

Organik İnsektisit Fipronil'in Genotoksik Etkilerinin Cıvciv Mikronukleus Test Sisteminde Belirlenmesi

Haluk ÖZPARLAK^{1*}, Atilla ARSLAN¹, Gökalp Özmen GÜLER²

¹Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya

²Selçuk Üniversitesi, Ahmet Keleşoğlu Eğitim Fakültesi, Biyoloji Eğitimi, Konya

Özet: Organik bir insektisit olan Fipronil, pestisitlerin fenil pirazoller veya fiproller olarak bilinen daha yeni ve küçük bir grubuna dahildir. Bu çalışmanın amacı ticari Fipronil'in olası akut ve kronik genotoksik etkilerinin cıvciv perifer kan hücrelerinde mikronukleus test sisteminde belirlenmesiydi. Bu amaçla farklı dozlardaki Fipronil (6.25, 25, 50 ve 100 mg/kg) cıvcivlere intraperitoneal yolla verilmiştir. Negatif kontrol amacıyla çözücü (distile su), pozitif kontrol grubu amacıyla da siklofosfamid kullanılmıştır. Uygulamalardan sonra perifer kan örnekleri alınarak frotiler hazırlanmış ve modifiye May Grünwald–Giemsa yöntemiyle boyanmıştır. Bu preparatlarda alyuvarlardaki mikronukleus ve anormal nukleus oranları ışık mikroskopuyla tespit edilmiştir. Negatif kontrol grubuna kıyasla, Fipronil uygulanan grupların mikronukleus ve anormal nukleus oranlarında istatistiksel olarak önemli düzeyde bir artış gözlenmemiştir ($p>0.05$). Bu sonuçlar ışığında Fipronil'in ticari formülasyonunun test edilen dozlarda cıvcivler için genotoksik olmadığı düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: Fipronil, cıvciv, genotoksisite, mikronukleus, nukleus anormalliği.

Determination of Genotoxic Effects of Organic Insecticide Fipronil in Chick *in vivo* Micronucleus Assay

Abstract: Fipronil, an organic insecticide, is a member of relatively new and small class of pesticides, the phenyl pyrazoles or fiproles group of chemicals. The aim of this study was to determine the possible acute and chronic genotoxic effects of commercial formulations of Fipronil in micronucleus test in peripheral blood erythrocytes of the chick. For this purpose, different doses of Fipronil (6.25, 25, 50 and 100 mg/kg) were given to chicks intraperitoneally. Distilled water and cyclophosphamide were also used as negative and positive controls, respectively. After treatments, blood smears were prepared and stained with modified May Grünwald–Giemsa. In this smears, frequencies of micronucleus and nuclear abnormality were examined in erythrocytes under light microscope. A statistically significant increase in the frequency of micronucleus and nuclear abnormality of groups treated with Fipronil could not be observed compared to negative control ($p>0.05$). These results indicate that commercial formulations of Fipronil at doses tested may be considered as a non-genotoxic compound for chicks.

Key Words: Fipronil, chick, genotoxicity, micronucleus, nuclear abnormality.

Giriş

Zararlı böcek popülasyonlarına karşı kimyasal mücadelede kullanılan insektisitler, çevre ve besin kirlenmesi, akut ve kronik zehirlenme, biyolojik dengenin bozulması, insan ve hayvanlarda teratojenik, mutajenik, genotoksik ve karsinojenik etkileri gibi çok yönlü çevre sorunlarının doğmasına sebep olmaktadır. İnsektisitlerin hedef türlere olan seçiciliği çok iyi geliştirilemediğinden hedef olmayan türler sıklıkla etkilenmektedir. Tamamen güvenli bir insektisit geliştirilmesi imkânı olmadığından, günümüzde insektisitlerin çevresel etkilerini

* hozparlak@selcuk.edu.tr

yansıyacak olan, su, toprak ve hava kirlenmesi düzeylerinin değerlendirilmesi; bunun yanı sıra toksikolojik ve ekotoksikolojik yan etkilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır.

Son yıllarda organik fosforlu, organik klorlu, karbamat ve piretroidler gibi klasik insektisit gruplarına neonikotinoid, kitin sentezi inhibitörleri ve pirazol (fenil pirazol) grubu insektisitler de dahil olmuştur [1,2]. Yapısındaki klor iyonları sebebiyle modern organik klorlu bir insektisit olarak da kabul edilen Fipronil ($C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$) diğer insektisit gruplarına göre daha yeni ve daha küçük bir grup olan 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 Fipronil'e duyarlıdır [3,4]. Ülkemizde de patates böceğine, ekin kambur böceğine ve mısır tel kurduna karşı ruhsatlı tarım ilacı olarak kullanılmaktadır [5]. Fipronil etki şekliyle dolaylı böceklerle ve kenelere memelilerden daha toksik olduğu için çevre sağlığında ve veteriner hekimlikte de kullanılmaktadır [6]. Özellikle evde beslenen hayvanlar ve çiftlik hayvanları üzerindeki pire, kene, bit ve akarlar karşı Fipronil kullanımına ait denemelerden bahsedilirken [4], tavuklar üzerinde kullanımına ait bir çalışma yoktur.

Fipronilin memeliler üzerindeki akut, kronik ve subkronik toksisitesi, karsinogenik ve genotoksik etkileri ile üreme ve gelişme üzerindeki etkileri ayrıntılı olarak çalışılmıştır [7,8]. Fipronilin kuşlar üzerindeki etkileri ise akut toksisite düzeyinde çeşitli kuş türleri üzerinde araştırılmış, LD_{50} değerleri tespit edilmiş ve sülün, keklik ve bildircin gibi kuşların Fipronil'e serçe, ördek ve kaz gibi kuşlardan çok daha fazla duyarlı olduğu belirlenmiştir [9].

Cıvcivlerin ucuz ve kolay elde edilebilir olması, ayrıca memelilerin aksine alyuvarlarının çekirdekli olması sebebiyle nukleus anormalliklerinin de incelenmesinin mümkün olması gibi özellikleri genotoksikite testlerinde tercih sebepleridir. Fipronil'in tavuk embriyolarında mikronukleus oluşumu üzerindeki etkilerine ait Özparlak [10]'ın çalışması dışında, kanatlı test sistemlerindeki genotoksik etkilerine ait literatür bilgisi bulunmamaktadır. Bu çalışmada farklı ırklardaki cıvcivlere uygulanan ticari formülasyon Fipronil'in, periferik kan alyuvarlarındaki mikronukleus (Micronucleus, MN) ve nukleus anormallikleri (Nuclear Abnormality, NA) oluşumu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ve böylece olası akut ve kronik genotoksik etkilerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Denemelerde kullanılan ticari Fipronil (500g/l, BASF Türk Kimya San. ve Tic. Ltd. Şti., İstanbul, Türkiye) solüsyonları ve pozitif kontrol amacıyla kullanılan siklofosamid (Cyclophosphamide monohydrate (CP), Fluka Chemie GmbH CH-9471, Buchs, Switzerland) solüsyonları aşağıda belirtilen dozlarda steril bidistile suda hazırlanmıştır. Denemelerde 25–30 g ağırlığındaki 5–6 günlük kahverengi (ATE-K) ve beyaz (Bovans white) yumurtacı cıvcivler kullanılmıştır.

Deneme I: Fipronil'in akut genotoksik etkilerinin kahverengi cıvcivlerde belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Fipronil'in tavuklar için akut letal dozuna ait literatür bulunmadığı için uygulanacak dozlar ön denemelerle belirlenmiştir. Her grupta 4–5 tane kahverengi cıvciv bulunan 7 grup oluşturulmuştur. Birinci gruba negatif kontrol amacıyla yalnızca 0.1 ml steril bidistile su; ikinci ve üçüncü gruba pozitif kontrol amacıyla farklı iki dozda CP (40 mg/kg ve 80 mg/kg); diğer gruplara sırayla 6.25 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarında Fipronil uygulanmıştır. Tüm uygulamalar 0.1 ml hacimde intraperitoneal enjeksiyon şeklinde gerçekleştirilmiştir. Uygulamadan 24 saat sonra her bir cıvcivin kanat venlerinden kan örnekleri alınarak yayma preparatları hazırlanmış, preparatlar 3 dk metanolde tespit edilmiş ve modifiye May-Grünwald Giemsa yöntemiyle [11] boyanmıştır. Bu metoda göre preparatlar önce 3 dakika süzölmüş May-Grünwald ile boyanmış, daha sonra preparat üzerine boya ile eşit hacimde 0.1 M disodyum sitrat/NaOH tamponu (pH=5.2) ilave edilerek metalik bir parlaklık oluşuncaya kadar ancak 5 dakikayı aşmadan boya solüsyonu dökülmüş ve preparatlar distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra preparatlar 0.1 M disodyum sitrat/NaOH tamponu (pH=5.2) içinde hazırlanmış ve süzölmüş %30'luk Giemsa ile 20 dakika boyanmış ve distile su ile tekrar yıkanmıştır. Yükselen etil alkol serilerinde dehidre edilen preparatlar ksilolde şeffaflaştırılarak entellan ile kapatılmıştır.

Her bireyin 5000 periferel kan alyuvarındaki MN ve NA oranları ışık mikroskopunda (objektif: 100×) belirlenmiştir. NA değerlendirilirken Çavaş ve Ergene–Gözükara [12] referans kabul edilmiş ve çift (binuclei), loblu (lobed nuclei), tomurcuklu (blebbed nuclei), çentikli (notched nuclei) ve çok sayıda (multinuclei) nukleus gibi anormallikler dikkate alınmıştır. MN kriterleri için ise Müller ve Streffer [13] ve Wolf ve Luepke [11] referans kabul edilmiştir. Buna göre özetle; nukleusa benzer, üç boyutlu, nukleusla aynı boyanma özelliğine sahip, nukleus boyutunun üçte ikisini geçmeyen, sınırları belli ve yuvarlak–oval şekilli yapılar MN olarak kabul edilmiştir.

Deneme II: Fipronil'in kronik genotoksik etkilerinin kahverengi civcivlerde belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla deneme I'de uygulanan Fipronil dozları beşe bölünmüş ve 0.02 ml hacimde ilk enjeksiyonu takiben 24., 48., 72. ve 96. saatlerde diğer enjeksiyonlar yapılmıştır. Her grupta 4–5 tane kahverengi civciv bulunan 5 grup oluşturulmuştur. Birinci gruba negatif kontrol amacıyla yalnızca 0.02 ml steril bidistile su, diğer gruplara Fipronil uygulanmıştır. Son enjeksiyondan 24 saat sonra (ilk enjeksiyondan 120 saat sonra) her bir civcivin kanat venlerinden kan örnekleri alınarak yayma preparatları hazırlanıp tespit edilmiş, deneme I'de bahsedildiği gibi periferel kan alyuvarlarındaki MN ve NA oranları belirlenmiştir.

Deneme III: Fipronil'in akut genotoksik etkilerinin beyaz civcivlerde belirlenmesi amacıyla tamamen deneme I'de bahsedildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

Deneme IV: Fipronil'in kronik genotoksik etkilerinin beyaz civcivlerde belirlenmesi amacıyla tamamen deneme II'de bahsedildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

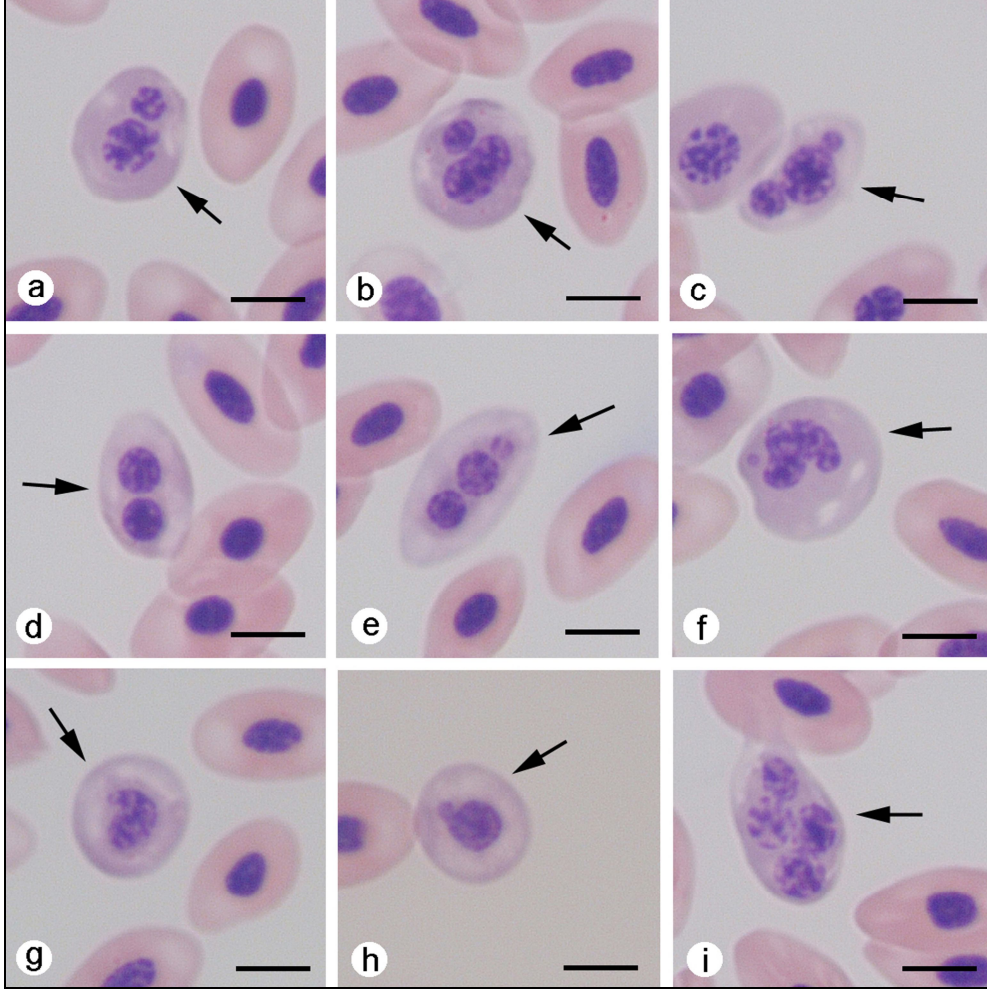
İstatistiksel analizler: Alyuvarlardaki MN ve NA oranlarına gruplar arası farkın belirlenmesi için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Grupların birbirleriyle karşılaştırılmasında Levene testi sonuçlarına göre varyansların homojen olduğu durumlarda Tukey HSD testi ve varyansların homojen olmadığı durumlarda Dunnett's T3 testi sonuçları kullanılmıştır. Yüzde oran türündeki veriler istatistiksel analizler uygulanmadan önce Açık (Arc Sinus) değerlerine transforme edilmiş, verilerin tablolaştırılmasında ise transformasyon öncesi gerçek değerler kullanılmıştır. İstatistiksel testler uygulanırken SPSS (9.0.0 versiyonu, Chicago, IL, USA) paket programından faydalanılmıştır.

Sonuçlar

Negatif kontrol grubuna ait alyuvarlar ile pozitif kontrol ve Fipronil gruplarındaki alyuvarlarda gözlenen MN ve NA'lar Şekil 1(a–i)'de görülmektedir. Akut genotoksitenin belirlenmesi için kahverengi civcivlerin kullanıldığı deneme I'den elde edilen sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir. Pozitif kontrol grupları olan CP gruplarında dozlardaki artışa paralel olarak MN ve NA oranları önemli düzeyde artış gösterirken ($p < 0.05$), fipronil grupları ile negatif kontrol grubu arasında istatistiksel olarak önemli fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

Kronik genotoksitenin belirlenmesi için kahverengi civcivlerin kullanıldığı deneme II'den elde edilen sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir. MN ve NA oranları bakımından fipronil grupları ve negatif kontrol grubu arasında önemli fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

Akut genotoksitenin belirlenmesi için beyaz civcivlerin kullanıldığı deneme III'den elde edilen sonuçlar Tablo 3'de verilmiştir. Deneme I'de olduğu gibi, pozitif kontrol grupları olan CP gruplarında dozlardaki artışa paralel olarak MN ve NA oranları önemli düzeyde artış gösterirken ($p < 0.05$), fipronil grupları ile negatif kontrol grubu arasında istatistiksel olarak önemli fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$).



Şekil 1. Cıvciv periferal kan alyuvarlarında gözlenen mikronukleuslar ve nukleus anomallikleri
a) Mikronukleuslu alyuvar b) Mikronukleuslu alyuvar c) Çift mikronukleuslu alyuvar d) Çift nukleuslu alyuvar e) Çift nukleuslu ve mikronukleuslu alyuvar f) Nukleusu loblu ve mikronukleuslu alyuvar g) Nukleusu çentikli alyuvar h) Nukleusu tomurcuklu alyuvar i) Çok nukleuslu alyuvar (Bar=5 µm).

Kronik genotoksisitenin belirlenmesi için beyaz cıvcivlerin kullanıldığı deneme IV'den elde edilen sonuçlar ise Tablo 4'de verilmiştir. MN ve NA oranları bakımından fipronil grupları ve negatif kontrol grubu arasında önemli fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Tartışma

Negatif kontrol grubuna ait cıvcivlerden hazırlanan preparatlardaki kan hücre tiplerine ait genel gözlemlerimiz Lucas ve Jamroz [14] ile uyumludur. Çeşitli araştırmalardan elde edilen sonuçlara 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 rakamsal verilerin gerekli olduğu durumlarda MN analizi oldukça iyi sonuçlar veren bir yöntem olup oldukça anlamlı sonuçlar elde edilebilir [15]. MN sayımı, lenfosit ve fibroblast kültürleri (*in vitro*) 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. Testin bir diğer modifikasyonu da *in vivo* memeli alyuvar MN testidir [16]. MN testinin balıklar üzerinde gerçekleştirilen modifikasyonları da mevcuttur [12,17]. Wolf ve Leupke [11] ise kuluçka işlemine tâbi tutulan döllü tavuk yumurtalarındaki embriyoların periferik kan alyuvarlarındaki MN oluşumunu tanımlayarak, HET–MN (Hen's Egg Test for Micronucleus Induction) olarak adlandırdıkları testi geliştirmişler ve daha sonra yaptıkları çalışmayla [18] bu testi modifiye etmişlerdir. Oldukça ucuz, basit ve hızlı bir genotoksisite testi olan bu yöntem, hayvan koruma hakları ve etik açıdan da uygun kabul edilmektedir.

Tablo 1. Kahverengi civcivlerin periferik kan alyuvarlarında uygulamadan 24 saat sonra tespit edilen MN ve NA oranları (MN, mikronukleuslu alyuvarlar; NA, nukleus anormalliği olan alyuvarlar; MN ve NA, mikronukleus ve nukleus anormalliğini birlikte bulunduran alyuvarlar; Total anormallik, mikronukleus ve nukleus anormalliklerinin toplamı).

Gruplar	Birey sayısı (n)	Her birey için değerlendirilen alyuvar sayısı	MN (%) $\bar{x} \pm SS$	NA (%) $\bar{x} \pm SS$	MN ve NA (%) $\bar{x} \pm SS$	Total anormallik (%) $\bar{x} \pm SS$
Negatif kontrol (steril bidistile su)	4	5000	0.14±0.04 ^d	0.15±0.06 ^a	0.00±0.00 ^d	0.29±0.06 ^a
Pozitif kontrol I (40 mg/kg CP)	4	5000	1.10±0.39 ^e	0.74±0.22 ^{bc}	0.25±0.17 ^e	1.90±0.42 ^b
Pozitif kontrol II (80 mg/kg CP)	4	5000	1.63±0.49 ^e	1.31±0.29 ^c	0.35±0.11 ^f	3.28±0.74 ^c
6.25 mg/kg Fipronil	4	5000	0.14±0.05 ^d	0.15±0.05 ^a	0.00±0.00 ^d	0.29±0.10 ^a
25 mg/kg Fipronil	4	5000	0.14±0.04 ^d	0.31±0.15 ^a	0.00±0.00 ^d	0.41±0.15 ^a
50 mg/kg Fipronil	4	5000	0.17±0.14 ^d	0.18±0.08 ^a	0.00±0.00 ^d	0.35±0.18 ^a
100 mg/kg Fipronil	4	5000	0.15±0.08 ^d	0.40±0.21 ^{ab}	0.00±0.00 ^d	0.55±0.25 ^a

^{abc}Aynı sütunda farklı harf bulunduran gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir (ANOVA, Tukey HSD, $p<0.05$).

^{def}Aynı sütunda farklı harf bulunduran gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir (ANOVA, Dunnett T3, $p<0.05$).

Tablo 2. Kahverengi civcivlerin periferik kan alyuvarlarında ilk uygulamadan 120 saat sonra tespit edilen MN ve NA oranları (MN, mikronukleuslu alyuvarlar; NA, nukleus anormalliği olan alyuvarlar; MN ve NA, mikronukleus ve nukleus anormalliğini birlikte bulunduran alyuvarlar; Total anormallik, mikronukleus ve nukleus anormalliklerinin toplamı).

Gruplar	Birey sayısı (n)	Her birey için değerlendirilen alyuvar sayısı	MN (%) $\bar{x} \pm SS$	NA (%) $\bar{x} \pm SS$	MN ve NA (%) $\bar{x} \pm SS$	Total anormallik (%) $\bar{x} \pm SS$
Negatif kontrol (steril bidistile su)	4	5000	0.10±0.03 [†]	0.14±0.05 [†]	0.00±0.00 [†]	0.24±0.06 [†]
1.25 mg/kg x5 Fipronil	4	5000	0.10±0.14	0.12±0.05	0.00±0.00	0.21±0.12
5 mg/kg x5 Fipronil	4	5000	0.13±0.05	0.11±0.04	0.00±0.00	0.24±0.09
10 mg/kg x5 Fipronil	4	5000	0.10±0.04	0.08±0.03	0.01±0.01	0.18±0.05
20 mg/kg x5 Fipronil ¹	–	–	–	–	–	–

[†]Aynı sütunda gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli değildir (ANOVA, $p>0.05$).

¹Bu gruptaki civcivlerin çoğunluğu öldüğü için veri mevcut değil.

Tablo 3. Beyaz cıvcivlerin periferel kan alyuvarlarında uygulamadan 24 saat sonra tespit edilen MN ve NA oranları (MN, mikronukleuslu alyuvarlar; NA, nukleus anormalliği olan alyuvarlar; MN ve NA, mikronukleus ve nukleus anormalliğini birlikte bulunduran alyuvarlar; Total anormallik, mikronukleus ve nukleus anormalliklerinin toplamı).

Gruplar	Birey sayısı (n)	Her birey için değerlendirilen alyuvar sayısı	MN (%) $\bar{x} \pm SS$	NA (%) $\bar{x} \pm SS$	MN ve NA (%) $\bar{x} \pm SS$	Total anormallik (%) $\bar{x} \pm SS$
Negatif kontrol (steril bidistile su)	4	5000	0.10±0.06 ^a	0.17±0.07 ^d	0.00±0.00 ^d	0.27±0.09 ^d
Pozitif kontrol I (40 mg/kg CP)	4	5000	0.80±0.09 ^b	0.54±0.04 ^e	0.03±0.02 ^d	1.37±0.12 ^e
Pozitif kontrol II (80 mg/kg CP)	4	5000	1.75±0.31 ^c	1.18±0.41 ^e	0.22±0.06 ^e	3.15±0.71 ^e
6.25 mg/kg Fipronil	4	5000	0.25±0.14 ^a	0.14±0.07 ^d	0.01±0.01 ^d	0.45±0.26 ^d
25 mg/kg Fipronil	4	5000	0.22±0.07 ^a	0.16±0.04 ^d	0.01±0.01 ^d	0.39±0.05 ^d
50 mg/kg Fipronil	4	5000	0.16±0.06 ^a	0.16±0.01 ^d	0.00±0.00 ^d	0.32±0.05 ^d
100 mg/kg Fipronil ¹	–	–	–	–	–	–

^{abc}Aynı sütunda farklı harf bulunduran gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir (ANOVA, Tukey HSD, $p < 0.05$)

^{de}Aynı sütunda farklı harf bulunduran gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemlidir (ANOVA, Dunnett T3, $p < 0.05$)

¹Bu gruptaki cıvcivlerin çoğunluğu öldüğü için veri mevcut değil.

Tablo 4. Beyaz cıvcivlerin periferel kan alyuvarlarında ilk uygulamadan 120 saat sonra tespit edilen MN ve NA oranları (MN, mikronukleuslu alyuvarlar; NA, nukleus anormalliği olan alyuvarlar; MN ve NA, mikronukleus ve nukleus anormalliğini birlikte bulunduran alyuvarlar; Total anormallik, mikronukleus ve nukleus anormalliklerinin toplamı).

Gruplar	Birey sayısı (n)	Her birey için değerlendirilen alyuvar sayısı	MN (%) $\bar{x} \pm SS$	NA (%) $\bar{x} \pm SS$	MN ve NA (%) $\bar{x} \pm SS$	Total anormallik (%) $\bar{x} \pm SS$
Negatif kontrol (steril bidistile su)	4	5000	0.10±0.05 [†]	0.12±0.05 [†]	0.00±0.00 [†]	0.22±0.09 [†]
1.25 mg/kg x5 Fipronil	4	5000	0.12±0.06	0.12±0.07	0.01±0.01	0.24±0.12
5 mg/kg x5 Fipronil	4	5000	0.14±0.08	0.10±0.04	0.01±0.01	0.24±0.10
10 mg/kg x5 Fipronil ¹	–	–	–	–	–	–
20 mg/kg x5 Fipronil ¹	–	–	–	–	–	–

[†]Aynı sütunda gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli değildir (ANOVA, $p > 0.05$)

¹Bu gruptaki cıvcivlerin çoğunluğu öldüğü için veri mevcut değil.

MN testinde ve kromozom anormalliklerinin belirlenmesinde cıvciv kanı ve kemik iliği kullanımına ait özellikle insektisitler üzerinde yapılan çeşitli çalışmalar mevcuttur. Jena ve Bhunya [19] mutajen mitomycin C'nin cıvciv kemik iliği kromozom anormallikleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Aynı araştırmacılar bakır sülfatın klastojenik etkisini cıvciv kemik iliği kromozom anormallikleri ile kemik iliği ve periferel kan alyuvarlarındaki MN oranlarını belirleyerek incelemişler ve bakır sülfatın genotoksik etkiye sahip olduğu sonucuna varmışlardır [20]. Bhunya ve Jena [21] organik klorlu bir insektisit olan lindane'ın genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla 5–7 günlük cıvcivlere intraperitoneal ve oral yolla uygulamışlar, uygulamanın

ardından belli süreler sonra kemik iliği hücrelerindeki kromozom anormalliklerini ve MN frekanslarını ayrıca periferik kan alyuvarlarındaki MN frekanslarını belirlemişlerdir. Yaptıkları bu çalışma ile araştırmacılar bu insektisit genotoksik olduğunu ve bu sistemin memeli sistemlerde gerçekleştirilen testlere alternatif olabileceğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar diğer iki çalışmalarında ise organik fosforlu insektisit monocrotophos'un akut ve kronik etkilerini aynı test yöntemiyle genotoksitate açısından incelemişler ve bu insektisit civciv kemik iliği hücrelerindeki kromozom anormalliklerini ve MN oranını ayrıca periferik kan alyuvarlarındaki MN oranını kontrol grubuna kıyasla artırdığını belirlemişlerdir [22,23]. Aynı araştırmacılar organik fosforlu insektisit acephate'ı da aynı test yöntemleri ile mutajenite bakımından test etmişler, elde ettikleri sonuçların daha önce elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğunu ve civciv test sisteminin memeli test sistemlerine alternatif olabileceğini bildirmişlerdir [24]. Giri ve ark. [25] organik fosforlu insektisit malathion'un genotoksik etkilerini belirlemek için benzer bir metod uygulamışlar ve malathion'un civciv kemik iliği hücrelerinde ve periferik kan hücrelerinde MN frekansını önemli düzeyde artırdığını belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar da civciv *in vivo* test sistemlerinin çevresel kirleticilerin olası genotoksik etkilerinin belirlenmesinde memeli test sistemlerine alternatif olabileceğini vurgulamışlardır.

Salmonella typhimurium/memeli mikrozom ters gen mutasyon testi (S-9 aktivasyonlu ve aktivasyonsuz), *in vitro* insan lenfosit kültürü sitotoksitate çalışmaları, Çin hamster ileri gen mutasyon testi ve fare MN testi gibi çok sayıdaki genotoksitate/mutajenite çalışmalarında Fipronil'in negatif sonuçlar verdiği gözlenmiş ve bu veriler ışığında Fipronil'in mutajenik olmadığı ve kromozom anormalliklerine sebep olmadığı sonucuna ulaşıldığı bildirilmiştir [4]. Özparlak [10]'da tavuk yumurtası mikronukleus testiyle saf fipronilin çalışılan doz seviyelerinde genotoksik etkiye sahip olmadığını belirtmiştir.

Bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar, Fipronilin ticari formülasyonunun kullanılan dozlarda hem kahverengi hem de beyaz yumurtacı civcivler üzerinde akut ya da kronik genotoksik etkiye sahip olmadığını ortaya koymasının yanında, tavuklarda pire ve kene gibi ektoparazitlerle mücadelede Fipronilin güvenilirliği hakkında ön bilgiler sağlamıştır.

Kaynaklar

1. Ishaaya, I. **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 (1998)
2. Ishaaya, I. **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 (2001)
3. Tomlin, C.D.S. **The pesticide manual 2000**. British Crop Protection Council, 12th edition (2000)
4. Tingle, C.C.D., Rother, J.A., Dewhurst, C.F., Lauer, S. and King, W.J. **Fipronil: Environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns**. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 176: 1-66 (2003)
5. Aydınoğlu, H., Dursun, H.Y. ve Bayraktar, L. **Bitki Koruma Ürünleri**. T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü Yayınları, Ankara (2002)
6. Hovda, L.R. and Hooser, S.B. **Toxicology of newer pesticides for use in dogs and cats**. Vet. Clin. Small Anim. 32: 455-467 (2002)
7. USEPA. **Fipronil. Pesticide fact sheet. EPA 737-F-96-005**. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, USA. <http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/1996ay-12/pr-736DIR/Facts/Factsheet.txt.html> (1996)
8. ACP. **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 (1999)
9. Hamon, N.M., Gamboa, H. and Garcia, J.E.M. **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 (1996)

10. Özparlak, H. **Yumurtaya Verilen Organik İnkstisit Fipronil'in Tavukların Embriyonik ve Kuluçka Sonu Erken Dönem Gelişimi Üzerindeki Zararlı Etkilerinin Belirlenmesi**. S.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya, 135 s. (2006)
11. Wolf, T. and 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)
12. Çavaş, T. and Ergene–Gözükara, S. **Evaluation of the genotoxic potential of lambda–cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells**. *Mutat. Res.–Gen. Tox. En.* 534: 93–99 (2003)
13. Müller, W.–U. and Streffer, C. **Micronucleus assays**. In: *Advances in Mutagenesis Research*. Obe, G. (ed.), Vol 5, Springer–Verlag, pp. 1–134 (1994)
14. Lucas, A.M. and Jamroz, C. **Atlas of Avian Hematology**. Agriculture Monograph 25, United States Department of Agriculture, U.S. Government Printing Office, Washington, DC (1961)
15. Savage, J.R.K. **Micronuclei: Pitfalls and problems**. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Deep/MicronucleiID20016.html> (2000)
16. USEPA. **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 (1996)
17. Çavaş, T. and Ergene–Gözükara, S. **Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver–stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto–genotoxicity indicators in Oreochromis niloticus exposed to textile mill effluent**. *Mutat. Res.–Gen. Tox. En.* 538: 81–91 (2003)
18. Wolf, T., Niehaus–Rolf, C. and Luepke, N.–P. **Some new methodological aspects of the hen's egg test for micronucleus induction (HET–MN)**. *Mutat. Res.–Gen. Tox. En.* 514: 59–76 (2002)
19. Jena, G.B. and Bhunya, S.P. **Use of chick, Gallus domesticus, as an in vivo model for the study of chromosome aberration: A study with mitomycin C and probable location of a 'hot spot'**. *Mutat. Res.* 334 (2): 167–174 (1995)
20. Bhunya, S.P. and Jena, G.B. **Clastogenic effects of copper sulphate in chick in vivo test system**. *Mutat. Res.* 367 (2): 57–63 (1996)
21. Bhunya, S.P. and Jena, G.B. **Genotoxic potential of the organochlorine insecticide lindane (γ–BHC): An in vivo study in chicks**. *Mutat. Res.* 272: 175–181 (1992)
22. Jena, G.B. and Bhunya, S.P. **Thirty day genotoxicity study of an organophosphate insecticide, monocrotophos, in a chick in vivo test system**. *In vivo* 6 (5): 527–530 (1992)
23. Bhunya, S.P. and Jena, G.B. **Studies on the genotoxicity of monocrotophos, an organophosphate insecticide, in the chick in vivo test system**. *Mutat. Res.* 292: 231–239 (1993)
24. Jena, G.B. and Bhunya, S.P. **Mutagenicity of an organophosphate insecticide acephate—an in vivo study in chicks**. *Mutagenesis* 9 (4): 319–324 (1994)
25. Giri, S., Sharma, G.D., Giri, A. and Prasad, S.B. **Genotoxic effects of malathion in chick in vivo micronucleus assay**. *Cytologia* 67: 53–59 (2002)