

FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ ASETONUN EMBRİYOTOKSİK ETKİLERİNİN TAVUK YUMURTASI TESTİYLE BELİRLENMESİ

Haluk ÖZPARLAK¹, İlhami ÇELİK², Emrah SUR², Tuğba TELATAR²,
Mehmet Faruk AYDIN³, Yasemin ÖZNURLU²

¹Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 42100,
Konya.

²Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim
Dalı, 42100, Konya.

³Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim
Dalı, 63300, Şanlıurfa.

ÖZET

Bu çalışmada, iyi bir organik çözücü olan asetonun farklı konsantrasyonlarının embriyotoksitesite dömlü tavuk yumurtaları kullanılarak araştırıldı. Bu amaçla, dört farklı konsantrasyondaki (%30, %50, %70 ve %100 v/v) aseton solüsyonu (20 µl/yumurta) kuluçka başlangıcında yumurtalara hava kamerası yoluyla enjekte edildi. Yumurtalar kuluçkanın 8½ gününde açılarak grupların ölü ve anormal embriyo sayıları, malformasyon tipleri, canlı ve rölatif embriyo ağırlıkları ile embriyoların tepe-kıç boyları (Crown-Rump Length, CRL) tespit edildi. %70 ve %100'lük aseton gruplarında mortalite sırasıyla %22.22 ve %21.05 olarak gerçekleşti ve kontrol grubundan önemli derecede yüksek bulundu ($p<0.05$). Bununla birlikte %50'lik aseton grubunun rölatif embriyo ağırlığı dışında, kontrol ve deney gruplarının anormal embriyo oranları, canlı ve rölatif embriyo ağırlıkları ile embriyoların CRL değerleri arasındaki farklar istatistiksel öneme sahip değildi ($p>0.05$). Elde edilen bulgulara dayanılarak; asetonun özellikle düşük konsantrasyonlarının sahip olduğu düşük yan etkileri sebebiyle, dömlü tavuk yumurtası kullanılarak yapılacak olan embriyotoksitesite, teratojenite, mutajenite ve genotoksitesite çalışmalarında tercih edilebilecek bir çözücü olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Aseton, Çözücü, Tavuk Embriyosu, Embriyotoksitesite.

EMBRYOTOXICITY OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF ACETONE BY MEANS OF HEN'S EGG TEST

ABSTRACT

In this study, embryotoxic effects of different concentrations of acetone, a good solvent, were investigated by using fertilized hen's eggs. For this purpose, four different (30%, 50%, 70% and 100% v/v) acetone solutions (20 µl/egg) were injected into the eggs via air cell at the beginning of the incubation. The eggs were opened on the day 8½ of the incubation. Dead and abnormal embryo numbers, malformation types, both live and relative embryo weights and crown-rump lengths (CRL) of the embryos of each group were determined. Mortality values of 70% and 100% acetone groups were 22.22% and 21.05% respectively and the values were significantly higher than that of the control group ($p<0.05$). However, abnormal embryo rates, live and relative embryo weights and embryo CRL values were not statistically significant between the control and the acetone groups ($p>0.05$) except for relative embryo weights of 50% acetone group. Based on the results, it was concluded that low concentrations of acetone especially could be used as a solvent in chick embryotoxicity, teratogenicity, mutagenicity and genotoxicity experiments since it has weak side effects.

Key Words: Acetone, Solvent, Chick Embryo, Embryotoxicity.

1. GİRİŞ

Kanatlı embriyoları ve özellikle de tavuk embriyosu ilaçlar, gıda katkı maddeleri, endüstriyel bileşikler, ağır metaller, mikotoksinler, pestisitler ve diğer kimyasal maddelerin embriyotoksik, mutajenik, teratojenik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesinde önemli bir test materyali olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla Jelinek [1] dömlü tavuk yumurtası kullanarak Tavuk Embriyotoksitesisi Belirleme Testini (Chicken Embryotoxicity Screening Test, CHEST), Kemper ve Luepke [2] Tavuk Yumurtası Testini (Hen's Eggs Test, HET), Nishigori ve ark. [3] Dömlü Tavuk Yumurtası Belirleme Testini (Hen's Fertile Egg Screening Test, HEST) ve Wolf ve Luepke [4] Mikronukleus İndüksiyonu için Tavuk Yumurtası Testini (Hen's Egg Test for Micronucleus Induction, HET-MN) geliştirmişlerdir. Bu yöntemlerin ve modifikasyonlarının uygulandığı çalışmalarda, test edilecek maddelerin uygun çözücülerde çözdürülmeleri gerekir. Çözücü olarak fizyolojik su, bidistile su, %30'luk etil alkol, %10'luk dimetilsülfoksit (DMSO), ayçiçeği yağı ve %1'lik karboksimetilselüloz (CMC) kullanılmakla birlikte [5], test edilecek bazı aktif maddeler belirtilen çözücülerde iyi çözünmemektedir. Bu sebeple iyi bir çözücü olan asetonun

kullanımı, özellikle pestisit aktif maddeleriyle yapılacak olan çalışmalarda iyi bir alternatif olabilir.

Bu çalışmada, asetonun farklı konsantrasyonlarının tavuk embriyolarının erken dönem gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ve bu bağlamda asetonun tavuk embriyotoksisite, teratojenite, mutajenite ve genotoksisite çalışmalarında çözücü olarak kullanımının uygun olup olmadığının ortaya konması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada Bahri Dağdaş Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünden temin edilen kahverengi yumurtacı (*ATE-K*) damızlıklara ait, 55 ± 2 g ağırlığındaki dömlü kuluçkalık yumurtalar kullanıldı. Yumurtalar enjeksiyon saatine kadar yaklaşık 18°C 'de üç gün süreyle depolandı. Her yumurta enjeksiyondan önce tartıldı ve kapalı bir kabinde 21 g potasyumpermanganat+42 ml formaldehit/ m^3 karışımıyla elde edilen buharla 15 dk dezenfekte edildi. Her grupta 20 yumurta bulunan altı deney grubu oluşturuldu. Kontrol grubu olan birinci gruptaki yumurtalara hiçbir işlem uygulanmadı. Diğer gruplardaki yumurtaların küt uçları enjeksiyondan önce %96'lık etil alkollü pamukla silindi ve özel yumurta delicisi ile delindi. İkinci gruptaki yumurtalara hava kamarası yoluyla steril bidistile su, üçüncü gruba %30'luk aseton, dördüncü gruba %50'lik aseton, beşinci gruba %70'lik aseton, altıncı gruba da %100'lük (saf) aseton, 20 μl hacminde steril uçlu mikropipetle (*Eppendorf*) enjekte edildi. Delikler derhal sıvı parafinle kapatıldı. Aseton solüsyonları stok asetonun (*Carlo Erba*) steril bidistile su ile sulandırılmasıyla hazırlandı. Enjeksiyonlar steril şartlar altında laminar flow kabinde gerçekleştirildi. Takiben yumurtalar 37.5°C 'de, %65 nisbi neme sahip kuluçka makinesinde (*VGS*) ilk bir saat test solüsyonlarının diffüze olabilmesi için dik konumda bekletildikten sonra, her iki saatte bir kez 180° çevrilerek inkübe edildi.

Yumurtalar inkübatöre yerleştirilmelerinden $8\frac{1}{2}$ gün sonra tartıldı. Embriyolar canlı olup olmadıklarının belirlenmesini takiben ekstraembriyonik keselerinden ayrılarak tartıldılar. Tepe-kıç mesafesi (Crown-Rump Length, CRL) saat başlı bir kumpasla ölçülen embriyoların gelişme evreleri Hamburger ve Hamilton [6] skalasına (HH skalası) göre belirlendi. Çeşitli malformasyonlar ve gelişme geriliklerinin tespiti için %10'luk nötr formalinde 4°C 'de saklanan canlı ve ölü embriyolar daha sonra çıplak göz ve stereo mikroskop yardımıyla incelenerek gerekli görülenlerin fotoğrafları çekildi. Genel gelişme geriliği sadece canlı embriyolarda dikkate alındı. Rölatif embriyo ağırlığı aşağıdaki formülle hesaplandı.

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

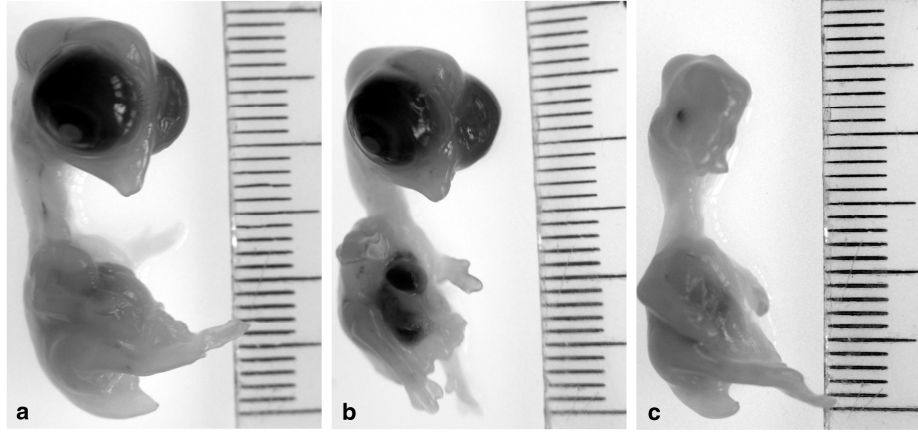
Kontrol grubu ve diğer grupların anormal embriyo oranları ve mortaliteleri t-testiyle (bağımsız iki grup oran testi) karşılaştırıldı [7]. Kontrol grubu ve diğer gruplara ait canlı embriyo ve rölatif embriyo ağırlıkları ile embriyo CRL değerleri için nonparametrik Kruskal-Wallis testi uygulandı. Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki farkların belirlenmesi için bu teste ait ikili karşılaştırmalar yapıldı [8].

3. BULGULAR

Yumurtaların kuluçka sürecinde günlük ağırlık kaybı kontrol grubunda ortalama %0.60, tüm yumurtaların infertilite oranı ise %4.16 olarak tespit edilmiştir.

Grupların infertil ve fertil yumurta sayıları, anormal ve ölü embriyo sayıları ile infertilite hariç anormal embriyo oranı ve mortalite değerleri Tablo 1’de verilmiştir. Kontrol grubu embriyolarının (Şekil 1a) ve deney gruplarındaki canlı ve anomali göstermeyen embriyolarının gelişimi kuluçkanın 8½ gün sonrasında HH skalasına uygun olarak 35. evrede gerçekleşmiştir. Tablo 1’de görüldüğü gibi aseton gruplarında görülen anomalilerin sıklığı kontrol grubundan önemli düzeyde fark göstermemektedir ($p>0.05$). Kontrol, bidistile saf su, %30 ve %100’lük aseton gruplarında herhangi bir anomali gözlenmezken, %70’lik aseton uygulanan grupta bir embriyoda göğüs ve karın bölgesinde fokal hemoraji (odaksal kanama) (Şekil 1b), %50’lik aseton uygulanan grupta bir embriyoda bilateral mikroftalmi (çift göz anormalliği), makas gaga ve genel gelişme geriliği (Şekil 1c), bir embriyoda ise sadece genel gelişme geriliği gözlenmiştir. %30 ve %50’lik aseton gruplarının mortaliteleri kontrol grubundan istatistiksel olarak fark göstermezken ($p>0.05$), %70 ve %100’lük aseton gruplarının mortaliteleri önemli derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 1).

Ölü embriyoların HH skalasına göre gelişme evreleri dağılımı Tablo 2’de gösterilmiştir. Deney gruplarındaki tüm ölümlerin ilk 29 evrede, diğer bir deyişle kuluçkanın ilk altı gününde gerçekleştiği saptanmıştır. %70 ve %100’lük aseton gruplarındaki embriyonik ölümlerin HH-26. evrede (kuluçkanın 4½-beşinci günü) yoğunlaştığı dikkati çekmiştir (Tablo 2).



Şekil 1. a) Kontrol grubundan bir embriyo, b) %70'lik aseton grubundan karın ve göğüs bölgelerinde fokal hemorajiler bulunan embriyo, c) %50'lik aseton grubunda bilateral mikroftalmi, makas gaga ve belirgin genel gelişme geriliği bulunan embriyo.

Gruplardaki normal embriyoların ortalama canlı ve rölatif embriyo ağırlıkları ile CRL değerleri Tablo 3'de verilmiştir. Özellikle %30 ve %50'lik aseton gruplarının ortalama canlı ve rölatif embriyo ağırlıkları kontrol grubuna kıyasla düşük olmasına rağmen, sadece %50'lik aseton grubunun ortalama rölatif embriyo ağırlığı kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli fark göstermiştir ($p<0.05$). Ortalama CRL değerleri de aseton gruplarında kontrol grubuna oranla düşük olmakla birlikte, aralarındaki farklılıkların önemsiz olduğu saptanmıştır ($p>0.05$).

Tablo 1. Gruplarda tespit edilen infertil ve fertil yumurta, anormal ve ölü embriyo sayıları ile infertilite hariç anormal embriyo oranı ve mortalite değerleri.

Gruplar	İnfertil yumurta sayısı	Fertil yumurta sayısı	Anormal embriyo sayısı	Anormal embriyo oranı (%)*	Ölü embriyo sayısı	Mortalite (%)
Kontrol	0	20	0	0.00	0	0.00
Bidistile saf su	1	19	0	0.00	0	0.00
%30 aseton	1	19	0	0.00	2	10.53
%50 aseton	0	20	2	10.00	2	10.00
%70 aseton	2	18	1	5.56	4	22.22**
%100 aseton	1	19	0	0.00	4	21.05**

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

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

Tablo 2. Embriyonik ölümlerin HH skalasına göre dağılımları.

Gruplar	HH Skalasına Göre Evreler			
	HH-15	HH-20	HH-26	HH-29
%30 aseton (n=2)	1	-	1	-
%50 aseton (n=2)	1	1	-	-
%70 aseton (n=4)	1	-	3	-
%100 aseton (n=4)	-	1	2	1

Tablo 3. Gruplara ait normal embriyoların ortalama canlı ve rölatif embriyo ağırlıkları ile CRL değerleri.

Gruplar	Canlı embriyo ağırlığı (g)	Rölatif embriyo ağırlığı (g)	CRL (mm)
	$\bar{x} \pm S.S.^*$	$\bar{x} \pm S.S.$	$\bar{x} \pm S.S.^{***}$
Kontrol (n=20)	1.29±0.14	2.50±0.27	27.91±1.40
Bidistile saf su (n=19)	1.31±0.16	2.55±0.33	27.55±1.91
%30 aseton (n=17)	1.22±0.13	2.35±0.24	26.85±1.93
%50 aseton (n=16)	1.21±0.11	2.34±0.20**	26.80±1.76
%70 aseton (n=13)	1.27±0.17	2.45±0.31	26.85±2.07
%100 aseton (n=15)	1.25±0.15	2.45±0.31	27.09±2.34

*Canlı embriyo ağırlığı bakımından gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemsizdir (Kruskal-Wallis=9.286, $p>0.05$)

**Kontrol grubu ile aradaki fark istatistiksel olarak önemlidir (Kruskal-Wallis=12.671, $p<0.05$)

***CRL değerleri bakımından gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemsizdir (Kruskal-Wallis=5.246, $p>0.05$)

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada kontrol grubu yumurtalarında kuluçka boyunca oluşan ağırlık kaybı önerilen oranlara [9] yakındır. Bu durum kuluçka şartlarının optimal olduğunu göstermektedir.

Tavuk embriyoları üzerinde yapılan embriyotoksosite çalışmalarında test edilecek maddenin yumurtaya verilisinde hava kamarasına, albümine ve yumurta sarısına enjeksiyon yöntemleri denenmiş, bu çalışmada hava kamarasına enjeksiyon yöntemi tercih edilmiştir. Uygulama kolaylığı,

sterilizasyon işleminin kolay olması, verilen solüsyonun homojen ve hızlı bir şekilde diffüze olması ve diğer yöntemlerde söz konusu olan yumurta içi basınçtaki artışın embriyoda meydana getirebileceği mekanik hasarları ortadan kaldırdığı için hava kamarası yöntemi ideal kabul edilmektedir [10].

Enjeksiyon zamanı için, test edilecek maddenin embriyotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanıyorsa erken embriyonik dönem, test edilen maddenin karaciğerde metabolize edilmesi sonucu oluşacak metabolitlerinin etkilerinin belirlenmesi amaçlanıyorsa geç dönemde yapılacak enjeksiyonun tercih edilmesi gerektiği bildirilmiştir [11,12]. Gıda katkı maddeleri ve pestisitlerin teratojenik etkilerinin incelenmesinde kuluçka öncesi dönem, ilaçların teratojenik aktivitesini araştırmak için ise kuluçkanın üçüncü ve dördüncü günleri tercih edilir [13]. Asetonun özellikle pestisit aktif maddeleri için iyi bir çözücü olduğu dikkate alınarak bu çalışmada kuluçka öncesi enjeksiyon uygulanmıştır.

Enjekte edilecek solüsyon hacmi için çeşitli çalışmalarda 20-100 µl/yumurta kullanılırken, hava kamarasına yapılacak enjeksiyonlar için Çelik ve ark. [14] 20 µl'den daha fazla hacimdeki test solüsyonun yumurta içi basıncı artırarak embriyonik ölümlere sebep olabileceğini ve bu durumun test maddesinin etkisini maskeleyebileceğini bildirmesi dikkate alınarak bu çalışmada 20 µl/yumurta solüsyon hacmi kullanılmıştır.

Jelinek ve ark. [11] tavuk yumurtası ile yaptıkları embriyotoksisite çalışmalarında her grup için 6-10 yumurta kullanırken, Kemper ve Luepke [2] ve Prelusky ve ark. [12] sonuçların güvenilirliği açısından her grup için en az 20 yumurta kullanılmasını önermişler, bu çalışmada da gruplar 20'şer yumurtadan oluşturulmuştur.

Aseton; su ile iyi karışması, yüksek evaporasyon özelliği ve düşük viskoziteli olması nedeniyle iyi bir organik çözücü olarak kabul edilmektedir [15]. Asetonun test edilecek kimyasal maddelerin olası genotoksik etkilerini değiştirdiğine dair deliller bulunmadığından özellikle genotoksisite çalışmalarında çözücü olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [16]. Bunun yanı sıra tavuk embriyoları üzerinde yapılan bazı çalışmalarda da, organik klorlu bir insektisit olan DDT'nin, mikotoksinlerden Aflatoksin B₁'in, bir herbisit olan 2,4-diklorofenoksiasetik asid'in ve piretroit grubu bir insektisit olan Sipermetrin'in tavuk yumurtasına enjeksiyonunda çözücü olarak aseton kullanılmıştır [17, 18, 19, 20].

Korhonen ve ark. [21], tavuk embriyoları üzerinde yaptıkları çalışmada 5 µl/yumurta aseton enjeksiyonunun mortalite ve embriyo anormallikleri üzerinde etkili olmadığını göstermişlerdir. Ameenuddin ve Sunde [22] çeşitli

çözücülerin tavuk embriyoları üzerindeki etkilerine ait çalışmalarında hava kamarası yolu ile 100 µl/yumurta 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. Benzer şekilde McLaughlin ve ark.'da [23] 78 mg/yumurta asetonun yumurtadan çıkma oranında düşüşe sebep olduğunu bildirmişlerdir. Ameenuddin ve Sunde'nin [22] çalışmasında 100 µl/yumurta aseton enjeksiyonunda ölümlerin kuluçkanın birinci haftası yoğunlaşması, ikinci ve üçüncü hafta mortalitesinin kontrol grubu ile önemli farklılık göstermemesi sebebiyle, bu çalışmada yukarıda belirtilen hacmin beşte biri olan 20 µl/yumurta aseton enjeksiyonunun kuluçkanın 8½ gün sonrasındaki etkilerinin değerlendirilmesi uygun görülmüştür.

Aseton konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak %70 ve %100'lük aseton gruplarında kontrol grubuna kıyasla mortalitede önemli düzeyde artış gözlenmiş olmakla birlikte, %22.22 ve %21.05'lik bu ölüm oranlarının bu tür çalışmalarda tolere edilebileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca %50'lik aseton grubunun rölatif embriyo ağırlığı dışında, deney gruplarının anormal embriyo oranları, canlı ve rölatif embriyo ağırlıkları ve CRL değerleri kontrol grubundan önemli düzeyde farklılık göstermemiştir. Bu durum asetonun tavuk embriyoları için 20 µl hacminde teratojenik etkiye sahip olmadığına, embriyotoksik açıdan ise zayıf etkiye sahip olduğuna işaret etmektedir. Benzer şekilde asetonun *in vivo* hayvan deneylerinde de teratojenik bir etkiye sahip olmadığı bildirilmiştir [16].

Ameenuddin ve Sunde [22] embriyotoksik etkilerin araştırılacağı denemelerde kullanılacak olan çözücünün seçiminde, öncelikle test edilecek maddenin o çözücüde çok iyi çözünmesine, daha sonra çözücünün uygun seviyede toksisiteye sahip olmasına, enjeksiyon şekline ve embriyoların enjeksiyon anındaki gelişim evresinin önemine dikkat çekmişlerdir. Bu sebeple test edilecek madde için öncelikle en iyi çözücü tercih edilmelidir. Sonuç olarak, tavuk embriyotoksisite, teratojenite, mutajenite ve genotoksisite çalışmalarında öncelikle test edilecek maddenin asetondaki çözünürlüğü göz önüne alınmalıdır. İkinci aşamada ise düşük yan etkileri sebebiyle özellikle düşük konsantrasyonlardaki aseton, çözücü olarak kuluçka başlangıcında hava kamarasına enjeksiyon yönteminde 20 µl veya daha az hacimlerde ölüm oranı da göz önüne alınarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Jelinek R., The Chick Embryotoxicity Screening Test (CHEST), In: Methods in Prenatal Toxicology, Eds.; Neubert D., Merker H.J., Kwasigrooh T.E., Georg Thieme, Stuttgart, 381-386, (1977).
2. Kemper F.H., Luepke N.P., Toxicity Testing by the Hen's Egg Test (HET), Fd. Chem. Toxic., 24 (6/7), 647-648, (1986).
3. Nishigori H., Mizumura M., Iwatsuru M., 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, (1992).
4. Wolf T., Luepke N.P., Formation of Micronuclei in Incubated Hen's Eggs as a Measure of Genotoxicity, Mutat. Res.-Gen. Tox. En., 394, 163-175, (1997).
5. Davies W.J., Freeman S.J., Chick Embryotoxicity Screening Test (CHEST I and II), In: Methods in Molecular Biology. In Vitro Toxicity Testing Protocols, Eds.; O'Hare S., Atterwill C.K., Humana Press Inc., Totowa, NJ, 43, 307-310, (1995).
6. Hamburger V., Hamilton H.L., A Series of Normal Stages in the Development of Chick Embryo, J. Morphol., 88, 49-92, (1951).
7. Fischer L.D., Van Belle G., Biostatistics: A Methodology for the Health Sciences, John Wiley&Sons, New York, (1993).
8. Conover W.J., Practical Nonparametric Statistics, 2nd Edition, John Wiley&Sons, New York, (1980).
9. Mauldin J.M., Quality Control Procedures for the Hatchery, Poult. Sci., 93 (1), 1-24, (1993).
10. Sur E., Yumurtaya verilen Aflatoksin B₁ (AFB₁)'in Tavukların Lenfoid Organlarının Embriyonal Gelişimi Üzerindeki Etkilerinin Enzim Histokimyasal Yöntemlerle Araştırılması, Doktora Tezi, S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, (2001).
11. Jelinek R., Peterka M., Rychter Z., Chick Embryotoxicity Screening Test-130 Substances Tested, Indian J. Exp. Biol., 23, 588-595, (1985).
12. Prelusky D.B., Hamilton R.M.G., Foster B.C. Trenholm H.L., Thompson B.K., Optimization of Chick Embryotoxicity Bioassay for Testing Toxicity Potential of Fungal Metabolites, J. Assoc. off Anal. Chem., 70 (6), 1049-1055, (1987).
13. Özcan M., Hidrokinon'un (HK) Gelişim Toksisitesinin Döllenmiş Tavuk Embriyosunda Analiz ve Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, G.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (1992).
14. Çelik I., Oguz H., Demet O., Boydak M., Dönmez H.H., Sur E., Nizamlıoğlu F., Embryotoxicity Assay of Aflatoxin Produced by *Aspergillus parasiticus* NRLL 2999, Br. Poult. Sci., 41 (4), 401-409, (2000).

15. Krasavage W.J., O'Donoghue J.L., Divencenzo G.D., Ketone, In: Patty's Industrial Hygiene and Toxicology, Eds.; Clayton G.D., Clayton, F.E., Vol: 2C, 3rd Edition. New York, NY: John Wiley&Sons, 4709-4800, (1982).
16. ATSDR, Toxicological Profile for Acetone, Atlanta, Georgia, Agency For Toxic Substances and Disease Registry, (1994).
17. Dunachie J.F., Fletcher W.W., An Investigation of the Toxicity of Insecticides to Birds' Eggs Using the Egg-Injection Technique, Ann. Appl. Biol. 64, 409-423, (1969).
18. Neldon-Ortiz D.L., Qureshi M.A., Effects of AFB₁ Embryonic Exposure on Chicken Mononuclear Phagocytic Cell Functions, Dev. Comp. Immunol., 16 (2/3), 187-196, (1992).
19. Arias E., Sister Chromatid Exchange Induction by the Herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Chick Embryos, Ecotox. Environ. Safe., 55, 338-343, (2003).
20. Anwar K., Cypermethrin, A Pyrethroid Insecticide Induces Teratological and Biochemical Changes in Young Chick Embryos, Pakistan J. Biol. Sci., 6 (19), 1698-1705, (2003).
21. Korhonen A., Hemminki K., Vainio H., Embryotoxic Effects of Acrolein, Methacrylates, Guanidines and Resorcinol on Three Day Chicken Embryos, Acta Pharmacol. Toxicol., 52, 95-99, (1983).
22. Ameenuddin S., Sunde M.L., Sensitivity of Chick Embryo to Various Solvents Used in Egg Injection Studies, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 175, 176-178, (1984).
23. McLaughlin J.J., Marliac J., Verrett M.J., Mutchler M.K., Fitzhugh O.G., Toxicity of Fourteen Volatile Chemicals as Measured by the Chick Embryo Method, Amer. Ind. Hyg. Assoc. J., 25, 282-284, (1964).