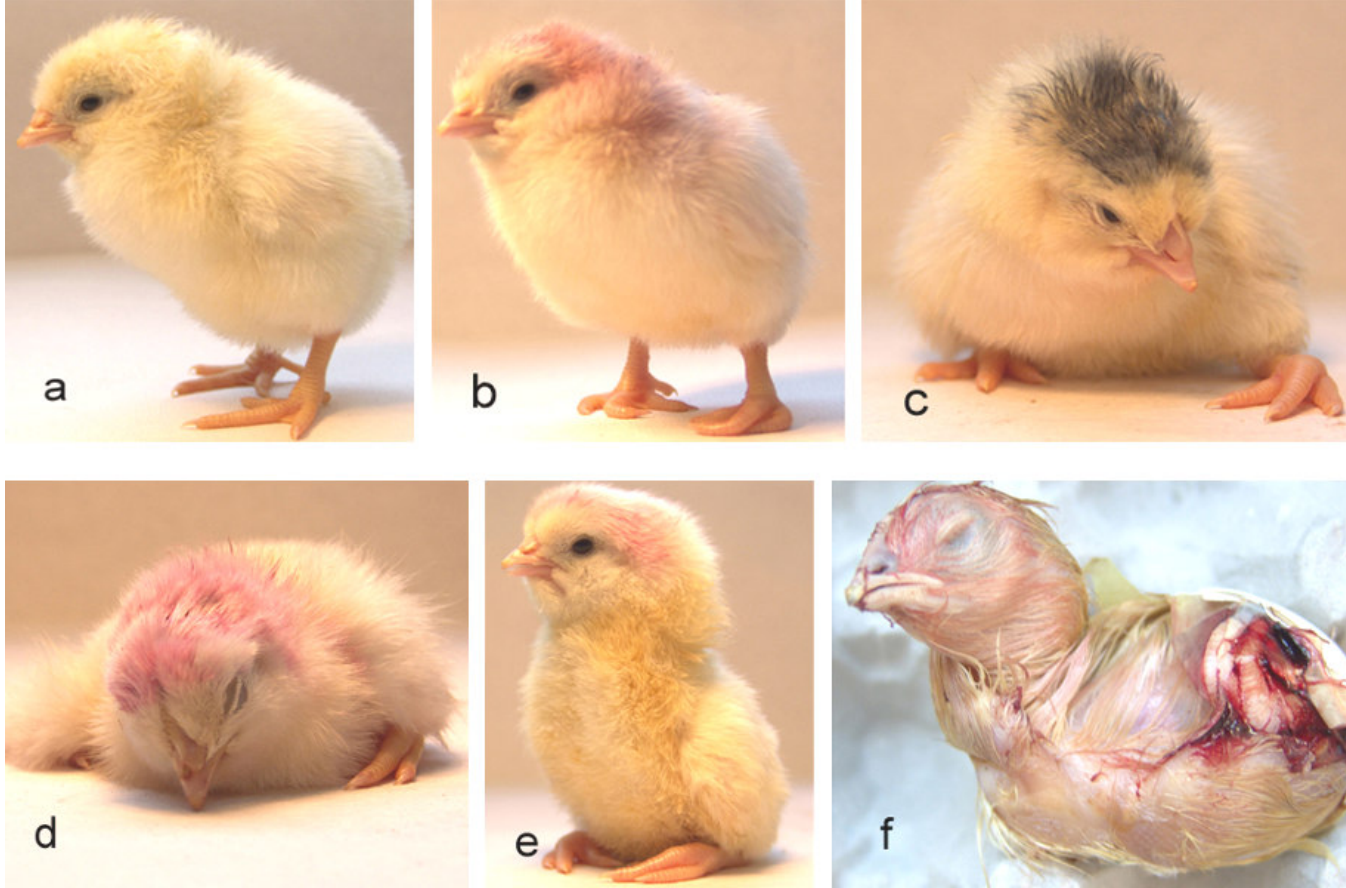
Şekil 9. Kuluçkanın 14. gününde kontrol grubundan bir embriyo (solda) ve 161 µg/yum saf fipronil grubundan genel gelişme geriliği gözlenen embriyo (sağda) (Bar=1 cm).



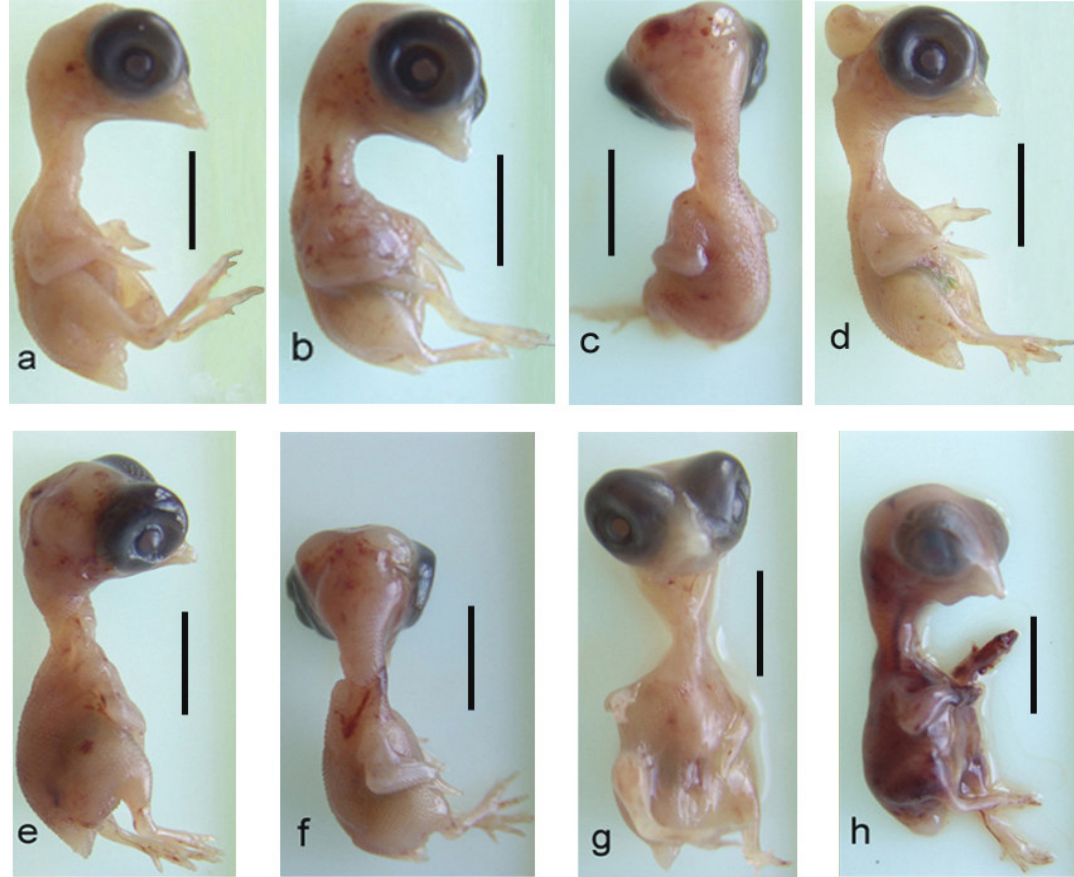
Şekil 10. Kuluçkanın 14. gününde total olarak Alizarin Red-S ile boyanmış kontrol grubundan bir embriyo (solda) ve 161 µg/yum saf fipronil grubundan iskelet gelişimi nispeten baskılanmış bir embriyo (sağda) (Bar=1 cm).



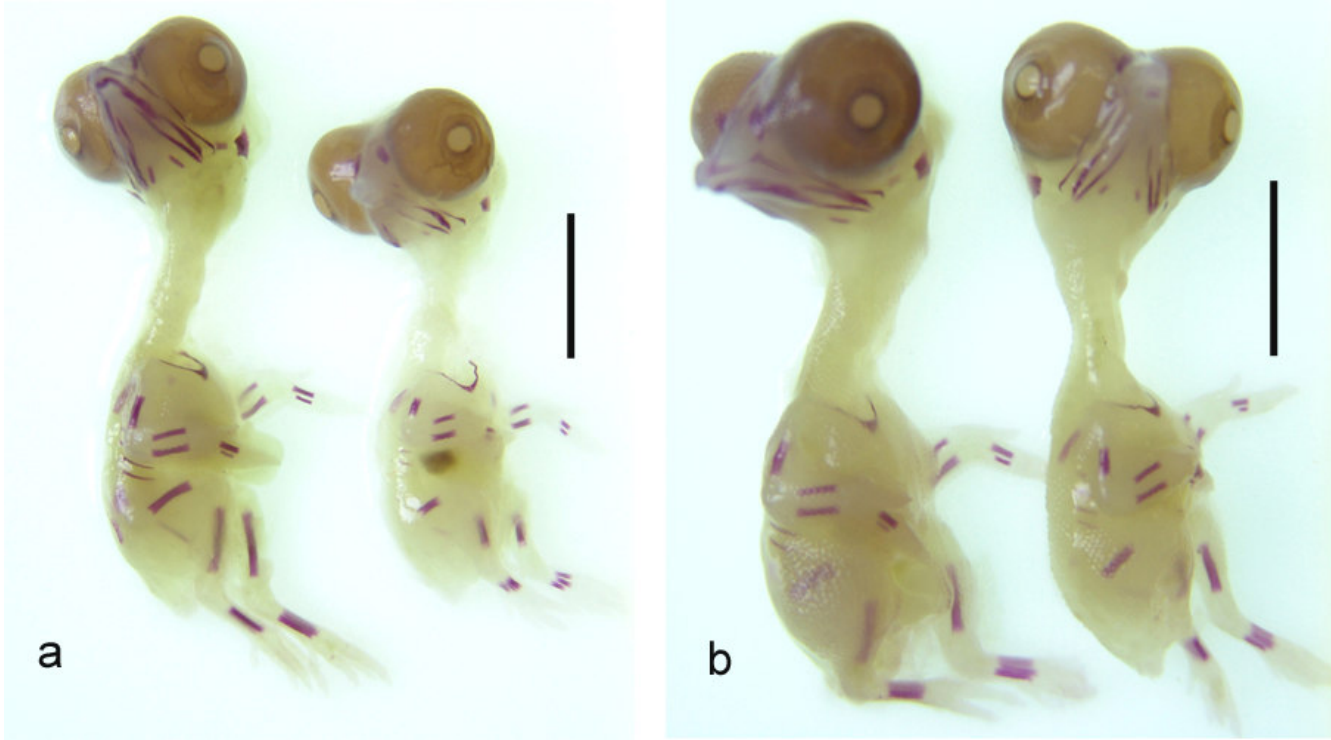
Şekil 11. Kuluçkanın 14. gününde Alizarin Red-S ile boyanmış a) negatif kontrol grubundan bir embriyonun arka üyesi (solda) ve 161 µg/yum saf fipronil grubundan kemik gelişimi nispeten baskılanmış bir embriyonun arka üyesi (sağda) b) negatif kontrol grubundan bir embriyonun ön üyesi (solda) ve 161 µg/yum saf fipronil grubundan kemik gelişimi nispeten baskılanmış bir embriyonun ön üyesi (sağda) (Bar=1 cm).



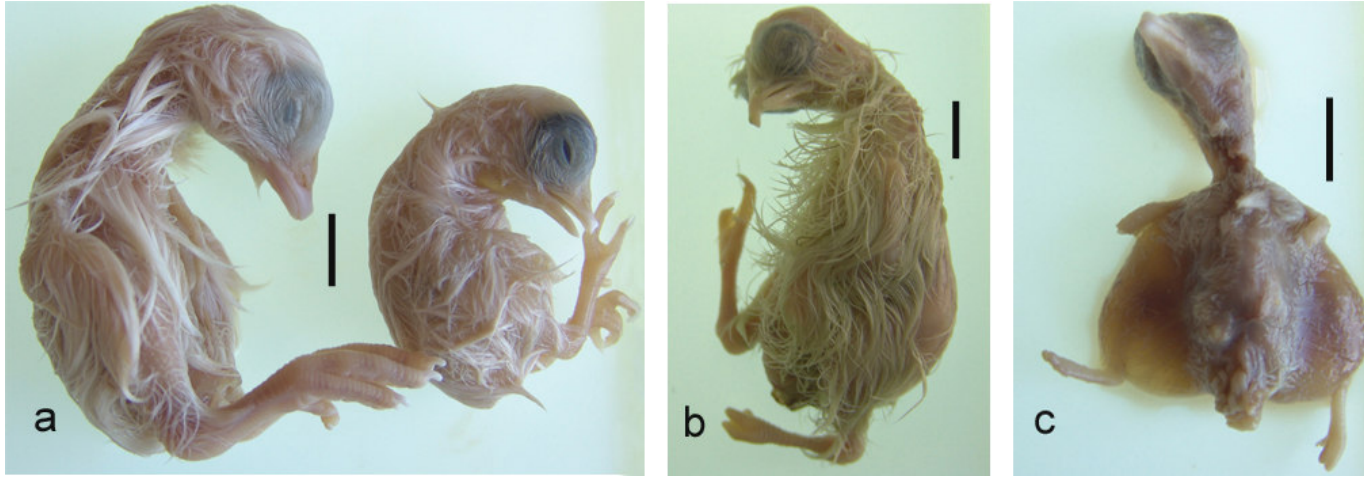
Şekil 12. Kuluçkadan çıkışın ikinci gününde a) kontrol grubundan bir civciv b) 40.25 µg/yum saf fipronil grubundan parmakları çarpık bir civciv c) 161 µg/yum saf fipronil grubundan parmakları çarpık ve ayakta duramayan bir civciv d) 40 ng/yum AFB₁ grubundan parmakları çarpık ve ayakta duramayan bir civciv e) 80 ng/yum AFB₁ grubundan parmakları çarpık bir civciv f) Gelişimini tamamlamasına rağmen kabuk altı ölümü gerçekleşen bir civciv.



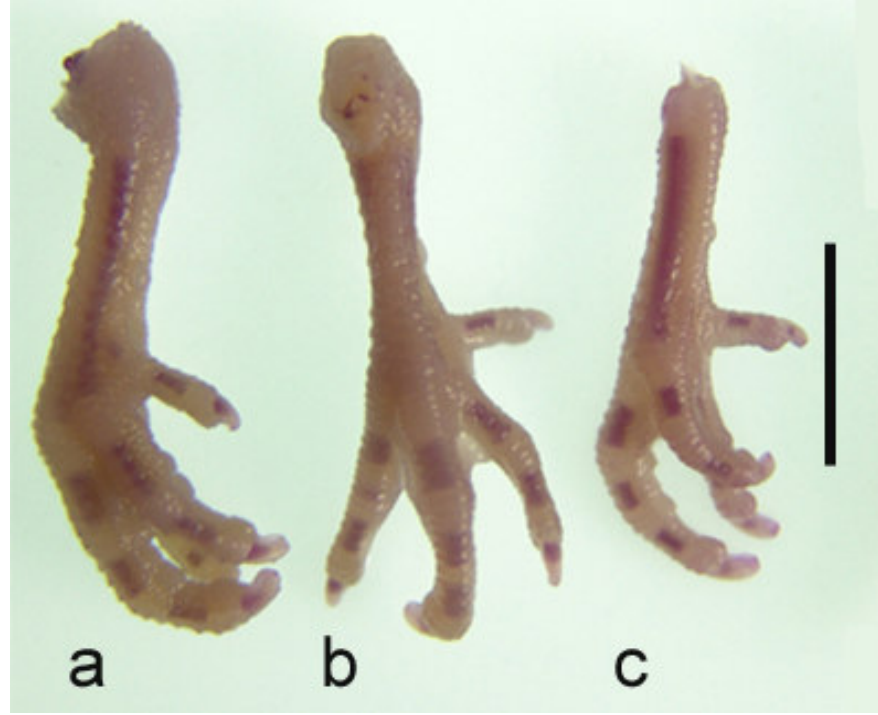
Şekil 13. Kuluçkanın 11. gününde a) kontrol grubundan bir embriyo b) 40.25 µg/yum saf fipronil grubundan hafif hemoraji gözlenen embriyo c) 80.50 µg/yum saf fipronil grubundan hafif hemoraji gözlenen embriyo d) 161 µg/yum saf fipronil grubundan beyni dışarı gelişen embriyo e) 80 ng/yum AFB₁ grubundan hafif hemoraji gözlenen embriyo f) 50 µg/yum CP grubundan hafif hemoraji gözlenen embriyo g) 250 µg/yum CP grubundan hafif ödemli embriyo h) 500 µg/yum CP grubundan aşırı hemoraji gözlenen embriyo (Bar=1 cm).



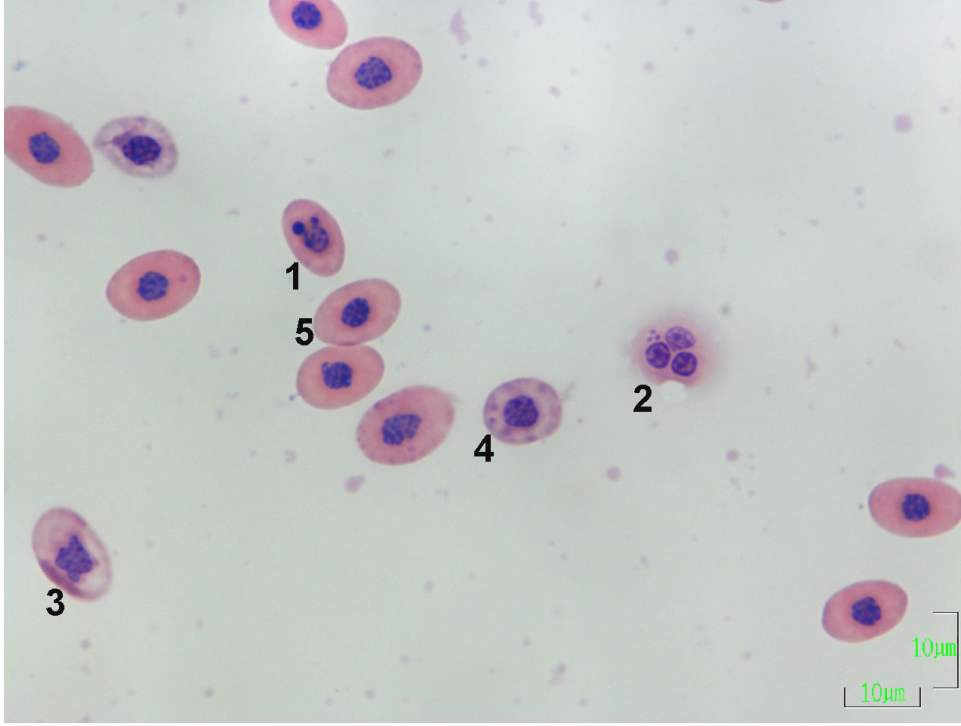
Şekil 14. Kuluçkanın 11. gününde total olarak Alizarin Red-S ile boyanmış a) kontrol grubundan bir embriyo (solda) ve 161 µg/yum saf fipronil grubundan iskelet gelişimi baskılanmış embriyo (sağda) b) negatif kontrol grubundan bir embriyo (solda) ve 80.50 µg/yum saf fipronil grubundan iskelet gelişimi baskılanmış embriyo (sağda) (Bar=1 cm).



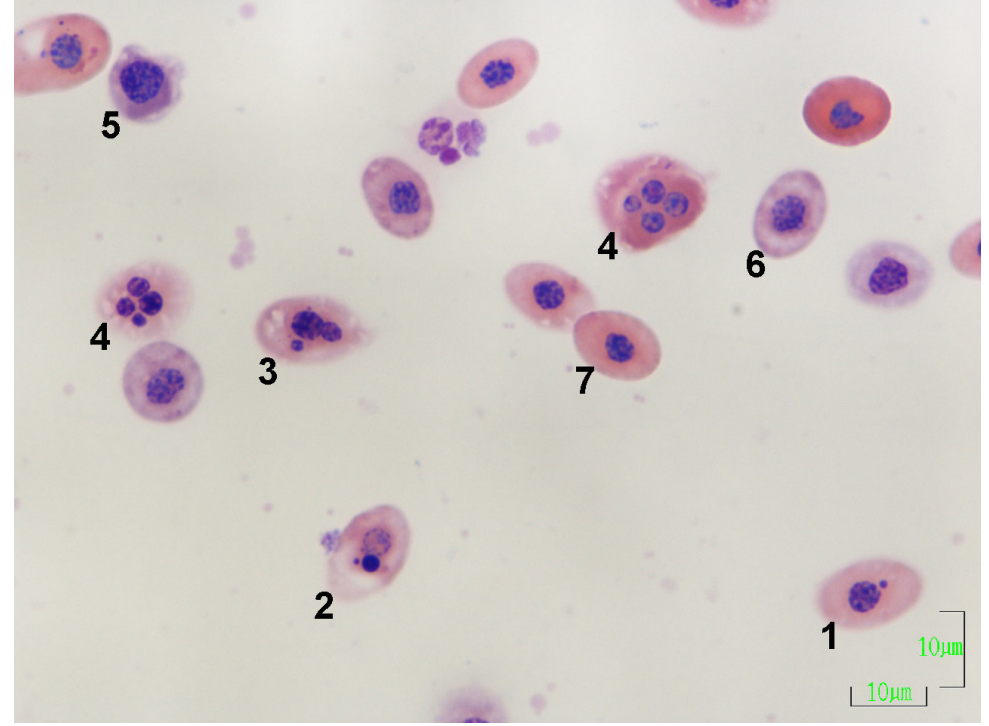
Şekil 15. Kuluçkanın 18. gününde a) kontrol grubundan bir embriyo (solda) ve 161 µg/yum saf fipronil grubundan ayak parmakları çarpık ve genel gelişme geriliği gözlenen embriyo (sağda) b) 161 µg/yum saf fipronil grubundan ayak parmakları çarpık ve çapraz gaga gözlenen embriyo c) 161 µg/yum saf fipronil grubundan tek göz anormalliği ve aşırı ödem gözlenen embriyo (Bar=1 cm).



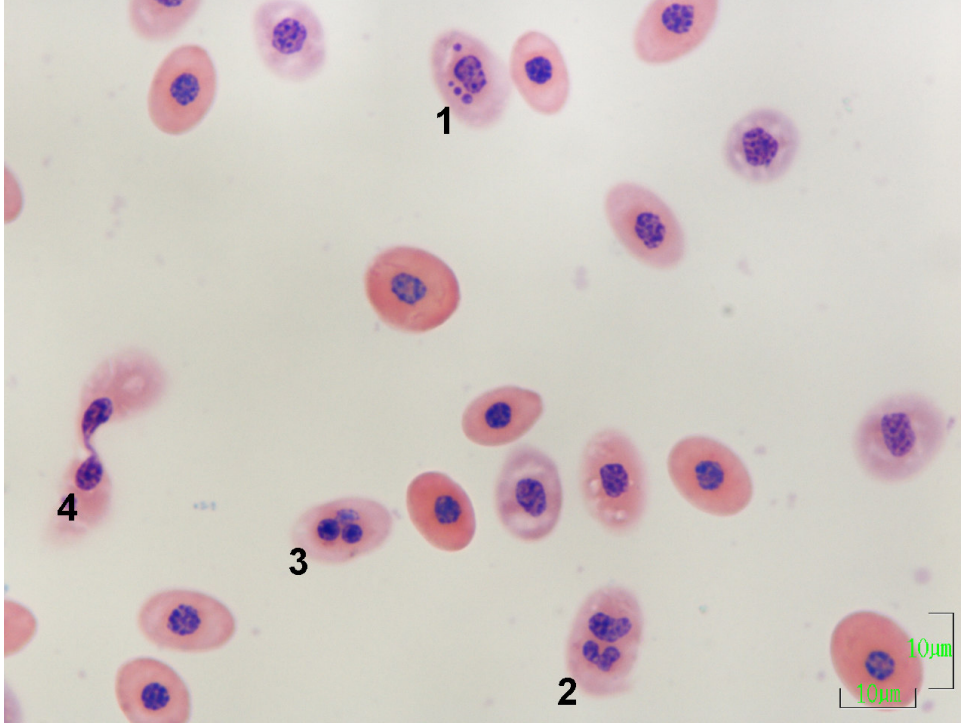
Şekil 16. Kuluçkanın 18. gününde Alizarin Red-S ile boyanmış a) kontrol grubundan bir embriyonun arka üyesi b) negatif kontrol grubundan bir embriyonun arka üyesi c) 80.50 µg/yum saf fipronil grubundan kemik gelişimi nispeten baskılanmış bir embriyonun arka üyesi (Bar=1 cm).



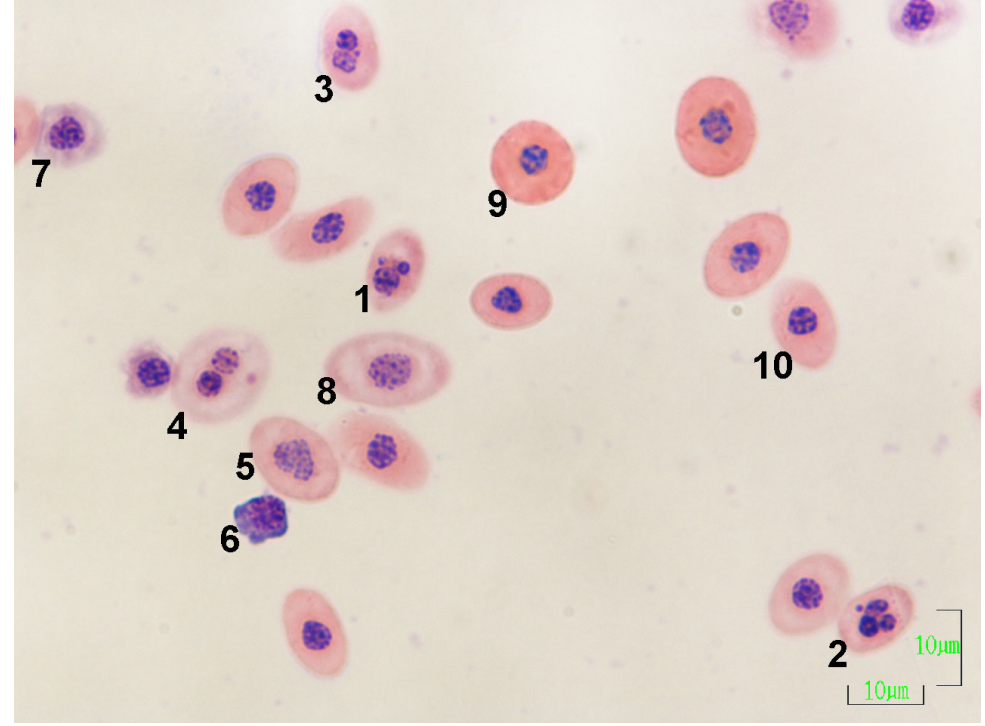
Şekil 17. Kuluçkanın 11. gününde periferel kandan hazırlanan ve modifiye May-Grünwald Giemsa ile boyanan frotideki alyuvarlarda gözlenen mikronukleus (MN) ve çekirdek anormallikleri ile hücre tipleri 1) çift MN 2) çok sayıda çekirdek ve çok sayıda MN birlikte 3) loblu çekirdek 4) orta-polikromatik alyuvar 5) normokromatik alyuvar (Bar=10 μm).



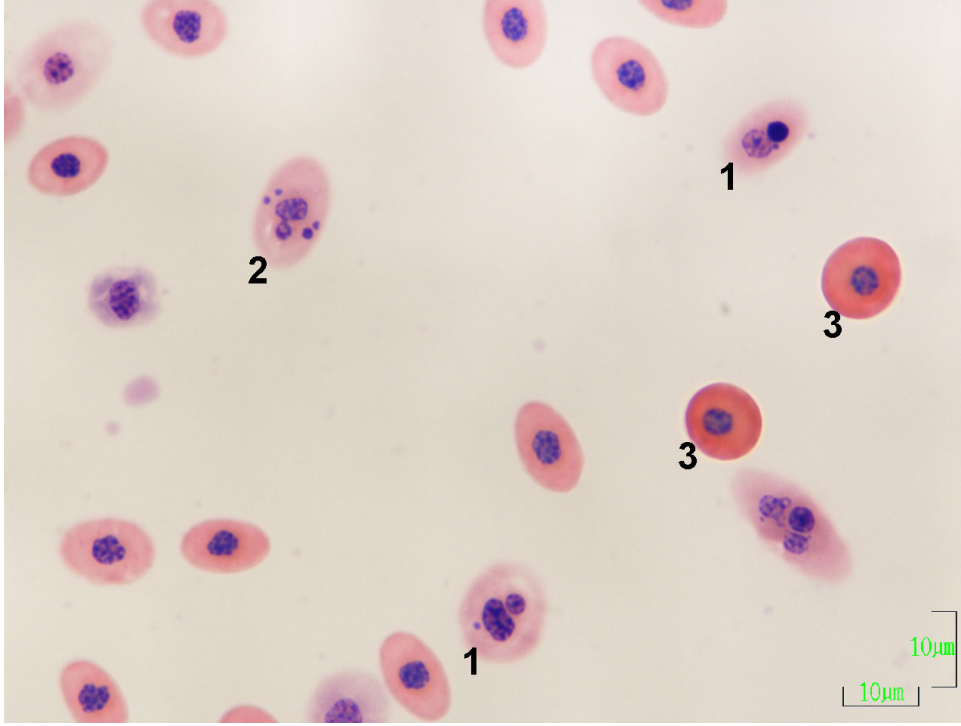
Şekil 18. Kuluçkanın 11. gününde periferel kandan hazırlanan ve modifiye May-Grünwald Giemsa ile boyanan frotideki alyuvarlarda gözlenen mikronukleus (MN) ve çekirdek anormallikleri ile hücre tipleri 1) MN 2) büyük ve küçük MN birlikte 3) tomurcuklu çekirdek ve MN birlikte 4) çok sayıda çekirdek ve MN birlikte 5) orta-polikromatik alyuvar 6) geç-polikromatik alyuvar 7) normokromatik alyuvar (Bar=10 μm).



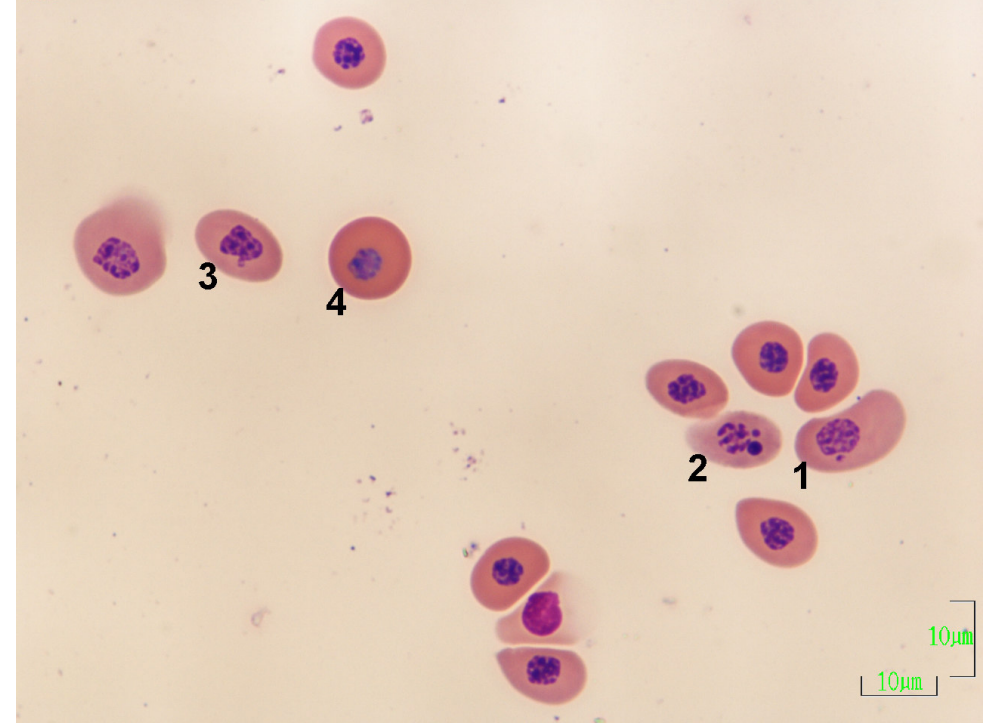
Şekil 19. Kuluçkanın 11. gününde periferel kandan hazırlanan ve modifiye May-Grünwald Giemsa ile boyanan frotideki alyuvarlarda gözlenen mikronukleus (MN) ve çekirdek anormallikleri ile hücre tipleri. 1) çok sayıda MN 2) çift çekirdek ve çekirdeklerden biri çentikli 3) çok sayıda çekirdek 4) amitoz bölünme geçirmekte olan alyuvar (Bar=10 µm).



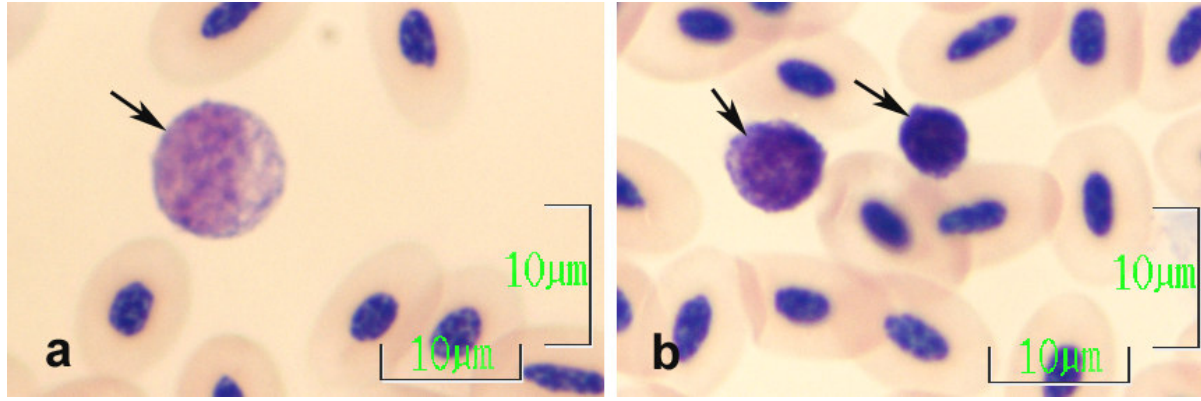
Şekil 20. Kuluçkanın 11. gününde periferel kandan hazırlanan ve modifiye May-Grünwald Giemsa ile boyanan frotideki alyuvarlarda gözlenen mikronukleus (MN) ve çekirdek anormallikleri ile hücre tipleri 1) çift MN 2) büyük ve küçük MN ile loblu çekirdek birlikte 3) çift çekirdek ve MN birlikte 4) çift çekirdek 5) çentikli çekirdek 6) erken-polikromatik alyuvar 7) orta-polikromatik alyuvar 8) geç-polikromatik alyuvar 9) primitif normokromatik alyuvar 10) normokromatik alyuvar (Bar=10 µm).



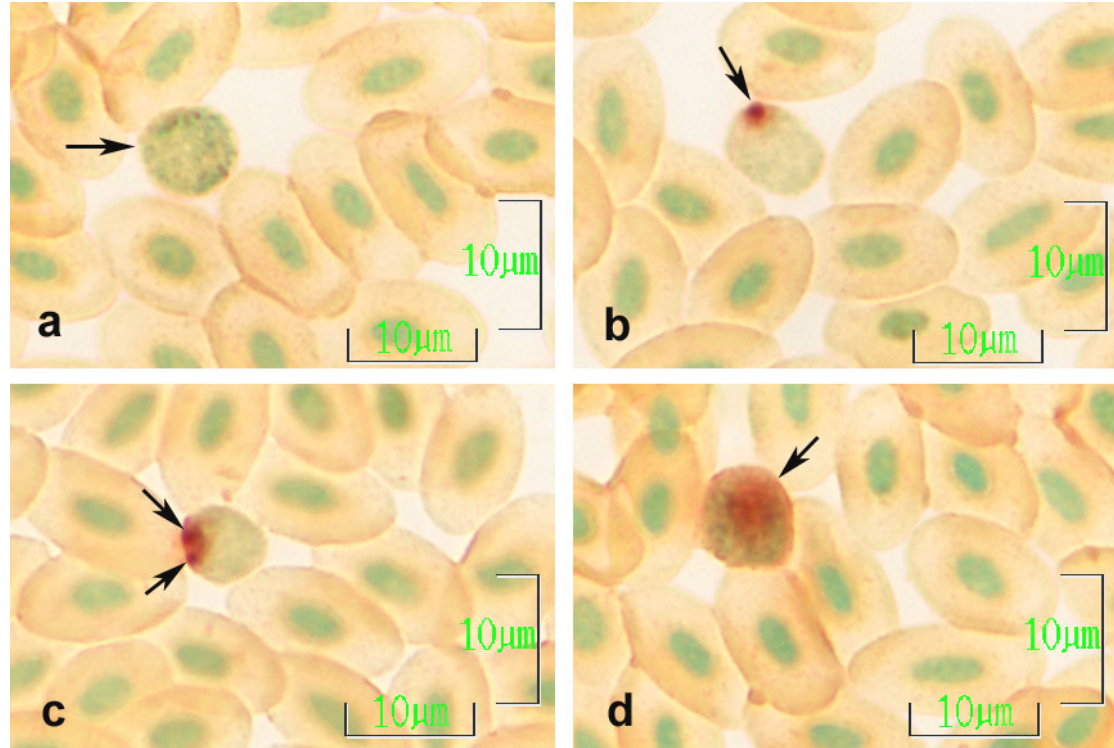
Şekil 21. Kuluçkanın 11. gününde periferal kandan hazırlanan ve modifiye May-Grünwald Giemsa ile boyanan frotideki alyuvarlarda gözlenen mikronukleus (MN) ve çekirdek anormallikleri ile hücre tipleri. 1) büyük ve küçük MN'ler birlikte 2) çok sayıda MN ve tomurcuklu çekirdek 3) primitif normokromatik alyuvar (Bar=10 µm).



Şekil 22. Kuluçkanın 11. gününde periferal kandan hazırlanan ve modifiye May-Grünwald Giemsa ile boyanan frotideki alyuvarlarda gözlenen mikronukleus (MN) ve çekirdek anormallikleri ile hücre tipleri. 1) MN 2) çift MN ve ana çekirdekte karyoreksis (muhtemelen hücre ölümüne bağlı) görülmekte 3) çentikli veya tomurcuklu çekirdek 4) primitif normokromatik alyuvar (Bar=10 µm).



Şekil 23. 10 günlük civcivlerden alınan kan örneklerinden hazırlanan ve May-Grünwald Giemsa ile boyanan frotilerdeki lenfositler a) büyük tip lenfosit b) orta ve küçük tip lenfositler (Bar=10 µm).



Şekil 24. 10 günlük civcivlerden alınan kan örneklerinden hazırlanan frotilere uygulanan ANAE enzim demonstrasyonu a) ANAE(-) lenfosit b) tek granüllü ANAE(+) lenfosit c) çift granüllü ANAE(+) lenfosit d) sitoplazması diffüze bir pozitivite gösteren monosit (Bar=10 µm).