



Yumurtaya Verilen Siklofosfamid ve C Vitamini'nin Tavuk Embriyoları Üzerindeki Bazı Etkileri

Haluk ÖZPARLAK*, Bülent ÇELİK, Döndü BALTA

Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, KONYA

*e-mail: hozparlak@selcuk.edu.tr

Öz: Literatürdeki *in vivo* ve *in vitro* ortamda gerçekleştirilen pek çok genotoksisite-antigenotoksisite çalışmasında genotoksik bir madde olarak Siklofosfamid (CP) ve antigenotoksik bir madde olarak C vitamini (Askorbik Asit, AA) yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar alternatif bir mikronükleus testi olan tavuk yumurtası mikronükleus testinde (Hen's Egg Test for Analysis of Micronucleus Induction, HET-MN) de 50 µg/yumurta (50 µg/y) dozunda kullanılmaktadır. Bu çalışmayla 50 µg/y dozunda CP ve AA'nın tavuk embriyoları üzerindeki bazı etkilerinin ilk kez tespit edilmesi amaçlandı. Çalışma için dömlü tavuk yumurtalarından oluşan dört grup oluşturuldu. CP, AA, CP+AA birlikte ve steril bidistile su (kontrol olarak) gruplardaki yumurtaların hava kamarasına kuluçkanın 8. gününde enjekte edildi. Kuluçkanın 11. gününde her bir grubun ölü ve anormal embriyo oranları, malformasyon tipleri, canlı ve rölatif embriyo oranları tespit edildi. Ayrıca kemik gelişiminin belirlenebilmesi için embriyoların bir kısmı total olarak Alizarin Red-S yöntemiyle boyandı. Çalışma iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi. İki denemenin sonucunun birbiriyle uyumlu olduğu tespit edildi. Sonuç olarak, test edilen dozda CP, AA ve CP+AA'nın önemli bir embriyotoksik veya teratojenik etki göstermediği ve embriyoların kemik gelişimini makroskobik düzeyde etkilemediği belirlendi.

Anahtar kelimeler: Alizarin Red-S, Askorbik asit, Siklofosfamid, Tavuk Embriyosu

Some Effects of Cyclophosphamide and Vitamin C Given *in ovo* on Chicken Embryos

Abstract: In the literature, Cyclophosphamide (CP) as a genotoxic substance and vitamin C (Ascorbic Acid, AA) as an antigenotoxic substance have been used extensively in many genotoxicity-antigenotoxicity studies conducted *in vivo* and *in vitro*, and these substances at doses of 50 µg/egg are also used in Hen's Egg Test for Analysis of Micronucleus Induction (HET-MN) which is an alternative micronucleus test. The aim of this study was to determine the some effects of CP and AA at 50 µg/egg dose on the development of chicken embryos for the first time. Four groups were formed from the fertilized hen's eggs. CP, AA and CP+AA together, and sterile bidistilled water (as a control) were injected into the air sac of eggs in groups at 8th day of incubation. Following parameters of each group were examined on 11th day of the incubation: rates of dead and abnormal embryo, malformation types, live and relative embryo weights. In addition, some of the embryos were totally stained with Alizarin Red-S method for bone development. Two trials were conducted in the study. The results of the two trials were compatible with each other. As a result, CP, AA and CP+AA together at the examined doses did not present significant embryotoxic and teratogenic effects on chick embryos. They also did not affect the bone development of chicken embryos at the macroscopic level.

Keywords: Alizarin Red-S, Ascorbic Acid, Cyclophosphamide, Chick Embryo

1. Giriş

Siklofosamid (Cyclophosphamide, CP), yaygın olarak kanser tedavisinde kullanılan güçlü bir ilaçtır. CP, akut ve kronik lösemi, meme kanseri, multiplemyeloma, lenfoma, romatoidartrit tedavisinde ve kemik iliği nakillerinde sıkça kullanılır (Kumar ve Kuttan, 2005; Senthilkumar ve ark., 2006). Kemoterapiyle kanser tedavisinde, neoplastik hastalık sürecini yavaşlatmak, durdurmak ya da geriletme amacıyla antineoplastik ilaç kullanılmaktadır. Bununla birlikte kanser tedavisinde kullanılan antineoplastik ilaçların bazılarının kansere neden olduğu gerek insanlar üzerinde yapılan gözlemler gerekse hayvan deneylerinde kanıtlanmıştır (Fairchild ve ark., 1979; Kinlen ve ark., 1981; Ehrenfried ve ark., 1997; Furuta ve ark., 2000; Watanabe ve ark., 2001). Antineoplastik ilaçların en fazla kanserojenik olanları alkilleyici tipte olanlarıdır. CP alkilleyici (hızlı hücre bölünmesi geçiren dokularda hücre bölünmesini DNA üzerindeki alkilleyici etkisi sayesinde sekteye uğratan) bir antineoplastik (kansere ya da tümöre engelleyici) bir ilaçtır (Perini ve ark., 2008). CP meme kanseri, lenf sistemi kanseri, çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi gibi hastalıkların tedavisinde tek başına ya da diğer antineoplastik ajanlarla birleştirilerek kullanılmaktadır. CP bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde veya organ nakli sonrası organ reddini kontrol etmede de kullanılmaktadır (Ataya ve ark., 1989). Literatürde *in vivo* ve *in vitro* ortamda

gerçekleştirilen pek çok genotoksisite çalışmasında pozitif kontrol gruplarında genotoksik madde olarak yüksek dozda CP yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Bramwell ve ark., 1987; Blom ve ark., 1995; Moore ve ark., 1995; Wolf ve Luepke, 1997; Campana ve ark., 1999; Wolf ve ark., 2002; Çavaş ve Ergene-Gözükara, 2003; Wolf ve ark., 2003; Çavaş ve Ergene-Gözükara, 2005; Özparlak, 2006, Çavaş ve Könen, 2007; Özparlak ve ark., 2011).

C vitamini (Askorbik asit, AA) suda çözünen ve vücudumuzda depolanamayan bir vitamin çeşididir. Yapılan çalışmalar C vitamininin antijenotoksik ve antioksidan olduğunu göstermektedir (Kaya ve ark., 2002; Surjyo ve Anisur, 2004). C vitamini yapısı itibariyle reaktif bir özelliğe sahiptir. Bu özelliği sayesinde oksidan maddelerin olumsuz etkilerinden DNA, RNA, protein ve lipidleri korur yani AA serbest radikallerin olumsuz etkilerini çeşitli yollarla ortadan kaldırır (Hartman ve Shankel, 1990). AA suda kolay çözünme avantajından ve bilinen bir antioksidan olduğundan literatürde de *in vivo* ve *in vitro* ortamda gerçekleştirilen pek çok çalışmada antijenotoksik madde olarak kullanılmıştır (Goncharova ve Kuzhir 1989; Guha ve Khuda-Bukhsh, 2002; Kaya, 2003; Premkumar ve Bowlus, 2003; Ahmad ve Afzal, 2004; Surjyo ve Anisur, 2004; Ural ve ark., 2005; Landino ve ark., 2006; Guha ve ark., 2007; Könen, 2007; Akpolat ve ark., 2008; Jiraungkoorskul ve ark., 2010).

Gelişen teknoloji ile birlikte kullanımı sürekli artan ilaç, endüstriyel bileşik, pestisit ve gıda katkı maddelerinin teratojenik, mutajenik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla çok çeşitli testler uygulanmaktadır. Bu testler içinde en sık kullanılanlardan bazıları kanatlı embriyolarının kullanıldığı testlerdir. Kanatlı embriyolarıyla yapılan son yıllardaki bir çalışmada kuluçkalık dömlü tavuk yumurtalarındaki embriyoların perifer kan eritrositlerinde mikronukleus (MN) oluşumu tanımlanmış ve tavuk yumurtası mikronukleus testi (Hen's Egg Test for Micronucleus Induction, HET-MN) olarak adlandırılan yöntem geliştirilmiştir (Wolf ve Luepke, 1997). Alternatif bir MN test sistemi olan HET-MN basit, ucuz ve hızlı bir yöntem olup daha sonra Wolf ve ark. (2002) ve Wolf ve ark. (2003) tarafından modifiye edilmiş ve geliştirilmiştir. HET-MN kullanılarak yapılan tüm çalışmalarda (Wolf ve Luepke, 1997; Wolf ve ark., 2002; Wolf ve ark., 2003; Özparlak, 2006; Wolf ve ark., 2008; Greywe ve ark., 2012) bu test için pozitif kontrol grubunda genotoksik madde olarak en ideal 50 µg/yumurta (µg/y) dozunda CP kullanılması ideal olduğu rapor edilmiş ve kullanılmıştır. Tavuk embriyolarına kuluçkanın 8. gününde enjekte edilen bu dozdaki CP kuluçkanın 11. gününde embriyoların perifer kan eritrositlerinde %1.24 oranında MN oluşumuna sebep olmaktadır (Wolf ve ark., 2008). Ayrıca Çelik (2016) ve Balta (2017) HET-MN kullanarak yaptıkları çalışmalarda bu test için antigenotoksik madde grubunda 50 µg/y dozunda AA kullanımının

ideal olduğunu, bu dozdaki AA'nın MN oranını azalttığını rapor etmişlerdir. Bahsedilen literatürler ışığında bu çalışmayla 50 µg/y dozunda CP ve AA'nın tavuk embriyoları üzerindeki olası embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin ilk kez ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metod

Çalışmada ticari bir işletmeden temin edilen kahverengi renkte ATAK-S cinsi damızlıklara ait toplam 90 adet dömlü kuluçkalık özelliklerde yumurta kullanıldı. İki tekrarlı gerçekleştirilen çalışmada, birinci denemede 50 adet ve ikinci denemede 40 adet yumurta kullanıldı. Her bir deneme için Kontrol (su), CP (50 µg/y), AA (50 µg/y) ve CP (50 µg/y)+AA (50 µg/y) olmak üzere dört grup oluşturuldu. Gruplardaki yumurtalar önce tartıldı ve ağırlıkları kaydedildi. Kuluçka işlemine başlamadan önce %70'lik etanolle kuluçka makinesi dezenfekte edilip yumurtalar kuluçka makinesine uygun konumda yerleştirildi. Kuluçka gelişim makinesine (Cimuka-Prodi HB500S) sıcaklık 37.7°C'ye, nispi nem %55'e ve her saat başı yumurtalar bir kez 180° çevrilecek şekilde gerekli ayarlamalar yapılarak kuluçka işlemi başlatıldı.

Kuluçkanın 8. gününde önceden steril şartlarda hazırlanan ve 4°C'de saklanan test solüsyonlarıyla steril şartlar altında enjeksiyon işlemleri gerçekleştirildi. Enjeksiyon işlemi yapılmadan yaklaşık 12 saat önce hava kamaralarının uygun pozisyon alması amacıyla çevirme işlemi durdurularak yumurtaların küt

ucu yukarı gelecek şekilde dik pozisyona getirildi. Yumurtaların küt uçları enjeksiyon yapılmadan önce %96'lık etanolü pamukla dezenfekte edildi ve yumurta delicisi yardımıyla hava kamarasına delikler açılarak enjeksiyon işlemlerine geçildi. Kontrol (su) grubundaki yumurtalara 60 µl hacminde steril bidistile su; CP (50 µg/y) grubundaki yumurtalara 60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 50 µg CP (Sigma-C0768); AA (50 µg/y) grubundaki yumurtalara 60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 50 µg AA (Applichem-A1052,250); CP (50 µg/y)+AA (50 µg/y) grubundaki yumurtalara 60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 50 µg CP ve 60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 50 µg AA birlikte enjekte edildi. Enjeksiyon işlemi tamamlandığında daha önce açılan delikler hızlı bir şekilde sıvı parafinle kapatıldı. Enjekte edilen solüsyonların diffüze olabilmesi için ilk 1 saat yumurtalar hava kamarası yukarıda olacak biçimde dik pozisyonda bekletildi. Takiben yumurtalar kuluçka gelişim makinesine tekrar yerleştirilip kuluçka işlemine 11. güne kadar devam edildi.

Kuluçkanın 11. günü açılan yumurtalarda canlı ve ölü embriyoların gelişme evreleri Hamburger ve Hamilton (Hamburger ve Hamilton, 1951) skalasına (HH skalası) göre belirlendi. Canlı embriyolar hassas teraziyle tartıldı ve rölatif embriyo ağırlıkları (REA) aşağıda gösterilen formülle hesaplandı;

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

Elde edilen embriyolar malformasyonlar ve gelişme geriliklerinin belirlenmesi amacıyla %10'luk nötr formalinde 4°C'de saklandı. Bu embriyolarda kanat ve bacakların gelişmemesi, parmaklarda kıvrılma ve bükülmeler, tüylenmede anorallik, hemoraji, anormal gaga oluşumu, ödem, iç organların ters dönük dışarıda oluşu, tek ve çift göz anormalliği, boyun ve kalça defektleri, beyin dışarda gelişimi ve genel gelişim geriliği gibi çeşitli malformasyonların olup olmadığı öncelikle çıplak gözle daha sonra stereo mikroskopla belirlendikten sonra fotoğrafları çekildi. Her gruptan 2-3 adet embriyo kemik gelişiminin tespit edilmesi amacıyla total olarak Alizarin Red-S boyama metoduyla (Tamayo Arango ve ark., 2012) boyandı. Bu metoda göre; tespit edilmiş embriyolar bir gün %70'lik etanolde ve ardından bir gün %2'lik KOH'de bekletildikten sonra, %2'lik KOH'de taze olarak hazırlanmış %0.005-0.0025'lik Alizarin Red-S (Merc-106278) içerisinde kontrollü bir şekilde 1-2 gün süreyle boyandı. Embriyolar 1-2 gün tekrar %2'lik KOH'e alındı. Son olarak KOH (%2'lik)+gliserol+amonyak (1:1:1) karışımında 3-7 gün bekletilen embriyolar gliserole alınarak fotoğrafları çekildi.

Embriyolardan elde edilen sayısal verilere istatistiksel analiz (t-testi) uygulanmıştır.

3. Sonuçlar

Bu çalışmada kullanılan yumurtaların döllülük oranları Çizelge 1'de verilmiştir. Günlük yumurta ağırlık kaybı Kontrol gruplarında I. denemede %0.50 ve II. denemede ise %0.58 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 1).

II. denemede tüm gruplarda canlılık oranı %100 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2). I. denemede sadece CP (50 µg/y) grubundaki bir embriyoda erken embriyonik ölüm gözlenmiştir. Ancak bu ölüm enjeksiyon günü olan kuluçkanın 8. gününden çok önce gerçekleştiği için CP'nin etkisinden kaynaklanmayan bir ölüm olacağı düşünülmüş ve göz ardı edilmiştir. Dolayısıyla CP, AA ve CP+AA'nın test edilen dozlarda bir embriyonik ölüme sebep olmadığı ve tavuk embriyoları üzerinde embriyotoksik bir etki göstermediği tespit edilmiştir.

I. denemede canlı ve rölatif embriyo ağırlığı bakımından CP (50 µg/y), AA (50 µg/y) ve CP (50 µg/y)+AA (50 µg/y) gruplarıyla Kontrol grubu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir (Çizelge 2). II. denemede ise sadece canlı embriyo ağırlığı bakımından AA (50 µg/y) grubunda Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli bir azalma gözlenmiş ($p<0.05$), ancak rölatif embriyo ağırlığı bakımından istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır (Çizelge 2). Canlı embriyo ağırlığındaki bu azalmanın sadece bir denemede gözlenmesi ve rölatif

embriyo ağırlığının daha güvenilir bir sonuç yansıtması C vitaminin önemli bir embriyotoksik etki göstermediğine işaret etmektedir. Ayrıca test edilen dozda CP ve CP ile AA'nın birlikte uygulanması da tavuk embriyoları üzerinde embriyotoksik bir etki göstermemiştir.

Malformasyonlar ve gelişme geriliklerini tespit etmek için çıplak gözle ve stereo mikroskop altında yapılan gözlemlere göre, II. denemede CP (50 µg/y) grubunda ve CP (50 µg/y)+AA (50 µg/y) grubunda birer embriyonun genel gelişim geriliği gösterdiği tespit edilmiştir. I. denemede ise herhangi bir anormal embriyo gözlenmemiştir (Şekil 1-4). Ayrıca iskelet sisteminin gelişim geriliklerini incelemek amacıyla Alizarin Red-S yöntemiyle boyanan embriyolar makroskopik olarak incelenmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığı zaman bahsedilen iki gruptaki genel gelişim geriliği gösteren iki embriyo dışında diğer gruplardaki embriyoların iskelet gelişiminde önemli bir geriliğe ve herhangi bir anormalliğe rastlanmamıştır. Kemik gelişimi normal embriyolara ait bir fotoğraf Şekil 5'de görülebilir. Bununla birlikte CP (50 µg/y) grubunda genel gelişim geriliği gösteren ve Alizarin Red-S yöntemiyle boyanan embriyonun kontrol grubuna kıyasla kısmen geri kalan kemik gelişimini gösteren bir fotoğraf Şekil 6'da görülebilir. Anormal embriyo oranları ve Alizarin Red-S boyama yöntemi sonuçları göz önüne alındığında; test edilen dozlarda CP, AA ve CP ile AA'nın birlikte uygulanmasının tavuk embriyoları üzerinde önemli bir teratojenik etkiye sahip olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 1. Kuluçkanın 11. gününe ait veriler (µg/y, mikrogram/yumurta; Ort±SS, ortalama±standart sapma)

	Gruplar (Doz)	Gruptaki yumurta sayısı	Döllü yumurta sayısı	Döllülük oranı (%)	Yumurta başlangıç ağırlığı (g) (Ort±SS)	Kuluçkanın 11. gününde yumurta ağırlığı (g) (Ort±SS)	11 günlük yumurta ağırlık kaybı (%)	Günlük yumurta ağırlık kaybı (%)
I. deneme	Kontrol (Su)	12	10	83.33	59.95±2.56	56.63±2.72	5.54	0.50
	CP (50 µg/y)	13	13	100.00	61.67±3.18	57.17±3.41	7.30	0.66
	AA (50 µg/y)	12	9	75.00	60.83±3.33	53.25±6.24	7.13	0.65
	CP (50 µg/y)+AA (50 µg/y)	13	10	76.92	60.96±4.59	57.1±5.05	6.33	0.58
II. deneme	Kontrol (Su)	10	7	70.00	64.13±4.71	60.03±4.59	6.39	0.58
	CP (50 µg/y)	10	9	90.00	59.55±3.46	55.97±4.05	6.01	0.55
	AA (50 µg/y)	10	10	100.00	61.98±4.82	58.05±4.58	6.34	0.58
	CP (50 µg/y)+AA (50 µg/y)	10	8	80.00	61.35±3.84	56.60±3.85	7.74	0.70

Çizelge 2. Kuluçkanın 11. gününde embriyolara ait bazı veriler (µg/y, mikrogram/yumurta; Ort±SS, ortalama±standart sapma)

	Gruplar (Doz)	Döllü yumurta sayısı	Canlı embriyo sayısı	Canlılık oranı (%)	Canlı embriyo ağırlığı (g) (Ort±SS)	Rölatif embriyo ağırlığı (%) (Ort±SS)	Anormal embriyo sayısı	Anormal embriyo oranı (%)
I. deneme	Kontrol (Su)	10	10	100	3.27±0.26	5.73±0.30	0	0
	CP (50 µg/y)	13	12	92.31 ^e	3.30±0.18	5.75±0.50	0	0
	AA (50 µg/y)	9	9	100	3.07±0.30	5.60±0.51	0	0
	CP (50 µg/y)+AA (50 µg/y)	10	10	100	3.32±0.32	5.82±0.25	0	0
II. deneme	Kontrol (Su)	7	7	100	3.27±0.37	5.44±0.38	0	0
	CP (50 µg/y)	9	9	100	2.99±0.27	5.37±0.65	1	11.11
	AA (50 µg/y)	10	10	100	2.87±0.31*	4.95±0.51	0	0
	CP (50 µg/y)+AA (50 µg/y)	8	8	100	3.01±0.38	5.36±0.87	1	12.50

* Kontrol (Su) grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (t-test. p<0.05)

^e Bir embriyoda siklofosfamitten kaynaklanmayan erken bir embriyonik ölüm gözlenmiştir



Şekil 1. Kontrol (su) grubuna ait bir embriyonun görünümü

Şekil 2. CP (50 µg/y) grubuna ait bir embriyonun görünümü



Şekil 3. AA (50 µg/y) grubuna ait bir embriyonun görünümü

Şekil 4. CP (50 µg/y)+AA (50 µg/y) grubuna ait bir embriyonun görünümü



Şekil 5. Kontrol (su), CP (50 µg/y) ve AA (50 µg/y) gruplarına (soldan sağa doğru) ait kemik gelişimi normal embriyolar (Alizarin Red-S boyama).



Şekil 6. Kontrol (su) grubu (solda) ve CP (50 µg/y) grubuna (sağda) ait embriyolar. CP (50 µg/y) grubuna ait embriyoda kemik gelişiminin kısmen geri kaldığı dikkati çekmektedir (Alizarin Red-S boyama).

4. Tartışma

Günümüz toplumunda insanlar 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 ya da tavşanlar üzerinde ayrıntılı olarak test edilmesi gerekir. Ancak her bir yeni kimyasal bileşiğin test edilmesi mümkün görülmemektedir. Bundan dolayı 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. Bu çalışmaların uzun bir listesine Özparlak (2015)'den ulaşılabilir.

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'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.

Yukarıda bahsedilen ve benzer diğer testler ucuz ve kolay olup tekrarlanabilir sonuçlar vermekte ve kısa sürede gerçekleştirilebilmektedir. Cıvciv embriyosunun gelişim safhalarının çok iyi bilinmesi önemli diğer avantajlarıdır. Çok sayıda cıvciv embriyosunun kullanılabilmesi toksisitenin istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde memeli türlerle yapılacak çalışmalara karşı bir avantaj sağlamaktadır. Bu testler daha sonra memeliler üzerinde yapılacak çalışmalarda kullanılacak olan denek sayısını ve deneme sayısını azaltmakta, canlı bir organizmaya verilebilecek ağrı ve acıyı da en aza indirgeyerek, etik kurallara, yasal kısıtlamalara ve hayvan haklarına da aykırı düşmemektedir. Bununla birlikte tavuk embriyosu kullanılan bu modellerde plasenta ve memelilerdeki anne-fetüs ilişkisi olmaması, ayrıca bazı bileşiklerin nonspesifik bir hassasiyet göstererek hatalı pozitif sonuçlar verebilmesi dezavantajları olarak kabul edilmektedir. 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) değerlendirilebileceği belirtilmiştir (Özparlak, 2015).

Embriyotoksisite çalışmalarında kuluçka şartlarının optimum olması çalışmanın güvenilirliğini artırmaktadır. Kuluçka makinesinin nispi (%) neminin belirlenebilmesi için yumurtaların kabuklarındaki porlardan nemin buharlaşması sonucu kaybedilmesiyle oluşan ağırlık kaybı önemli bir ölçüttür. Kuluçka süresince günlük ortalama %0.55-0.70 aralığında ağırlık kaybı önerilmektedir (Mauldin, 1993). Birinci deneme kontrol grubumuzda %0.50, ikinci deneme kontrol grubunda %0.58 günlük ağırlık kaybı tespit edilmiştir ki bu oranlar önerilen değerlere yakındır ve kuluçka şartlarımızın optimum şartlara yakın olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca Romanoff (1997) 10 günlük tavuk embriyolarının 2.26 g, 11 günlüklerin 3.68 g ve 12 günlük olanların 5.07 g ağırlığında olduğunu rapor etmiştir. Bu çalışmada ise birinci ve ikinci denemelerin kontrol gruplarında embriyo ağırlıkları ortalama 3.27 g olarak tespit edilmiştir. Rapor edilen değerlere yakın olmakla birlikte aradaki farklılık yumurta büyüklüğünden veya tavuk ırklarındaki farklılıklardan kaynaklanabilir.

Tavuk embriyolarıyla yapılan çalışmalarda enjeksiyonun zamanı ve bölgesi, kullanılacak test solüsyonunun hacmi, uygulanacak doz ve bu dozlar için kullanılacak tavuk yumurtalarının sayısı, kullanılacak çözücünün cinsi ve konsantrasyonu dikkat

edilmesi gereken önemli hususlardır (Özparlak, 2015). Tavuk yumurtalarıyla yapılan testlerde test edilecek maddenin verileceği yer hava kamarası, embriyonun kaudal bölgesi, albümin ve yumurta sarısı olabilmektedir. Bu yöntemler arasında en çok tercih edilen yöntem hava kamarasına yapılan enjeksiyon yöntemidir. Uygulamasının basit olması, solüsyonun hızlı ve homojen bir şekilde diffüze olması, yumurtaların enfekte olma olasılığının düşük olması, iç basıncın artmasına bağlı olarak embriyoda oluşması muhtemel mekanik hasarların tolere edilmesi açısından hava kamarasına enjeksiyon ideal yöntem olarak göze çarpmaktadır (Prelusky ve ark., 1987; Çelik ve ark., 2000; Sur, 2001; Öznurlu, 2003).

Enjeksiyon zamanı açısından bakıldığında ise test edilmek istenilen maddenin doğal formunun etkileri belirlenmek isteniyorsa erken dönemde enjeksiyon tercih edilmektedir. Test edilecek maddenin karaciğerde metabolize edilmesiyle oluşacak metabolitlerinin etkileri belirlenmek isteniyorsa enjeksiyonun daha geç dönemde tercih edilmesi gereklidir (Jelinek ve ark., 1985; Prelusky ve ark., 1987; Özcan, 1992). Çünkü tavuk embriyosunda embriyonik dönemin 4. gününde karaciğer farklılaşması gözlenmektedir. Bu dönemden itibaren karaciğer görevlerini yerine getirmeye başlar ve detoksifikasyon olayları başlamış olur (Hamilton ve ark., 1983). HET-MN yönteminde de solüsyonların kuluçkanın 8. gününde hava kamarasına enjekte edilmesi ve

kuluçkanın 11. gününde kan örnekleri alınması optimum olarak kabul edilmiştir (Wolf ve ark., 2002). Bu sebeple bu çalışmada da HET-MN yöntemine bağlı kalınarak kuluçkanın 8. gününde hava kamarasına enjeksiyon yöntemi kullanılmıştır.

Enjeksiyon işleminde kullanılacak solüsyonlar için 3-100 µl/y arasında değişen hacimlerde solüsyonlar kullanılsa da hava kamarasına yapılacak enjeksiyonlarla ilgili olarak; Çelik ve ark. (2000) kuluçka başlangıcında 20 µl'den daha yüksek hacimdeki solüsyonunun enjeksiyonunun iç basıncı artırmasıyla zararlı etkiler oluşturabileceğini ve bunun sonucunda test maddesinin etkisini maskeleyebileceğini bildirmiştir. Döllü tavuk yumurtalarıyla yapılan bir çalışmada hava kamarasına kuluçkanın 24., 48. ve 72. saatlerinde 50 µl hacimde solüsyon verilmiştir (Wytttenbach ve Thompson, 1985). Başka bir çalışmada ise kuluçkanın hemen başlangıcında ve 12. gününde 100 µl hacim tercih edilmiştir (Varga ve ark., 2002). Diğer pek çok çalışmada ise hava kamarasına kuluçkanın 12. gününde 100 µl hacminde enjeksiyon uygulanmıştır (Varga ve ark., 1999; Varnagy, 1999; Budai ve ark., 2001; Varnagy ve ark., 2001; Budai ve ark., 2002; Fejes ve ark., 2002). HET-MN'de ise hava kamarasına enjeksiyon yönteminde kuluçkanın 8. gününde hidrofilik özellikteki test maddeleri için 100 µl hacminde ve hidrofobik test maddeleri için 50 µl hacminde enjeksiyon uygulanmıştır (Wolf ve ark., 2002). Mekanik hasarların daha az etkili olmasından dolayı kuluçkanın ilerleyen

günlerinde çok daha yüksek solüsyon hacimleri tercih edilmektedir. Bu çalışmada da kuluçkanın 8. gününde enjeksiyon hacmi olarak embriyoların tolere edebileceği düşünülen 60 µl/y ve 60 µl/y+60 µl/y toplam 120 µl/y solüsyon hacimleri tercih edilmiştir.

Toksisite testlerinde bir maddeyi test etmek için farklı dozlarının denenmesi gerekir. Brown ve ark. (1986) denemelerde en az üç farklı dozun çalışılması gerektiğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte bu çalışmada HET-MN yönteminde CP ve AA'nın genotoksik ve antigenotoksik madde olarak kullanıldığı 50 µg/y dozunun (Wolf ve ark., 2002) olası embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin ortaya konması amaçlandığı için bu doz kullanılmıştır. Ayrıca çalışmanın güvenilirliğini artırmak için denemeler iki tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

Tavuk yumurtalarıyla yapılan çalışmalarda her grup için Jelinek ve ark. (1985) 6-10 yumurta kullanmışlardır. HET-MN için de her grupta en az beş-altı yumurta kullanılmıştır (Wolf ve Luepke, 1997; Wolf ve ark., 2002). Bu çalışmada da denemelerimizde her grup için 10-13 yumurta kullanılmıştır.

Tavuk yumurtalarının kullanıldığı çalışmalarda test maddesinin uygun çözücüde çözünmesi oldukça önemlidir. Çözücü olarak %30'luk etanol, fizyolojik bidistile su, ayçiçeği yağı, %1'lik karboksimetilselüloz (CMC), %10'luk dimetilsülfoksit (DMSO) gibi maddeler kullanılmaktadır. Bu çalışmada da HET-MN'de kullanıldığı şekliyle CP ve AA

için en uygun steril bidistile su çözücü olarak kullanılmıştır.

Bu çalışmadaki her iki denemenin sonuçları birbirleriyle uyumlu bir şekilde göstermiştir ki, kuluçkanın 8. gününde döllü yumurtaların hava kamarasına ayrı ayrı ve birlikte enjekte edilen 50 µg/y dozundaki CP ve AA, 11 günlük tavuk embriyoları üzerinde

önemli bir embriyotoksik ve teratojenik etki göstermemiştir. Dolayısıyla ilk kez CP ve AA'nın bu dozlarda genotoksik ve antigenotoksik madde olarak HET-MN testinde kullanılmasının embriyotoksikite ve teratojenite açısından olumsuz bir etkisi olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Kaynaklar

- Ahmad MS, Afzal M (2004). Amelioration of genotoxic damage by certain phytoproducts in human lymphocyte cultures. *Chemico-Biological Interactions* 149: 107–115.
- Akpolat M, Tarladaçalışır YT, Kanter M (2008). İyonizan radyasyonun neden olduğu ince bağırsak hasarına karşı curcumin ve C vitamininin koruyucu etkilerinin incelenmesi. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 6: 77–85.
- Ataya KM, Valeriote FA, Ramahi-Ataya AJ (1989). Effect of cyclophosphamide on the immature rat ovary. *Cancer Research* 49: 1660–1664.
- Balta D (2017). Kültür *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst'ın genotoksik-antigenotoksik etkilerinin tavuk yumurtası mikronükleus testiyle belirlenmesi. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, Konya.
- Blom J, Tamarkin L, Shiber J, Nelson R (1995). Learned immunosuppression is associated with an increased risk of chemically-induced tumors. *Neuroimmunomodulation* 2: 92–99.
- Bramwell VH, Mouridsen H, Santoro A, Blackledge G, Somers R, Verwey J, Dombernowsky P, Onsrud M, Thomas D, Sylvester R (1987). Cyclophosphamide versus ifosfamide: final report of a randomized phase II trial in adult soft tissue sarcomas. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 23: 311–321.
- Brown LP, Flint OP, Orton TC, Gibson GG (1986). Chemical teratogenesis: testing methods and the role of metabolism. *Drug Metabolism Reviews* 17: 221–260.
- Budai P, Fejes S, Várnagy L, Somlyay I, Takács 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 (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen)* 66: 885–889.

- Budai P, Fejes S, Várnagy L, Szabo R, Keserü M (2002). Embryonic toxicity of a dimethoate containing insecticide formulation and Cu-sulphate in chicken after individual or combined administration. *Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen)* 67: 99–103.
- Campana MA, Panzeri AM, Moreno VcJ, Dulout FN (1999). Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 438: 155–161.
- Çavaş T, Ergene-Gözükara S (2003). Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 538: 81–91.
- Çavaş T, Ergene-Gözükara S (2005). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology* 74: 264–271.
- Çavaş T, Könen S (2007). Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22: 263–268.
- Çelik B (2016). Türkiye'deki yabancı *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst'ın genotoksik-antigenotoksik etkilerinin tavuk yumurtası mikronükleus testiyle belirlenmesi. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, Konya.
- Çelik I, Oguz H, Demet O, Boydak M, Donmez H, Sur E, Nizamlioglu F (2000). Embryotoxicity assay of aflatoxin produced by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. *British Poultry Science* 41: 401–409.
- Ehrenfried JA, Ko TC, Thompson EA, Evers BM (1997). Cell cycle-mediated regulation of hepatic regeneration. *Surgery* 122: 927–935.
- Fairchild W, Spence C, Solomon H, Gangai M (1979). The incidence of bladder cancer after cyclophosphamide therapy. *The Journal of Urology* 122: 163.
- Fejes S, Budai P, Varnagy L, Molnar T, Szabo R, 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 (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen)* 67: 105–109.

- Furuta K, Kakita A, Takahashi T, Tomiya T, Fujiwara K (2000). Experimental study on liver regeneration after simultaneous partial hepatectomy and pancreatectomy. *Hepatology Research* 17: 223–236.
- Goncharova R, Kuzhir T (1989). A comparative study of the antimutagenic effects of antioxidants on chemical mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 214: 257–265.
- Greywe D, Kreutz J, Banduhn N, Krauledat M, Scheel J, Schroeder KR, Wolf T, Reisinger K (2012). Applicability and robustness of the hen's egg test for analysis of micronucleus induction (HET-MN): Results from an inter-laboratory trial. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 747: 118–134.
- Guha B, Das JK, Khuda-Bukhsh AR (2007). Ameliorative effects of vitamin supplementation on ethyl methane sulphonate-induced genotoxicity in a fish, *Anabas testudineus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68: 63–70.
- Guha B, Khuda-Bukhsh A (2002). Efficacy of vitamin-C (L-ascorbic acid) in reducing genotoxicity in fish (*Oreochromis mossambicus*) induced by ethyl methane sulphonate. *Chemosphere* 47: 49–56.
- Hamburger V, Hamilton HL (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* 88: 49–92.
- Hamilton JW, Denison MS, Bloom SE (1983). Development of basal and induced aryl hydrocarbon (benzo [a] pyrene) hydroxylase activity in the chicken embryo in ovo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80: 3372–3376.
- Hartman PE, Shankel DM (1990). Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 15: 145–182.
- Jelinek R (1977). The chick embryotoxicity screening test (CHEST). *Methods in Prenatal Toxicology* 381–386.
- Jelinek R, Peterka M, Rychter Z (1985). Chick embryotoxicity screening test-130 substances tested. *Indian Journal of Experimental Biology* 23: 588.
- Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, Kosai P, MyungHuk K (2010). Micronucleus test: the effect of ascorbic acid on cadmium exposure in fish (*Puntius altus*). *Research Journal of Environmental Toxicology* 4: 103–112.
- Kaya B (2003). Anti-genotoxic effect of ascorbic acid on mutagenic dose of three alkylating agents. *Turkish Journal of Biology* 27: 241–246.

- Kaya B, Creus A, Velázquez A, Yanikoğlu A, Marcos R (2002). Genotoxicity is modulated by ascorbic acid: studies using the wing spot test in *Drosophila*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 520: 93–101.
- Kemper F, Luepke N (1986). Toxicity testing by the hen's egg test (HET). *Food and Chemical Toxicology* 24: 647–648.
- Kinlen L, Peto J, Doll R, Sheil A (1981). Cancer in patients treated with immunosuppressive drugs. *British Medical Journal (Clinical research ed.)* 282: 474.
- Könen S (2007). Trifluralin ve askorbik asit kombinasyonlarının *Oreochromis niloticus* üzerindeki genotoksik ve antijenotoksik etkilerinin mikronükleus testi kullanılarak araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Mersin*.
- Kumar K, Kuttan R (2005). Chemoprotective activity of an extract of *Phyllanthus amarus* against cyclophosphamide induced toxicity in mice. *Phytomedicine* 12: 494–500.
- Landino LM, Koumas MT, Mason CE, Alston JA (2006). Ascorbic acid reduction of microtubule protein disulfides and its relevance to protein S-nitrosylation assays. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340: 347–352.
- Mauldin JM (1993). Quality control procedures for the hatchery. *Poultry Science* 93: 1-24.
- Moore F, Urda G, Krishna G, Theiss J (1995). An in vivo/in vitro method for assessing micronucleus and chromosome aberration induction in rat bone marrow and spleen 1. Studies with cyclophosphamide. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 335: 191–199.
- Nishigori H, Mizumura M, 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: 255–265.
- Özcan M (1992). Hidrokinon'un (HK) gelişim toksisitesinin döllenmiş tavuk embriyosunda analiz ve değerlendirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi, GÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara*.
- Öznurlu Y (2003). Yumurtaya verilen Aflatoksin B1'in, etçi piliçlerin kemik dokularının embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi. *SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya*.
- Özparlak H (2006). Yumurtaya verilen organik insektisit fipronil'in tavukların embriyonik ve kuluçka sonu erken dönem gelişimi üzerindeki zararlı etkilerinin belirlenmesi. *Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya*.

- Özparlak H (2015). Tavuk embriyolarının embriyotoksisite testlerinde kullanımı. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi* 40: 13–22.
- Özparlak H, Aslan A, Güler GÖ (2011). Organik insektisit fipronil'in genotoksik etkilerinin civciv mikronukleus test sisteminde belirlenmesi. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi* 2: 1–8.
- Perini P, Calabrese M, Rinaldi L, Gallo P (2008). Cyclophosphamide-based combination therapies for autoimmunity. *Neurological Sciences* 29: 233–234.
- Prelusky D, Hamilton R, Foster B, Trenholm H, Thompson B (1987). Optimization of chick embryotoxicity bioassay for testing toxicity potential of fungal metabolites. *Journal-Association of Official Analytical Chemists* 70: 1049–1055.
- Premkumar K, Bowlus CL (2003). Ascorbic acid reduces the frequency of iron induced micronuclei in bone marrow cells of mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 542: 99–103.
- Romanoff A (1997). Life in Twenty-one Days. *Extention Bulletin*, 205.
- Senthilkumar S, Yogeeta SK, Subashini R, Devaki T (2006). Attenuation of cyclophosphamide induced toxicity by squalene in experimental rats. *Chemico-Biological Interactions* 160: 252–260.
- Sur E (2001). Yumurtaya verilen Aflatoksin B1 (AFB1)'in Tavukların Lenfoid Organlarının Embriyonal Gelişimi Üzerindeki Etkilerinin Enzim Histokimyasal Yöntemlerle Araştırılması. *Doktora Tezi, SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya*.
- Surjyo B, Anisur K (2004). Protective action of an anti-oxidant (L-Ascorbic acid) against genotoxicity and cytotoxicity in mice during p-DAB-induced hepatocarcinogenesis. *Indian Journal of Cancer* 1: 72–80.
- Tamayo Arango LJ, Suárez Avendaño PA, Cano Valderrama AI, Martínez C, Brayian A, Ciro Y, Sergio A, Mejía Giraldo CA, Lenis Sanin YY (2012). Didactic model of the chicken embryo development using modified Dawson's diaphanization and staining technique. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 25: 620–624.
- Ural M, Özgüner M, Şenal D, Sütçü R, Delibaş N (2005). Siklosporin A'nın sıçanlarda oluşturduğu nefrotoksisiteye Vitamin C ile Vitamin E'nin ve verapamilin etkilerinin ışık mikroskopunda değerlendirilmesi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 12: 28–35.
- Varga T, Cravedi J, Fuzesi I, Varnagy L (2002). Residues of fenitrothion in chick embryos following exposure of fertile eggs to this organophosphorus insecticide. *Revue De Medecine Veterinaire* 153: 275–278.

- Varga T, Hlubik I, Várnagy L, Budai P, Molnár E (1999). Embryonic toxicity of insecticide Sumithion 50 EC and herbicide Fusilade S in pheasants after individual or combined administration. *Acta Veterinaria Hungarica* 47: 123–128.
- Varnagy L (1999). Degradation of some pesticides in avian embryos. *Acta Veterinaria Hungarica* 47: 117–122.
- Varnagy L, Budai P, Molnar E, Füzesi I, Fáneci 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: 355–361.
- Watanabe M, Yamaguchi K, Chijiwa K, Tanaka M (2001). FR167653 improves survival and pulmonary injury after partial hepatectomy under ischemia/reperfusion in rats. *Journal of Surgical Research* 101: 146–151.
- Wolf T, Luepke N-P (1997). Formation of micronuclei in incubated hen's eggs as a measure of genotoxicity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 394: 163–175.
- Wolf T, Niehaus-Rolf C, Banduhn N, Eschrich D, Scheel J, 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/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 650: 150–164.
- Wolf T, Niehaus-Rolf C, Luepke N-P (2002). Some new methodological aspects of the hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 514: 59–76.
- Wolf T, Niehaus-Rolf C, 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.
- Wytenbach CR, Thompson SC (1985). The effects of the organophosphate insecticide malathion on very young chick embryos: malformations detected by histological examination. *American Journal of Anatomy* 174: 187–202.