

TAVUK EMBRİYOLARININ EMBRİYOTOKSİSİTE VE TERATOJENİTE TESTLERİNDE KULLANIMI

Haluk Özparlak*

Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya-TURKEY
e-mail: hozparlak@selcuk.edu.tr

(Geliş:23 Aralık 2014; Düzeltme:12 Ocak 2015 ; Kabul:12 Ocak 2015)

Özet: Günümüzde her alanda kimyasal madde kullanımında hızlı bir artış söz konusudur. Bu sebeple insanlar ve hayvanlar çevrelerinde bulunan pek çok değişik kimyasal maddeye maruz kalmaktadır. Bu maddelerin potansiyel risklerini ve olumsuz etkilerini değerlendiren embriyotoksosite ve teratojenite testleri her geçen gün daha çok önem kazanmaktadır. Bu derlemede alternatif bir deney hayvanı olarak tavuk embriyolarının çeşitli tekniklerle embriyotoksosite ve teratojenite çalışmalarında kullanımıyla ilgili yayınlar derlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Embriyotoksosite, Teratojenite, Tavuk embriyosu.

THE USE OF CHICK EMBRYOS IN EMBRYOTOXICITY AND TERATOGENICITY TESTS

Abstract: Nowadays there is a rapid increase in the use of chemical substances in every field. Therefore human beings and animals are exposed to a large number of chemical substances in their environment. Embryotoxicity and teratogenicity tests about the adverse effects and potential risks of these substance gain increasingly more importance. In this review, publications about the use of chick embryos as an alternative experiment animal in embryotoxicity and teratogenicity studies by various techniques have been compiled.

Keywords: Embryotoxicity, Teratogenicity, Chick embryo.

1. Giriş

İnsanlar her geçen gün artan miktarlarda embriyotoksik ve teratojenik potansiyeli bilinmeyen ilaçlar, endüstri yan ürünleri ve çevre kirleticilerine maruz kalmaktadır. Bu tip kimyasal bileşiklerin embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin sıçan veya fare gibi kemirgenler yada tavşanlar üzerinde ayrıntılı olarak test edilmesi gerekir. Bununla birlikte üretilen her bir yeni kimyasal bileşiğin test edilmesi mümkün görülmemektedir. Bu sebeple bir kimyasal bileşiğin memeli embriyosu üzerine etkilerini doğru bir şekilde tahmin edebilecek, ucuz ve hızlı alternatif tarama yöntemlerinin geliştirilmesi faydalı olacaktır. Bu amaca yönelik olarak memeli ve memeli olmayan hayvan türlerinin kullanıldığı çeşitli *in vivo* ve *in vitro* test sistemleri kullanılmaktadır.

Literatürde kanatlı embriyoları özellikle de tavuk embriyoları kullanılarak değişik kimyasal bileşiklerin embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin belirlendiği çok sayıda araştırma mevcuttur.

Örneğin 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; Aydın ve ark., 2005), 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; Özparlak ve ark., 2009) 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 etkilerini belirlemek amacıyla kanatlı embriyoları kullanılmıştır. Bu kimyasal bileşiklerin yanı sıra önemli çevresel kirleticilerden organik klorlu (Bryan ve ark., 1989; Seifert, 1989; Powell ve ark., 1996; Powell ve ark., 1997; Fox ve Grasman, 1999), organik fosforlu (Bruel ve David, 1980; Rashev ve Vasilev, 1982; Misawa ve ark., 1982; Wyttenbach ve Hwang, 1984; Varnagy ve Deli, 1985; Sheets ve Norton, 1985; Deli ve Kiss, 1988; Farage-Elawar ve Francis, 1988; Meneely ve Wyttenbach, 1989; Varnagy, 1992; Rao ve ark., 1992; Lenselink ve ark., 1993; Varnagy, 1995; Varga ve ark., 1999; Varnagy, 1999; Lesser ve ark., 2000; Varnagy ve ark., 2001; Budai ve ark., 2001; Budai ve ark., 2002; Varga ve ark., 2002; Sahu ve Ghatak, 2002), karbamat (Farage-Elawar ve Blaker, 1992), piretroit (David, 1982), kitin sentez inhibitörü (El-Sayyad ve ark., 1996) ve diğer gruplardan (Dusek ve ark., 2001; Dusek ve ark., 2003; Özparlak ve Ünsal, 2006) çeşitli insektisitlerin embriyotoksik, teratojenik ve diğer etkileri kanatlı embriyoları üzerinde yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Bu çalışmalara ilaveten son yıllarda tavuk embriyoları kullanılarak genotoksisite testlerinden mikronükleus testi modifiye edilmiş ve Tavuk Yumurtası Mikronükleus Testi (Hen's Egg Test for Micronucleus Induction, HET-MN) alternatif bir test olarak sunulmuştur (Wolf ve Luepke, 1997; Wolf ve ark., 2002; Wolf ve ark., 2003; Wolf ve ark., 2008; Hothorn ve ark., 2013).

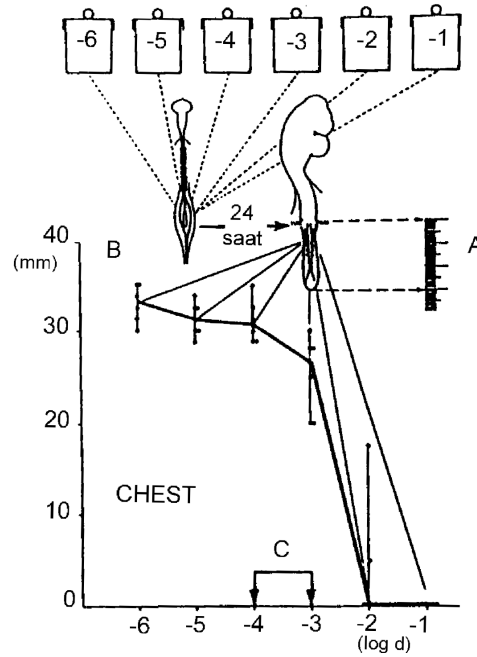
Bu makaleyle alternatif bir deney hayvanı olarak tavuk embriyoları kullanılarak gerçekleştirilen embriyotoksisite ve teratojenite testlerinin uygulanması hakkında bilgi vermek ve bunun yanı sıra bu testlerin kullanımlarının yaygınlaştırılması amaçlanmıştır.

2. Tavuk Embriyosu Kullanılan Embriyotoksisite ve Teratojenite Testleri

Jelinek (1977) dömlü tavuk yumurtası kullanarak Tavuk Embriyotoksisite Tarama Testini (Chicken Embryotoxicity Screening Test, CHEST) geliştirmiştir. Bu test CHEST-I (embriyotoksik doz sınırlarının belirlenmesi) ve CHEST-II (teratojenik parametrelerin tespiti) olmak üzere iki basamakta gerçekleştirilmektedir. CHEST-I'de; uygun çözücüde $1/10^2$ - $1/10^6$ oranlarında onluk geometrik dizide farklı konsantrasyonları hazırlanmış test maddeleri HH (Hamburger-Hamilton) skalasına göre (Hamburger and Hamilton, 1951) 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 mikroskobunda 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 (Şekil 1). 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 manipulasyon zorluğu ve kusursuz bir sterilizasyon sağlanması gibi güçlüklerle sahiptir. Ayrıca embriyonun sadece bir bölümü değerlendirmeye alındığından, diğer vücut bölümlerindeki etkilerin gözden kaçması ihtimali de yüksektir. Jelinek ve ark. (1985), CHEST-I ve CHEST-II yöntemleriyle 130 maddenin toksik etkilerini

değerlendirmiş, endüstriyel bileşikler, ilaçlar, gıda katkı maddeleri ve pestisitleri içeren bu bileşiklerden 117 tanesinde embriyotoksik etki gözlediklerini rapor etmişlerdir.

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} embriyotoksik doz aralığına sahiptir. Bu 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 sorunu karşımıza çıkarsa da, bütün türlerde morfogenetik olaylar ve bunların seyri benzerdir (Jelinek, 1977). Diğer embriyotoksikite testlerinde de insan harici memeli hayvanlar kullanıldığı göz ardı edilmemelidir.



Şekil 1. A) Tavuk embriyotoksikite tarama testinde ölçüm yapılan kaudal kısım B) Uygulamadan 24 saat sonra her bir doz için alınan ölçümlerin ortalama değerleri C) Embriyotoksik saha (Jelinek, 1977)

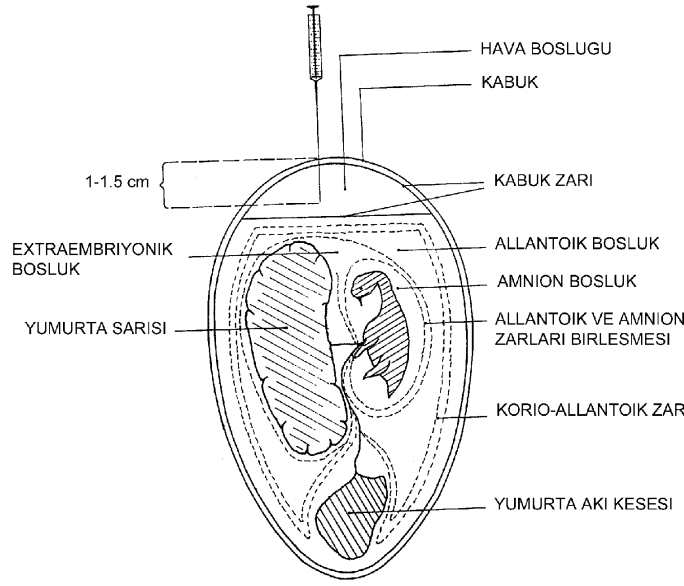
CHEST'in yanı sıra dömlü tavuk yumurtası kullanılarak çeşitli modifikasyonlarla, Kemper ve Luepke (1986) Tavuk Yumurtası Testini (Hen's Eggs Test, HET) ve Nishigori ve ark. (1992) ise Dömlü Tavuk Yumurtası Tarama Testini (Hen's Fertile Egg Screening Test, HEST) geliştirmişlerdir. Bütün bu testler kolay, 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 haklarına 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-fetus ilişkisi olmaması, ayrıca bazı bileşiklerin nonspesifik bir hassasiyet göstererek hatalı pozitif sonuçlar verebilmesi dezavantajları olarak kabul edilmektedir (Özcan, 1992). Kemper ve Luepke (1986) HET yöntemiyle ölüm oranının (LD₅₀), gelişme geriliğinin (yumurtadan çıkış ağırlığı, kemik uzunlukları ve organ ağırlıkları), teratojenitenin (iskelet gelişimi anormallikleri, makroskobik 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.

Bahsedilen bu testlerin yanı sıra Luepke (1985) Tavuk Yumurtası Korioallantoik Membran Testini (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane, HET-CAM) geliştirmiştir. Bu test ile kozmetik ürünleri gibi kimyasal maddelerin korio-allantoik membran üzerindeki hemoraji, lizis ve koagülasyon etkileri değerlendirilerek gözle ilgili irritasyon potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Rosenbruch ve Holst (1990) ise HET-CAM'a alternatif, vitellüs kesesi kan damarları sistemi ile benzer bir model geliştirmişlerdir. Benzer şekilde Neumann ve ark. (1997), tavşan göz irritasyon testine (Draize Test) alternatif olarak PHET'i (Photo Hen's Egg Test) geliştirmişlerdir.

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 mukozayla ilgili 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. Hashizume ve ark. (1992) teratoloji çalışmalarında enjeksiyon anındaki tavuk embriyolarının gelişme evresine, enjeksiyon bölgesine ve çözücü türünün önemine dikkat çeken bir çalışma gerçekleştirmişlerdir.

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 faktörlerdir. Tavuk embriyoları üzerinde yapılan embriyotoksosite çalışmalarında test edilecek maddenin yumurtaya verilisinde hava kamarasına, embriyonun kaudal bölgesine, albümine ve yumurta sarısına enjeksiyon yöntemleri uygulanmıştır. Uygulama kolaylığı, yumurtaların enfekte olma riskinin en düşük düzeyde olması, verilen solüsyonun homojen ve hızlı bir şekilde diffüze olması ve diğer yöntemlerde söz konusu olan yumurta içi basınçtaki artışın embriyoda meydana getirebileceği mekanik hasarları ortadan kaldırdığı için hava kamarası ideal enjeksiyon bölgesi olarak kabul edilmektedir (Şekil 2) (Prelusky ve ark., 1987; Çelik ve ark., 2000; Sur, 2001; Öznurlu, 2003). Çeşitli pestisitlerle yapılan çalışmalarda da kuluçkanın değişik günlerinde hava kamarasına enjeksiyon yöntemi 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 dezavantajı olarak kabul edilmektedir (Prelusky ve ark., 1987).



Şekil 2. Tavuk yumurtası hava kesesine enjeksiyon tekniği (Özcan, 1992).

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, promotajenlerle yaptıkları genotoksisite çalışmalarında enjeksiyonları kuluçkanın 8. gününde gerçekleştirmişlerdir. Kuluçka başlangıcında tavuk embriyosu (blastoderm), blastula aşamasındadır ve yaklaşık 400.000 adet, henüz diferansiyasyonun başlangıcındaki hücrelerden oluşan hücre topluluğu halindedir (Kucera ve Burnand, 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 organogenezin en kritik evresidir. Çok sayıda morfojenetik olay, kuluçkanın bu erken evresinde gerçekleşir (Kucera ve Burnand, 1987; Etches, 1996). Bu dönemde ortaya çıkan ve embriyonik gelişmeyi bozan fiziksel ya da kimyasal etkiler, embriyonik ölümlere sebep olmaları yanında, önemli yapısal ve fonksiyonel bozukluklara da sebep olmaktadır (Kucera ve Burnand, 1987). Bazı maddeler metabolik etkiler sonucunda toksisite ve teratojenite kazandıklarından ya da 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 test edilecek bileşiklerin ve metabolitlerinin olası embriyotoksik, teratojenik ve genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla tavuk embriyolarında metabolik aktivasyonun yoğun olduğu kuluçkanın 8. günü enjeksiyon zamanı olarak ideal görünmektedir.

Enjekte edilecek solüsyon için farklı çalışmalarda 3-100 µl/yumurta arasında değişen solüsyon hacimleri kullanılırken, hava kamarasına yapılacak enjeksiyonlar için Çelik ve ark. (2000) kuluçka başlangıcında 20 µl'den daha fazla hacimdeki test solüsyonunun yumurta içi basıncı artırarak zararlı etkilerinin olabileceğini ve bu durumun test maddesinin etkisini maskeleyebileceğini bildirmiştir. 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.

CHEST ve modifikasyonlarının uygulandığı çalışmalarda test edilecek maddenin farklı dozları denenmeli, pH'ı dikkate alınmalı, uygun çözücü kullanılmalı ve gruplarda uygun sayıda yumurta kullanılmalıdır. Brown ve ark. (1986) en az üç farklı dozun denenmesi gerektiğine işaret etmiş, Çelik ve ark.'da (2000) Aflatoksin (AFB₁) ile gerçekleştirdikleri benzer bir embriyotoksisite çalışmasında en az üç farklı doz kullanmışlardır. Jelinek ve ark. (1985) enjekte edilen solüsyonların 4-9 arasındaki pH değerlerinin embriyolar tarafından iyi tolere edildiğini bildirmişler ayrıca çalışmalarında her grup için 6-10 yumurta kullanmışlardır. Kemper ve Luepke (1986) ve Prelusky ve ark. (1987) ise sonuçların güvenilirliği açısından her grup için en az 20 yumurta kullanılmasını önermişlerdir. Bu tip çalışmalarda çözücü olarak ise serum fizyolojik, bidistile su, %30'luk etanol, %10'luk dimetilsülfoksit (DMSO), ayçiçeği yağı ve %1'lik karboksimetilselüloz (CMC) kullanılmaktadır (Davies ve Freeman, 1995).

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 döllü tavuk yumurtalarına hava kamarası yoluyla kuluçka başlangıcında 10 ng/yumurta, 100 ng/yumurta ve 1000 ng/yumurta dozlarında AFB₁ enjekte ederek, kuluçka sonunda sırasıyla %74.50, %98.03 ve %100 mortalite belirlemişler ve özellikle yüksek dozda ölümlerin erken embriyonik dönemde yoğunlaştığını gözlemişlerdir. Durmus ve ark. (2005) yine aynı metotla metal alaşımların embriyotoksik etkilerini inceledikleri çalışmalarında, pozitif kontrol amacıyla 10 ng/yumurta, 100 ng/yumurta ve 1000 ng/yumurta dozlarında AFB₁ kullanmışlar ve kuluçkanın son gününde sırasıyla %27.02, %94.73 ve %100 mortalite tespit etmişlerdir. Bu veriler ışığında bu tip çalışmalarda AFB₁'in pozitif kontrol amacıyla kullanılabilir uygun bir test bileşiği olduğu sonucuna ulaşılmaktadır.

3. Sonuç

İnsanoğlu başta olmak üzere canlılar artan bir şekilde çevrelerinde bulunan kimyasal ve fiziksel etkenlere maruz kalmaktadır. Bu etkenlerin embriyotoksik ve teratojenik potansiyellerinin değerlendirilmesi günümüzde insan ve çevre sağlığı açısından giderek önem kazanmaktadır. Yukarıda bahsedilen çok sayıdaki çalışmada görülebileceği gibi bu değerlendirmelerde sahip olduğu avantaj ve dezavantajlara rağmen tavuk embriyoları alternatif bir deney hayvanı olarak yoğun bir şekilde kullanılmıştır ve kullanılmaya devam edilmektedir.

Kaynaklar

- Ahmed AA, Soliman MM, Khlifa BAA, El-Sadek SE and Nounou AH (1988). Embryocidal and teratogenic effects of paraquat on chick embryos and white rats. *Archiv fur Experimentelle Veterinarmedizin* 42, 848-853.
- Ameenuddin S and Sunde ML (1984). Sensitivity of chick embryo to various solvents used in egg injection studies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 175, 176-178.
- Aydın MF, Çelik İ, Sur E, Özparlak H ve Telatar T (2005). Yumurtaya verilen Aflatoxin B₁'in civciv çıkış ağırlığı üzerindeki etkileri. *Veteriner Bilimler Dergisi* 21 (1-2), 85-89.
- Becker SRB and Shibley IA (1998). Teratogenicity of ethanol in different chicken strains. *Alcohol Alcoholism* 33 (5), 457-464.
- Brown LP, Flint OP, Orton TC and Gibson GG (1986). Chemical teratogenesis: Testing methods and the role of metabolism. *Drug Metabolism and Drug Interactions* 17 (3-4), 221-260.
- Bruel MT and David D (1980). Effects of an organophosphorous pesticide, dichlorvos, on germ cells of the undifferentiated gonads of young quail embryos. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales* 174 (2), 163-169.
- 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. *Environmental Pollution* 67, 133-143.
- Bryan TE, Gildersleeve RP and Wiard RP (1989). Exposure of Japanese quail embryos to o,p'-DDT has long-term effects on reproductive behaviors, hematology and feather morphology. *Teratology* 39, 525-535.
- Budai P, Fejes S, Varnagy L, Somlyay IM and Takacs I (2001). Teratogenicity test of dimethoate containing insecticide formulation and heavy elements (Cu, Cd) in chicken embryos after administration as single compounds or in combination. *Mededelingen / Universiteit Gent, Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen* 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. *Mededelingen / Universiteit Gent, Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen* 67 (2), 99-103.
- Chibber G and Gilani SH (1986). Acrolein and embryogenesis: An experimental study. *Environmental Research* 39, 44-49.
- Cilievici O, Cordos I, Ghidus E and Moldovan A (1980). The toxic and teratogenic effect of Aflatoxin B₁ on the chick embryo development. *Morphology Embryology* 26 (4), 309-314.
- Çelik İ, Oğuz H, Demet Ö, Boydak M, Dönmez HH, Sur E and Nizamlioğlu F (2000). Emryotoxicity assay of aflatoxin produced by *Aspergillus parasiticus* Nrrl 2999. *British Poultry Science* 41 (4), 401-409.
- David D (1982). Influence of technical and commercial decamethrin, a new synthetic pyrethroid, on the gonadic germ population in quail embryos. *Archives d Anatomie, d Histologie et d Embryologie* 65, 99-110.
- Davies WJ and Freeman SJ (1995). Chick embryotoxicity screening test (CHEST I and II). In: O'Hare S and Atterwill CK (eds.) *Methods in Molecular Biology. In Vitro Toxicity Testing Protocols*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 43, 307-310.
- Deli E and Kiss Z (1988). Effect of parathion and methylparathion on protein content of chicken embryo muscle *in vivo*. *Biochemical Pharmacology* 37 (17), 3251-3256.
- Durmus E, Inan O, Çelik I, Sur E, Özkan Y, Acar A and Aydın MF (2005). Use of the fertilized hen's egg in the evaluation of embryotoxicity of dental alloys. *Journal of Biomedical Materials Research* 72 (B), 322-327.
- Dusek Z, Holejsovská I, Novotná B and Zemanová Z (2001). Embryotoxicity of 1,2-dibromoethane in chick embryos *in ovo*: Early and late effects. *European Journal of Morphology* 39 (2), 105-112.
- Dusek Z, Novotná B, Vodicková L, Naprstková I, Dostal M and Vilhelmová M (2003). Effects of 1,2-dibromoethane on haematopoiesis in the chick embryo. *Xenobiotica* 33 (4), 443-458.
- 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 HI, El-Gammal SA and Kariem SA (1996). Some aspects of growth deformities of chick embryos induced by flufenoxuron. *Journal of Union of Arab Biologists Cairo A Zoology* 5 (A), 313-329.
- Etches R (1996). *Reproduction in Poultry*. CAB International, Cambridge.
- Farage-Elawar M and Blaker WD (1992). Chick embryo exposure to carbamates alters neurochemical parameters and behavior. *Journal of Applied Toxicology* 12 (6), 421-426.

- Farage-Elawar M and Francis BM (1988). Effects of fenthion, fenitrothion and desbromoleptophos on gait, acetylcholinesterase, and neurotoxic esterase in young chicks after *in ovo* exposure. *Toxicology* 49, 253-261.
- 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. *Mededelingen / Universiteit Gent, Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen* 67/2, 105-109.
- Fox LL and Grasman KA (1999). Effects of PCB 126 on primary immune organ development in chicken embryos. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 58, 233-244.
- Gilani SH and Alibhai Y (1990). Teratogenicity of metals to chick embryos. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 30 (1), 23-31.
- Hamburger V and Hamilton HL (1951). A series of normal stages in the development of chick embryo. *Journal of Morphology* 88, 49-92.
- Hamilton JV, Denison MS and Bloom SE (1983). Development of basal and induced aryl hydrocarbon (benzo(a)pyrene) hydroxylase activity in the chick embryo *in ovo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 3372-3376.
- Harold TT, Bruyere J, Steve J, Kargas A, Nishikawa T, Takagi Y and Gilbert EF (1987). Alcohol induces cardiovascular malformations in the chick embryo. *Teratology* 35, 95-103.
- Hashizume R, Noda 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.
- Heinrich-Hirsch B and Neubert D (1991). Effect of Aciclovir on the development of the chick embryo *in ovo*. *Archives of Toxicology* 65, 402-408.
- Henry MH and Wyatt RD (2001). The toxicity of fumonisin B₁, B₂ and B₃, individually and in combination, in chicken embryos. *Poultry Science* 80 (4), 401-407.
- Hothorn LA, Reisinger K, Wolf T, P Albrecht, Fieblinger D, Liebsch M And Pirow R (2013). Statistical analysis of the hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN assay). *Mutation Research/DNA Repair* 757, 68-78.
- Jelinek R (1977). The chick embryotoxicity screening test (CHEST). In: Neubert D, Merker HJ and Kwasigroch TE (eds.) *Methods in Prenatal Toxicology*, Georg Thieme, Stuttgart, pp. 381-386.
- Jelinek R and Marhan O (1994). Validation of chick embryotoxicity screening test (CHEST). A comparative study. *Functional and Developmental Morphology* 4 (4), 317-323.
- Jelinek R, Peterka M and Rychter Z (1985). Chick Embryotoxicity Screening Test-130 Substances Tested. *Indian Journal of Experimental Biology* 23, 588-595.
- Johnson EM (1986). False positives false negatives in developmental toxicology and teratology. *Teratology* 34, 361-362.
- Julian D and Abbott UK (1998). An avian model for comparative studies of insulin teratogenicity. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 27 (5), 313-321.
- Kaya S, Alabay B, Baydan E ve Altunay H (1995). Ağır metallerin tavuk embriolarında teratojenik etkileri: Arsenik, ve kurşun ayrı ayrı ve birlikte kullanılmasının etkileri. *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*. 42, 225-233.
- Kemper FH and Luepke NP (1986). Toxicity testing by the hen's egg test (HET). *Food and Chemical Toxicology* 24 (6/7), 647-648.
- Korhonen A, Hemminki K and Vainio H (1982). Embryotoxicity of industrial chemicals on the chicken embryo: Thiourea derivatives. *ACTA Pharmacologica et Toxicologica* 51, 38-44.
- Korhonen A, Hemminki K and Vainio H (1983). Embryotoxicity of industrial chemicals on the chicken embryo: Dithiocarbamates. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 3 (2), 163-175.
- Kucera P and Burnand MB (1987). Routine teratogenicity test that uses chick embryos *in vitro*. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 7, 427-447.
- Kury BG and Craig JM (1967). The effects of Mitomycin C on developing chick embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 17 (1), 229-237.
- Lenselink DR, Midtling JE and Kolesari GL (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. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 59, 57-66.

- Luepke NP (1985). Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology* 23, 287-291.
- Maci R and Arias E (1987). Teratogenic effects of the fungicide maneb on chick embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 13, 169-173.
- Meneely GA and Wyttenbach CR (1989). Effects of the organophosphate insecticides diazinon and parathion on bobwhite quail embryos: Skeletal defects and acetylcholinesterase activity. *Journal of Experimental Zoology* 252, 60-70.
- Misawa M, Doull J and Uyeki EM (1982). Teratogenic effects of cholinergic insecticides in chick embryos. III. Development of cartilage and bone. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 10 (4-5), 551-563.
- Neumann NJ, Hölzle E, Lehmann P, Rosenbruch M, Klauic A and Plewig G (1997). Photo hen's egg test: A model for phototoxicity. *British Journal of Dermatology* 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 Biology and Toxicology* 8 (4), 255-265.
- Özcan M (1992). Hidrokinon'un gelişim toksisitesinin döllenmiş tavuk embriyosunda analiz ve değerlendirilmesi. *G. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, Ankara.
- 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.
- Özparlak H, Çelik İ, Sur E, Telatar T, Aydın MF, Öznurlu Y (2009). Farklı konsantrasyonlardaki asetonun embriyotoksik etkilerinin tavuk yumurtası testi ile belirlenmesi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8 (1), 7-16.
- Özparlak H, Ünsal S (2006). Organik insektisit Fipronil'in saf ve ticari formülasyonlarının tavuk yumurtası testiyle LD₅₀ tayini ve embriyotoksik etkilerinin belirlenmesi. *Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 27, 83-98.
- Peterka M, Jelinek R and Pavlik A (1992). Embryotoxicity of 25 psychotropic drugs: A study using CHEST. *Reproductive Toxicology* 6, 367-364.
- Powell DC, Aulerich RJ, Meadows JC, Tillitt DE, Giesy JP, Stromberg KL and Bursian, SJ (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. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31 (3), 404-409.
- Powell DC, Aulerich RJ, Meadows JC, Tillitt DE, Stromberg KL, Kubiak TJ, Giesy JP and Bursian SJ (1997). Organochlorine contaminants in double-crested cormorants from Green Bay, Wisconsin: II. Effects of an extract derived from cormorant eggs on the chicken embryo. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 32, 316-322.
- Prelusky DB, Hamilton RMG, Foster BC, Trenholm HL and Thompson BK (1987). Optimization of chick embryotoxicity bioassay for testing toxicity potential of fungal metabolites. *Journal-Association of Official Analytical Chemists* 70 (6), 1049-1055.
- Rao JV, Swamy AN, Yamin S, Rao SH and Rahman MF (1992). Teratism induced in the developing chick by RPR-V, an organophosphate. *Food and Chemical Toxicology* 30 (11), 945-951.
- Rashev Z and Vasilev VK (1982). Teratogenic effect of the pesticide preparation metathion. *Veterinarni Medicina* 19 (1), 79-89.
- 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.
- Rosenbruch M and Holst A (1990). The chick embryo yolk-sac blood vessel system as an experimental model for irritation and inflammation. *Toxicology In Vitro* 4 (4/5), 327-331.
- Sahu CR and Ghatak S (2002). Effects of dimecron on developing chick embryo: Malformations and other histopathological changes. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 31, 15-20.
- 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. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 42, 707-715.
- Sheets L and Norton S (1985). Peripheral nerve damage in chicks following treatment with organophosphorus compounds *in ovo*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 78, 412-420.
- 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.

- 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 de Médecine Vétérinaire* 153, 275-278.
- 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 Veterinaria Hungarica* 47 (1), 123-128.
- Varnagy L (1992). Teratological examination of the insecticide methylparathion (Wofatox 50 EC) on pheasant embryos. 2. Biochemical study. *ACTA Veterinaria Hungarica* 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 Veterinaria Hungarica* 47 (1), 117-122.
- Varnagy L and Deli E (1985). Comparative teratological study of insecticide Wofatox 50 EC (%50 methylparathion) on chicken and pheasant fetuses. *Anatomischer Anzeiger* 158, 1-3.
- Varnagy L, Budai P, Molnar E, Füzesi I and Fancsi T (2001). Teratogenicity testing of BI 58 EC (%38 dimethoate) in chicken embryos with special respect to degradation of the active ingredient. *ACTA Veterinaria Hungarica* 49 (3), 355-361.
- Varnagy L, Budai P, Molnar E, Susan M and Fancsi T (2002). Toxicity and degradation of benefin in chicken embryos. *Mededelingen / Universiteit Gent, Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen* 67 (2), 111-115.
- Verret MJ, Scott WF, Reynaldo EF, Alterman EK and Thomas CA (1980). Toxicity and teratogenicity of food additive chemicals in the developing chicken embryo. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 56, 265-273.
- Vesely D and Vesela D (1991). The use of chick embryo for prediction of some embryotoxic effects of mycotoxins in mammals. *Veterinarni Medicina Praha* 36 (3), 175-181.
- Vesely D, Vesela D and Jelinek R (1982). Nineteen mycotoxins tested on chicken embryos. *Toxicology Letters* 13 (3-4), 239-245.
- Wolf T and Luepke NP (1997). Formation of micronuclei in incubated hen's eggs as a measure of genotoxicity. *Mutation Research/DNA Repair* 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). *Mutation Research/DNA Repair* 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 and Chemical Toxicology* 41, 561-573.
- Wolf T, Niehaus-Rolf C, Banduhn N, Eschrich D, Scheel J and Luepke N-P (2008). The hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN): Novel analyses with a series of well-characterized substances support the further evaluation of the test system. *Mutation Research/DNA Repair* 650, 150-164.
- Wytenbach CR and Hwang JD (1984). Relationship between insecticide-induced short and wry neck and cervical defects visible histologically shortly after treatment of chick embryos. *Journal of Experimental Zoology* 229, 437-446.
- Wytenbach CR and Thompson SC (1985). The effects of the organophosphate insecticide malathion on very young chick embryos: Malformations detected by histological examination. *The American Journal of Anatomy* 174, 187-202.
- Yılmaz Ş (1997). Bazı metal kombinasyonlarının tavuk embriyolarında teratojenik etkileri-Bakır, molibden ve kadmiyumun etkileri. *A. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, Ankara.
- Zhang C, Fang C, Liu L, Xia G and Qiao H (2002). Disrupting effects of polychlorinated biphenyls on gonadal development and reproductive functions in chickens. *Journal of Environmental Science and Health. Part B*: 37 (4), 509-519.