



RESEARCH ARTICLE

Erken dönemde yumurtaya enjekte edilen flunixin megluminin embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin belirlenmesi

Murat Öznurlu¹, Yasemin Öznurlu^{2*}

¹Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı,

²Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kampüs, 42031, Konya, Türkiye

Geliş: 01.08.2016, Kabul: 21.09.2016

*yoznurlu@selcuk.edu.tr

Determination of embryotoxic and teratogenic effects of flunixin meglumine given early stage in ovo

Eurasian J Vet Sci, 2016, 32, 4, 260-267

DOI: 10.15312/EurasianJVetSci.2016422398

Öz

Amaç: Bu çalışmada, yaygın olarak kullanılan güçlü antiinflamatuar, analjezik ve antipiretik etkilere sahip olan flunixin meglumin (FM)'in yumurtaya enjekte edilerek, embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada 300 adet kuluçkalık tavuk yumurtası kullanıldı. Yumurtalar aşağıdaki gruplara ayrıldı: 1. Grup: Kontrol grubu, 2. Grup: 2.2 mg/kg FM grubu, 3. Grup: 5.5 mg/kg FM grubu ve 4. Grup: 11 mg/kg FM grubu. İnkübasyonun hemen öncesinde test solüsyonu hava kamarası yoluyla enjekte edildi. Embriyonik dönemin farklı günlerinde açılan yumurtalardan elde edilen embriyoların gelişme evreleri Hamburger-Hamilton skalasına göre tespit edilerek, embriyonik ölümlerin bu skalaya göre dağılımları belirlendi. Ayrıca embriyolardaki malformasyon tipleri, canlı ve rölatif embriyo ağırlıkları ile embriyoların tepe-kıç boyları (Crown-RumpLength, CRL) belirlendi.

Bulgular: FM verilen gruplarda mortalitelerin kontrol grubuna göre önemli derecede ($P<0.05$) yüksek olduğu tespit edildi. FM 'in yüksek doz gruplarında canlı ve rölatif embriyo ağırlıkları ile embriyoların CRL değerlerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli düzeyde azalma gösterdiği belirlendi ($P<0.05$). FM'in farklı doz gruplarında embriyonik gelişme geriliği ve farklı yapısal anomaliler gözlemlendi.

Öneri: Gebelik döneminde FM uygulamasının memelilerde de teratojeniteye neden olabileceği ifade edilebilir.

Anahtar kelimeler: Embriyotoksitesite, flunixin meglumin, tavuk embriyosu

Abstract

Aim: The aim of this study was to determine embryotoxic and teratogenic effects of flunixin meglumine (FM), a non-steroid anti-inflammatory drug used for analgesic and antipyretic, given early stage in ovo.

Material and Methods: For this purpose, 300 chicken eggs were used. The eggs were divided into the groups as follows: 1. Group: Control group, 2. Group: 2.2 mg/kg FM group, 3. Group: 5.5 mg/kg FM group and 4 Group: 11 mg/kg FM group. Test solutions were injected via air-sac just prior to the settlement of the eggs into the incubator. Eggs from each group were opened on various days of the incubation and developmental stages of embryos were determined according to the Hamburger-Hamilton scale. Also, malformation types, both live and relative embryo weights and crown-rump lengths (CRL) were determined.

Results: The mortality in the treated FM groups was found to be significantly ($P<0.05$) higher than control. The live and relative embryo weights and embryo CRL values of the FM groups were significantly lower than that of the control group ($P<0.05$). In the treated FM groups showed embryonic growth retardation and various structural abnormalities.

It may be stated administration of FM cause teratogenity in mammalian species when administered in pregnancy period.

Keywords: Embryotoxicity, flunixin meglumine, chick embryo





Giriş

Ağır metaller, gıda katkı maddeleri, endüstriyel bileşikler, ilaçlar, mikotoksinler ve pestisitlerin mutajenik, genotoksik, embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan testlerde kanatlı embriyoları sıklıkla kullanılan materyallerden biridir. Tavuk embriyosunun gelişim safhalarının çok iyi bilinmesi, fazla sayıda tavuk embriyosunun kullanılabilmesi, etkinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde memeli türlerle yapılacak çalışmalara karşı bir avantaj sağlaması nedeniyle dömlü tavuk yumurtası prenatal toksisitenin belirlenmesinde sıklıkla tercih edilmektedir. Tavuk embriyoları üzerinde yapılan embriyotoksikite çalışmasıyla (CHEST), farklı maddelerin embriyotoksik doz sınırlarıyla oluşturdukları teratojenik etkiler hakkında, hem kalitatif hem de kantitatif veriler elde edilmektedir (Jelinek ve ark 1985, Kemper ve Luepke 1986).

Fluniksın meglumin (FM) kuvvetli antienflamatuvar, analjezik, antipiretik ve antiprostaglandin etkilere sahip olan; buna karşın steroid ve narkotik özelliklerde olmayan bir bileşiktir (Lee ve Maxwell 2014, Traş ve Elmas 2016). FM, FDA (U.S. Food and Drug Administration, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) ve EMEA (European Medicines Agency, Avrupa İlaç Ajansı) tarafından at, sığır, domuz, köpek ve kedide kullanımı tavsiye edilmiştir (EMEA 2000, Traş ve Elmas 2016). FM hayvanlarda osteoarthritis, spondylosis, intervertebral disk sendromu, musko-skeletal ve viseral ağrılar, gastrointestinal kanal kolikleri, endotoksik şok, romatoidartrit, tendinitis, fibromiyozis, travmatiksinovitis, laminitis, koliform mikroorganizmaların neden olduğu mastitis, postoperatif intraoküler operasyonlarda, sinovyal sıvının viskozitesini azaltması ve katarak gelişimini önlemesi gibi birçok amaç için kullanılabilir (Lees ve Higgins 1984, Kelly 1988, Traş ve ark 1995, EMEA 2000, Traş ve Elmas 2016). FM hayvanlarda (at, sığır, köpek, kedi, tavşan, hamster, kobay, gerbil, şinşilla, rat) genel olarak 1.1-2.2 mg/kg (SID, IM, IV) dozunda kullanılmaktadır (Yazar 2010, Traş ve Elmas 2016). Üretici firmalar hedef türlerde gebelik durumunda FM kullanımını önermemekle birlikte, doğrudan hedef türler ile ilgili veriye ulaşılamamıştır. EMEA verilerine göre rat ve tavşanlarda teratojen etki gözlenmediği ifade edilirken, başka bir çalışmada ratlarda doğum sonrası hayatta kalma oranını düşürebileceği ifade edilmiştir.

Bu çalışmada, veteriner sahada çok fazla kullanılan ve güçlü antienflamatuvar etkinliği bulunan FM'nin, kuluçka başlangıcında yumurtaya enjekte edilerek, tavuk embriyosunun gelişimi üzerindeki embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada yumurtacı anaçlardan elde edilen 300 adet kuluçkalık yumurta kullanıldı. Yumurtalar enjeksiyondan önce tartıldıktan sonra kapalı bir kabinde fumigasyon işlemine tabi tutuldu (21 g potasyum permanganat + 42 mL formaldehit/m³) ve ardından 4 gruba ayrıldı. FM (Finadyne® Enj. Çöz., İntervet Veteriner İlaçları, İstanbul, Türkiye) kuluçka başlangıcında hava kamarasına ortalama 55-60 gram dömlü yumurtaya 2.2, 5.5 ve 11 mg/kg dozunda, distile su içinde enjekte edildi (Tablo 1). Araştırma prosedürü etik kurul tarafından onaylandı (SÜVFEK 2014/41).

Enjeksiyonlar Prelusky ve ark (1987) ile Öznurlu ve ark (2012)'nin bildirdikleri yöntemlere göre hava kamarası yoluyla yapıldı. Bu amaçla steril uçlu özel mikropipet (Sealpette, Jencos) kullanıldı. Yumurtanın küt ucunun dezenfeksiyonunu takiben özel yumurta delicisi ile açılan delikten girilerek 50 µL'lik test solüsyonu hava kamarasına enjekte edildi ve delik derhal sıvı parafinle kapatıldı. Bu işlemlerden sonra yumurtalar Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalındaki kuluçka makinesinde optimal koşullarda (37.8°C sıcaklık ve % 65 nispi nem) kuluçka işlemine tabi tutuldu.

Kuluçkanın 7, 11, 15, 18 ve 21. günlerinde (çıkış günü), her gruptan rastgele seçilen beşer adet yumurta açıldı. Hamburger Hamilton (1951) Skalası esas alınarak embriyoların gelişme evreleri belirlendi ve takiben embriyoların tümü hassas terazi ile tartıldı ve rölatif embriyo ağırlıkları hesaplandı [Rölatif embriyo ağırlığı = (Embriyo ağırlığı/ Yumurtanın son ağırlığı) x100]. Ardından dijital bir kumpas (Electronic Digital Caliper, 0-150 mm/6) yardımıyla embriyoların tepkik mesafeleri (Crown-Rump Length, CRL) ölçüldü. Embriyolarda meydana gelen malformasyonlar ve gelişme gerilikleri canlı ve ölü embriyolarda, genel gelişme geriliği ise sadece canlı embriyolarda değerlendirildi. Gerekli görülen embriyoların resimleri dijital olarak görüntülendi.

Tablo 1. Çalışmada oluşturulan gruplar ve bu gruplardaki yumurtalara uygulanan işlemler.

Gruplar	Yumurtalara uygulanan işlem
Grup I (Kontrol), n=35	Hiçbir işlem uygulanmadı.
Grup II (F1), n=75	Hava kamarası yoluyla FM 2.2 mg/kg dozunda enjekte edildi.
Grup III (F2), n=90	Hava kamarası yoluyla FM 5.5 mg/kg dozunda enjekte edildi.
Grup IV (F3), n=100	Hava kamarası yoluyla FM 11 mg/kg dozunda enjekte edildi.



Grupların embriyonik mortalitelerinin hesaplanmasında gruplardaki fertil yumurta sayıları esas alındı. Embriyonik mortalite verilerinin değerlendirilmesinde ki-kare testi uygulanırken (MINITAB 11.0), rölatif embriyo ve civciv ağırlığı ile tepe-kıç mesafelerinin değerlendirilmesinde ANOVA ve Tukey testi kullanıldı (SPSS 19.0.0) $P < 0.05$ değeri istatistiki açıdan önem sınırı kabul edildi.

Bulgular

Çalışmada tespit edilen infertilite ve mortalite değerleri Tablo 2'de verildi. Çalışmada kullanılan 300 adet yumurtanın 282 adedi fertil olup, ortalama infertilite oranı %6 olarak hesaplandı. Kontrol grubunda mortalite %6.06, 2.2 mg/kg FM enjekte edilen grupta %29.5; 5.5 mg/kg FM enjekte edilen grupta %25.88 ve 11 mg/kg FM enjekte edilen grupta ise %23.65 olarak bulundu. FM verilen gruplarda mortalitelerin kontrol grubuna göre önemli derecede ($P < 0.05$) yüksek olduğu tespit edildi.

Kontrol grubunda embriyonik gelişim Hamburger-Hamilton (1951) (H-H) skalasına uygun bir seyir izledi. FM'in farklı doz gruplarında doza bağlı olarak artan oranlarda embriyonik gelişme geriliği ve farklı yapısal anomaliler ortaya çıktığı gözlemlendi (Resim 1, 2). Bu anomali tipleri arasında genel gelişme geriliği yanında makas gaga ve ünilateral anoftalmi ile exencephaly, çift gaga ve parmaklarda kıvrılma ve bükülmeler en sık rastlanan anomali tipleriydi (Resim 3, 4, 5, 6). Özellikle 21. günde F2 ve F3 grubundaki hayvanlarda parmaklardaki kıvrılma ve bükülmelere bağlı olarak hayvanların ayağa kalkamaması dikkat çekiciydi (Resim 7). Kontrol ve FM verilen

gruplardaki embriyonik ölümlerin HH-38 evresinden sonra yoğunlaştığı, erken embriyonik dönemlerdeki ölümlerin ise özellikle yüksek doz grubunda (F3) ilk 25 saatlik dönemde (HH-6) olduğu dikkati çekti.

Kontrol ve FM gruplarındaki embriyoların ortalama rölatif canlı ağırlıklarının kuluçka günlerine göre dağılımları ve çıkış günü civciv ağırlıkları Tablo 3 ve 4'de verildi. FM'nin yüksek doz grubunda (11 mg/kg) embriyonik gelişimin oldukça baskılanmış olduğu (Resim 1, 2) ve bu grubun rölatif embriyo ağırlıklarının [(embriyo ağırlığı/yumurta ağırlığı) $\times 100$], belirgin bir şekilde düştüğü görüldü (Tablo 3, 4). Ayrıca FM'nin yüksek doz grubunda, vitellüs kesesinin miktarındaki fazlalık da oldukça dikkat çekiciydi (Resim 8).

Kontrol ve FM gruplarındaki embriyoların CRL değerleri Tablo 5'de verildi. Özellikle FM'nin 5.5 ve 11 mg/kg doz gruplarında CRL değerindeki düşüş dikkat çekmektedir.

Tartışma

Kanatlı embriyoları ilaçların embriyotoksik, teratojenik, mutajenik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan testlerde sıklıkla tercih edilmektedir. Döllü tavuk yumurtası kullanarak Tavuk Embriyotoksikite Belirleme Testini (Chicken Embryotoxicity Screening Test, CHEST) Jelinek 1977 yılında geliştirmiştir. Araştırmacı CHEST-I (embriyotoksik doz sınırlarının belirlenmesi) ve CHEST-II (teratojenik parametrelerin tespiti) olmak üzere iki aşamada bu testi gerçekleştirmiştir. Jelinek ve ark (1985), CHEST-I ve -II ile 130 farklı maddenin toksik etkilerini değerlendirmiş,

Tablo 2. Grupların yumurta sayıları, ölü embriyo sayıları, infertil yumurta sayıları ve infertilite hariç mortalite değerleri (%).

Gruplar	KYS	ÖES	İYS	Mortalite
Kontrol	35	2 ^b	2	6.06 ^b
F1-(2.2 mg/kg)	75	21 ^a	4	29.5 ^a
F2-(5.5 mg/kg)	90	22 ^a	5	25.88 ^a
F3-(11 mg/kg)	100	22 ^a	7	23.65 ^a

KYS: Kullanılan yumurta sayısı, ÖES: Ölü embriyo sayısı, İYS: İnfertil yumurta sayısı, a, b: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir ($P < 0.05$).

Tablo 3. Kuluçkanın farklı dönemlerinde tespit edilen ortalama rölatif embriyo ağırlıkları (% , mean \pm SD).

Gruplar	7. gün	11. gün	15. gün	18. gün
Kontrol	1.19 \pm 0.06 ^a	6.66 \pm 0.61 ^a	24.24 \pm 1.79 ^a	48.29 \pm 2.84 ^a
F1-(2.2 mg/kg)	1.25 \pm 0.16 ^a	6.47 \pm 0.67 ^{ab}	23.46 \pm 2.38 ^a	45.06 \pm 1.98 ^{ab}
F2-(5.5 mg/kg)	1.23 \pm 0.15 ^a	5.66 \pm 0.32 ^{bc}	23.61 \pm 2.14 ^a	46.79 \pm 0.57 ^a
F3-(11 mg/kg)	0.77 \pm 0.11 ^b	5.29 \pm 0.50 ^c	19.04 \pm 3.10 ^b	42.14 \pm 2.11 ^b

a, b, c: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir ($P < 0.05$).





Tablo 4. Çıkış gününde tespit edilen ortalama civciv çıkış ağırlıkları (g, mean±SD).

Gruplar	21. gün
Kontrol (g)	43.72±3.82
F1-(2.2 mg/kg)	40.62±3.12
F2-(5.5 mg/kg)	43.12±2.84
F3-(11 mg/kg)	40.77±1.77

bu maddelerden 117 tanesinde embriyotoksik etki görmüşlerdir. CHEST-I'den elde edilen sonuçların memelilere uyarlanabilmesi mümkündür. Tespit edilen embriyotoksik doz aralıklarındaki sulandırma konsantrasyonlarının 10^{-2} ile çarpılmasıyla elde edilen değer memelilerde gebe annenin canlı ağırlığının kg başına karşılık gelentoksik sınırlar olarak kabul edilir. Her ne kadar CHEST'in sonuçlarının memelilere uygulanmasında tür farklılığı söz konusu olsa da bütün türlerde gerçekleşen morfojenetik olaylar ve seyirleri ortakdır (Jelinek 1977).

CHEST'in yanı sıra dömlü tavuk yumurtası kullanılarak çeşitli modifikasyonlarla araştırmacılar Tavuk Yumurtası Testi (Hen'sEggs Test, HET), Mikronukleus İndüksiyonu için Tavuk Yumurtası Testi (Hen's Egg Test for Micronucleus Induction, HET-MN), Dömlü Tavuk Yumurtası Belirleme Testi (Hen's Fertile Egg Screening Test, HEST) gibi testler geliştirmişlerdir (Kemper ve Luepke 1986, Nishigori ve ark 1992, Wolf ve Luepke1997). Bütün bu testler ucuz, kolay, tekrarlanabilir sonuçlar vermekte ve kısa zamanda gerçekleştirilebilmektedir. Tavuk embriyosunun gelişim aşamalarının iyi bilinmesi önemli bir diğer avantajıdır. Çok sayıda tavuk embriyosunun kullanılabilmesi toksisitenin istatistiksel yönden değerlendirilmesinde memeli türlerle yapılacak çalışmalara göre bir avantaj sağlamaktadır. Ayrıca HET ve CHEST'den elde edilen sonuçların memelilerden elde edilen sonuçlarla yüksek oranda uyumlu olduğu görülmüştür (Jelinek 1977, Jelinek ve ark 1985, Kemper ve Luepke 1986, Özcan 1992, Jelinek ve Marhan 1994, Davies ve Freeman 1995, Vesely ve Vesela 1995). Ancak plasenta ve memelilerdeki anne ile fötüs arasındaki ilişkinin olmaması, bazı bileşiklerin nonspesifik bir hassasiyet göstermesi sonucunda hatalı pozitif sonuçlar verebilmesi tavuk embriyosu kullanılan bu modellerin dezavantajları olarak kabul edilmektedir (Özcan 1992).

Tablo 5. Kuluçkanın farklı dönemlerinde tespit edilen ortalama CRL uzunlukları (mm, mean±SD).

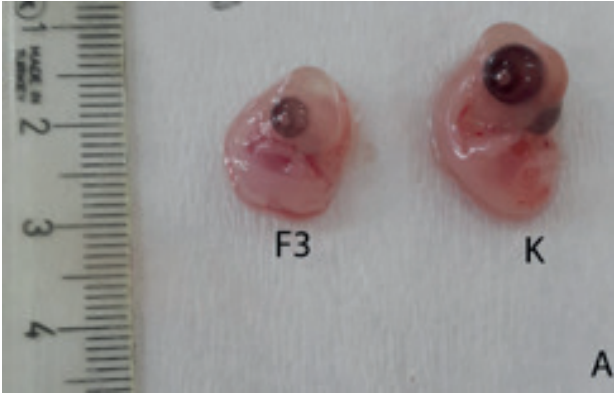
Gruplar	7. gün	11. gün	15. gün	18. gün
Kontrol	15.01±0.50 ^a	35.82±1.26 ^a	60.60±1.97	79.13±0.51 ^a
F1-(2.2 mg/kg)	14.11±1.01 ^{ab}	32.83±1.84 ^b	58.85±1.72	78.29±1.52 ^{ab}
F2-(5.5 mg/kg)	13.37±0.60 ^b	29.94±0.75 ^c	58.48±2.26	78.40±0.95 ^{ab}
F3-(11 mg/kg)	10.94±0.79 ^c	29.90±1.42 ^c	57.90±1.17	75.41±2.74 ^b

a, b, c: Aynı sütündeki farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir (P<0.05).

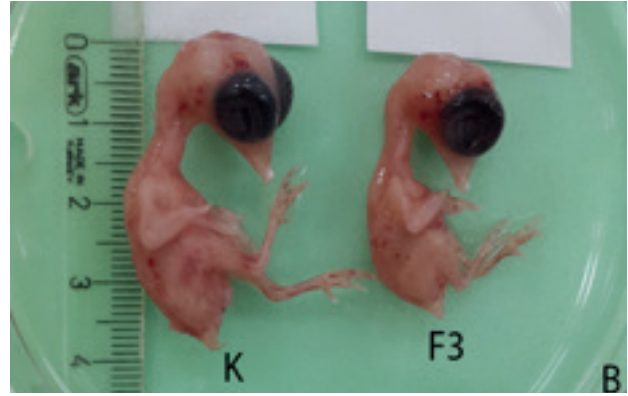
Jelinek ve Marhan (1994) CHEST'in geçerliliğini göstermek için 50 farklı kimyasal maddeyi rutin tavşan ve sıçan testlerine tâbi tutmuşlar, elde ettikleri sonuçların yaklaşık %80 oranında CHEST ile uyumlu olduğunu bildirmişlerdir. Rosenbruch (1994, 1997), tavuk yumurtası modelinin tümör biyolojisinde, göz ve mukozal toksisite çalışmalarında, ağır metallerin etkileri ve ilaçların farklı sistemler üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmalarda kullanıldığını bildirmiş, ayrıca embriyonun acıya duyarlılığının gelişmediği kuluçkanın erken evrelerinde (ilk üçte birlik dönemde) kullanımına dikkat çekmiş, böylece bu testin memeli hayvan deneylerine gerçek bir alternatif olabileceğini belirtmiştir. Bu çalışmada da farklı hayvan türlerinde (at, sığır, köpek, kedi, tavşan, hamster, kobay, gerbil, şinşilla, rat) kullanılan kuvvetli antienflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkilere sahip olan FM'in embriyotoksik etkilerinin belirlenebilmesi için dömlü tavuk yumurtalarına enjeksiyonu gerçekleştirildi.

Brown ve ark (1986) bir maddenin embriyotoksitesinin belirlenmesi amacıyla yapılacak olan çalışmalarda test edilecek maddenin en az üç farklı dozunun denenmesi gerektiğini bildirmektedir. Çelik ve ark (2000) ile Öznurlu ve ark (2012) ise AFB₁ ile gerçekleştirdikleri embriyotoksitesinde üç farklı doz kullanmışlardır. Whitsel ve ark (2002) antiepileptik bir ilaç olan valproik asitin teratojenik etkilerini belirlemek amacıyla dört farklı doz kullanırlarken; Heinrich-Hirsch ve Neubert (1991) asiklovirin, Güvenç ve ark (2013) levetirasetamin ve Çetinkal ve ark (2010) meloksikamın etkisini belirlemek amacıyla üç farklı dozu denemişlerdir. Bu çalışmada FM 2.2 mg/kg, 5.5 mg/kg ve 11 mg/kg olarak üç farklı dozda kullanılmıştır.

Embriyotoksitesinde ile ilgili farklı ağır metaller, ilaçlar, endüstriyel bileşikler, gıda katkı maddeleri, mikotoksinler ve pestisitler ile yapılmış çok sayıda araştırma mevcuttur. Çelik ve ark (2000) AFB₁'in embriyotoksik etkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada dömlü tavuk yumurtalarına kuluçka başlangıcında hava kamarasına farklı dozlarda (10 ng/yum, 100 ng/yum ve 1000 ng/yum) AFB₁ enjekte ederek, kuluçka sonunda sırasıyla %74.50, %98.03 ve %100 mortalite belirlemişlerdir. Öznurlu ve ark (2012) AFB₁'in iskelet sistemi üzerindeki etkilerini araştırdığı çalışmada ise tavuk yumurtasına hava kamarası yoluyla enjekte edilen 5 ng/yum, 15 ng/yum ve 40 ng/yum dozlarında AFB₁ 'in mortalite



Resim 1. Kuluçkanın yedinci (A) ve onbirinci gününde (B) Kontrol ve 11 mg/kg FM (F3) grubuna ait embriyolar. F3 grubuna ait embriyolarda gelişme geriliği görülmekte.



Resim 2. Kuluçkanın yedinci (A) ve onbirinci gününde (B) Kontrol ve 11 mg/kg FM (F3) grubuna ait embriyolar. F3 grubuna ait embriyolarda gelişme geriliği görülmekte.



te değerlerini kuluçka sonunda sırasıyla %19.40, %51.08 ve %84.67 olarak tespit etmişlerdir. Durmuş ve ark (2005) ise aynı metotla diş hekimliği sahasında kullanılan farklı metal alaşımların embriyotoksik etkilerini inceledikleri çalışmalarında, %10 ile %13.51 arasında mortalite tespit etmişlerdir. Özparlak ve Ünsal (2006) döllü tavuk yumurtasına organik insektisit olan fipronil 161 µg/yum, 80.50 µg/yum, 40.25 µg/yum dozlarında enjekte etmiş, kuluçka sonunda sırasıyla %41.67, % 41.67 ve %45.45 oranında mortalite belirlemiştir. Julian ve Abbott (1998) insülinin kanatlı embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerine baktıkları çalışmalarında, 0 ile 3 günlük erken periyotta caudal vertebrada anormaliteler görüldüğünü ve insülinin yüksek mortalite (%40) değerine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Tavakkoli ve ark (2014) yaptıkları çalışmada farklı dozlarda Linkospektin™ (50 mg linkomisin hidroklorüd + 100 mg spektinomisin sülfat/mL) solüsyonunu yumurta sarısına enjekte etmişler ve kuluçkanın 18. gününden sonra makroskobik ve mikroskobik olarak embriyolarda hiçbir olumsuz etkinin olmadığını tespit etmişlerdir. Antiepileptik bir ilaç olan levetirasetam farklı dozlarda, 24 saatlik inkübasyondan sonra koryoallantoik membran altına enjekte edilmiş, 48 saat daha kuluçka işlemine devam edildikten sonra makroskobik ve mikroskobik olarak nöral tüp gelişimine bakılmış, deney gruplarında embriyonik gelişimin olumsuz yönde etkilendiği ve nöral tüpün kapanmasında gecikmeler olduğu tespit edilmiştir (Özer ve ark 2012). Çetinkal ve ark (2010) meloksika-

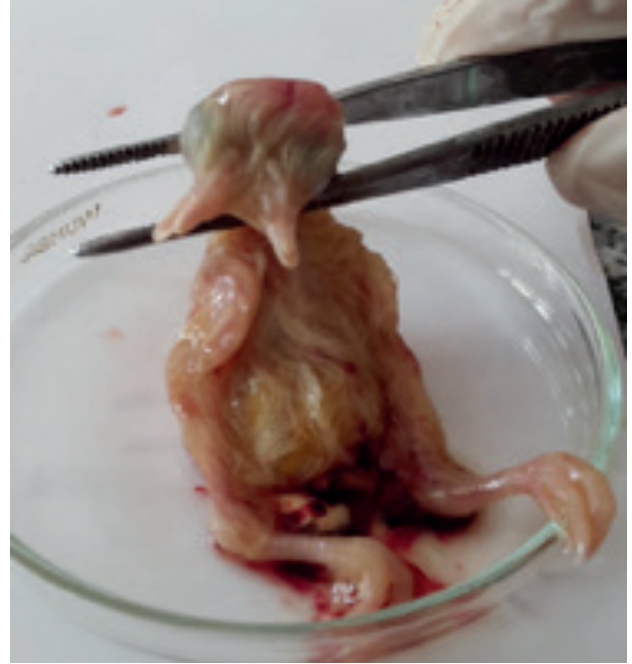
mın erken dönem civciv embriyosunda nöral tüp gelişimine etkilerini belirlemek için yaptıkları çalışmada, inkübasyonun 30. saatinde farklı dozlarda meloksikamı embriyonik disk sahasının alt kısmına enjekte etmişler ve 72 saat inkübasyona devam etmişlerdir. Meloksikamın yüksek doz gruplarında erken dönemde nöral tüp defekti insidensini arttırdığını gözlemlemişlerdir. Ancak düşük dozlarda kullanımı ile ilgili daha geniş denek sayısına ve daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu belirtmişlerdir. Vatasever ve ark (2003) tavuk embriyosu gelişimi sırasında terapotik dozlarda in ovo olarak enjekte edilen metotreksatın nöral tüp gelişimi üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve 48-72 saatlik inkübasyondan sonra embriyolarda nöral tüpün kapanmasında defektlerin olduğunu tespit etmişlerdir.

Whitsel ve ark (2002) antiepileptik bir ilaç olan valproik asitin teratojenik etkilerini belirlemek amacıyla kuluçkanın 24. saatinde embriyonik disk sahasına farklı dozlarda valproik asiti enjekte etmişler ve makroskobik olarak büyümede gecikme, göz anomalilerinin yanı sıra iskelet sisteminde de anomaliler tespit etmişlerdir. Heinrich-Hirsch ve Neubert (1991) asiklovirin kanatlı embriyonik gelişimi ve organogenezisi üzerindeki etkilerini belirlemek için, 24 saatlik inkübasyondan sonra yumurta sarısına; 2 ve 3 günlük inkübasyondan sonra ise direkt embriyoya asiklovirin farklı dozlarını enjekte etmişlerdir. asiklovirin yüksek dozlarının enjekte edildiği gruplarda %50 düzeyinde anormal gelişim ve yapısal bozuklukların olduğu saptanmıştır.

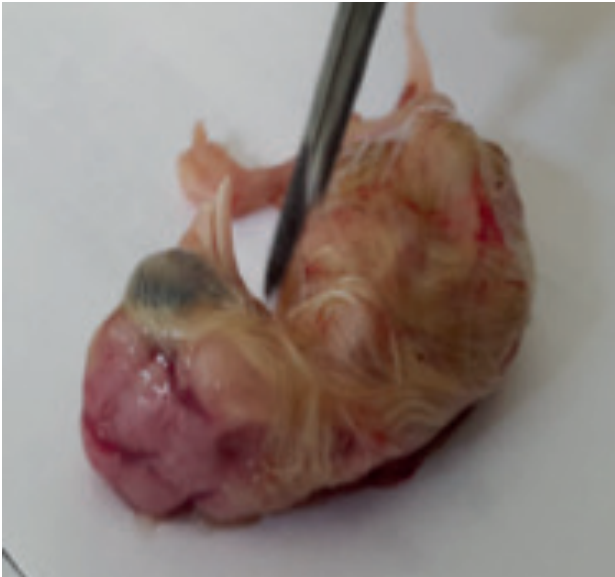




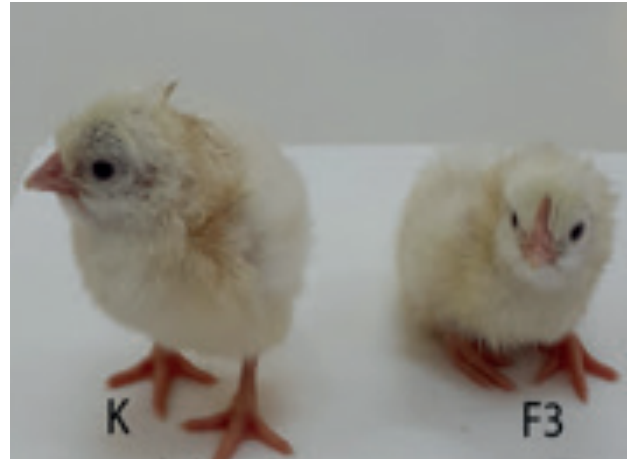
Resim 3. 11 mg/kg FM (F3) grubuna ait onbir günlük bir embriyoda karın duvarının kapanmaması.



Resim 5. 5.5 mg/kg FM (F2) grubuna ait yirmibir günlük bir embriyoda exencephaly ve çift gaga.



Resim 4. 5.5 mg/kg FM (F2) grubuna ait yirmibir günlük bir embriyoda makas gaga ve exencephaly.

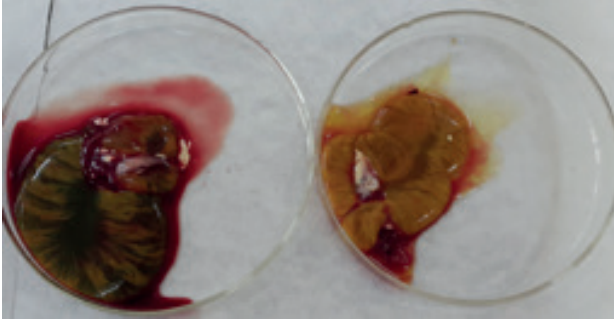


Resim 6. Kuluçkadan çıkışta Kontrol ve 11 mg/kg FM (F3) grubuna ait civcivler. F3 grubuna ait civcivde parmaklarda kıvrılma ve bükülmeye görülmekte.

Bu çalışmada, FM 2.2 mg/kg, 5.5 mg/kg ve 11 mg/kg olarak üç farklı dozda yumurtaya hava kamarası yoluyla enjekte edildi ve sırasıyla %29.5, %25.88 ve %23.65 oranında mortalite belirlendi (Tablo 1). Özellikle veteriner sahada kullanılan dozda (2.2 mg/kg) dahi kontrol grubuna göre yüksek oranda ($P<0.05$) mortalite gözlenmesi dikkat edilmesi gereken bir bulgu olarak kabul edilebilir. EMEA (2000)'da, ratlara çiftleşme sonrası 6. günden 15. güne kadar 3, 5 ve 7 mg/kg dozlarında oral olarak FM verilmiş, mortalitelerin orta ve yüksek dozda olduğu rapor edilmiştir. 3 mg/kg'lık doz materno toksisite için NOEL olarak kabul edilebileceği belirtilmiştir. Benzer şekilde çiftleşme sonrası 6. günden 15. güne



Resim 7. Kuluçkadan çıkışta 5.5 mg/kg FM (F2) grubuna ait civcivlerin parmaklarındaki kıvrılma ve bükülmeler.



Resim 8. Kuluçkanın onsekizinci gününde 11 mg/kg FM (sol) ve kontrol (sağ) ve grubuna ait embriyoların vitellüs keseleri. F3 grubundaki embriyonun vitellüs miktarının fazla oluşu dikkat çekmektedir.

kadar intramuskuler olarak günlük 2, 4 ve 6 mg/kg dozunda FM enjekte edilen ratlarda hiçbir teratojenik etkiye rastlanmamıştır. Bir başka çalışmada ise 1.5, 3 ve 6 mg/kg dozunda oral FM verilmiş, en yüksek doz verilen grubun embriyolarında canlı ağırlık artışı ve postnatal dönemde yaşamlarının önemli oranda etkilendiği belirtilmiştir. Ayrıca yüksek doz grubundaki embriyolarda kemiklerdeki ossifikasyonda gecikme insidensi de artmıştır. EMEA (2000)'da, gebe Yeni Zelanda tavşanlarında 3, 9 ve 15 mg/kg dozunda oral olarak FM uygulanmış, mortalitenin en yüksek dozda olduğu rapor edilmiştir. 9 mg/kg'lık doz maternotoksisite için NOEL olarak kabul edilmiştir.

Kuluçka süresince yumurtada günlük ağırlık kaybının %0.55-0.70 arasında olması kabul edilebilir sınırlar olarak belirlenmiştir (Mauldin 1993). Bu çalışmada kontrol grubu yumurtalarında kuluçka süresince gerçekleşen ağırlık kayıpları önerilen oranlara yakındır. Bu durum, bu çalışmada sağlanan kuluçka şartlarının optimal olduğunu göstermektedir. Kuluçka şartlarının uygunluğuna işaret eden bir diğer nokta ise çalışmada kuluçkanın 7., 11., 15. ve 18. günlerinde açılan yumurtalarda hiçbir işlem uygulanmayan kontrol grubuna ait ortalama canlı embriyo ağırlıklarının, bu günler için Romanoff (1997)'un bildirdiği değerlere oldukça yakın olmasıdır. Bu çalışmada özellikle embriyonik dönemin 7, 11, 15 ve 18. günlerinde, kontrol ve FM verilen deney gruplarının rölatif embriyo ağırlıkları ve kuluçkadan çıkış günü civiv ağırlıkları arasında önemli ($P<0.05$) farklar tespit edildi (Tablo 3, 4, Resim 1, 2).

Ayrıca FM verilen gruplarda embriyoların vitellüs kesesinin daha büyük olduğu, embriyonun vitellüsten yeterince faydalanamadığı görüldü (Resim 8). Bu durum, genel vücut gelişiminde gerilemeye, hayvanların iskelet sisteminin gelişiminin de yavaşlamasına sebep olduğu belirlendi. Bu bulgu ile ilişkili olarak etkilenen embriyoların CRL değerleri de önemli derecede ($P<0.05$) düşük bulundu (Tablo 5). Ayrıca FM'in doza bağlı olarak artan oranlarda embriyonik gelişme geriliğinin yanı sıra farklı yapısal anomalilere neden olduğu tespit edildi. Bu anomali tipleri arasında makas gaga, ünilateral anoftalmi, exencephaly, çift gaga ve parmaklarda kıvrılma ve bükülmeler sık rastlanan anomali tiplerindendir (Resim 3, 4, 5, 6, 7, 8).

Öneriler

Sonuçta döllü tavuk yumurtalarının kullanıldığı bu çalışmada, kuluçka başlangıcında yumurtalara verilen farklı dozlarda FM embriyoların gelişimini olumsuz yönde etkilemiş, iskelet sistemi bozukluklarına ve çeşitli malformasyonlara neden olmuştur. Yüksek mortalite oranı veteriner sahada kullanılan dozda da (2.2 mg/kg) tespit edilmiştir. FM'in gebe hayvanlarda kullanımı ile ilgili çalışmalar bulunmamaktadır. Bu nedenle embriyotoksisite çalışmaları ile elde edilen sonuçların memelilere uygulanmasında tür farklılığı karşımıza çıksa da bütün türlerde morfogenetik olaylar ve seyirleri ortak olduğundan, bu etken maddenin özellikle gebe hayvanlarda kullanımında kar zarar hesabının hassasiyetle yapılmasının kritik öneme sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Teşekkür

Bu çalışma Murat Öznurlu'nun Yüksek Lisans Tezinden özetlenmiştir. Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde değerli bilgilerinizi bizlerle paylaşan Prof. Dr. Enver Yazar'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Brown LP, Flint OP, Orton TC, Gibson GG, 1986. Chemical teratogenesis: Testing methods and the role of metabolism. *Drug Metab Rev*, 17, 221-260.
- Çelik I, Oguz H, Demet Ö, Boydak M, Dönmez HH, Sur E, Nizamlioglu F, 2000. Emryotoxicity assay of aflatoxin produced by *Aspergillus parasiticus* Nrrl 2999. *Brit Poult Sci*, 41, 401-409.
- Çetinkal A, Çolak A, Topuz K, Demircan MN, Şimsek N, Berber U, Umur AŞ, Selçuk M, Vatanserver HS, 2010. The effects of meloxicam on neural tube development in the early stage of chick embryos. *Turk Neurosurg*, 20, 11-116.
- Davies WJ, Freeman SJ, 1995. Chick embryotoxicity screening test (CHEST I and II). In: *Methods in Molecular Biology. In Vitro Toxicity Testing Protocols*. Eds: O'Hare S, Atterwill CK, Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA, pp: 307- 310.
- Durmus E, Inan O, Çelik I, Sur E, Özkan Y, Acar A, Aydın MF, 2005. Use of the fertilized hen's egg in the evaluation of embryotoxicity of dental alloys. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 72, 322-327.
- EMA, 2000. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014325.pdf, Erişim tarihi:29.12.2015
- Guvenc Y, Dalgic A, Billur D, Karaoglu D, Aydın S, Daglioglu E, Ozdol C, Nacar OA, Yildirim AE, Belen D, 2013. The effects of levetiracetam on neural tube development in the early stage of chick embryos. *Turk Neurosurg*, 23, 617-22.
- Hamburger V, Hamilton HL, 1951. A series of normal stages in the development of chick embryo. *J Morphol*, 88, 49-92.
- Heinrich-Hirsch B, Neubert D, 1991. Effect of aciclovir on the



- development of the chick embryo in ovo. *ArcToxicol* 65, 402-408.
- Jelinek R, 1977. The chick embryotoxicity screening test (CHEST). In: *Methods in Prenatal Toxicology*. Eds: Neubert D, Merker, HJ, Kwasigrooh TE, Georg Thieme, Stuttgart, Germany, pp: 381-386.
- Jelinek R, Marhan O, 1994, Validation of chick embryotoxicity screening test (CHEST). A comparative study. *Funct Dev Morphol*, 4, 317-323.
- Jelinek R, Peterka M, Rychter Z, 1985. Chick embryotoxicity screening test-130 substances tested. *Indian J Exp Biol*, 23, 588-595.
- Julian D, Abbott UK, 1998. An avian model for comparative studies of insulin teratogenicity. *Anat Histol Embryol*, 27, 313-321.
- Kelly MJ, 1988. The clinical use of nonsteroidal antiinflammatory drugs in the dog. XII World Conference of the World Small Animals Veterinary Association, Barcelona, Spain.
- Kemper FH, Luepke NP, 1986. Toxicity testing by the hen's egg test (HET). *Food Chem Toxicol*, 24, 647-648.
- Lee CD, Maxwell LK, 2014. Effect of body weight on the pharmacokinetics of flunixin meglumine in miniature horses and quarter horses. *J Vet Pharmacol Ther*, 37, 35-42.
- Lees P, Higgins A, 1984. Flunixin inhibits prostaglandin E2 production in equine inflammation. *Res Vet Sci*, 37, 347-349.
- Mauldin JM, 1993. Quality control procedures for the hatchery. *Poult Sci*, 93, 1-24.
- Nishigori H, Mizuura 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 Biol Toxicol*, 8, 255-265.
- Özcan, M, 1992. Hidrokinon'un gelişim toksisitesinin dölenmiş tavuk embriyosunda analiz ve değerlendirilmesi. G. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye.
- Özer F, Demirel A, Dilsiz Ö, Aydın M, Özdemir N, Uyanıkgil Y, Baka M, 2012. Effects of levetiracetam on neural tube development and closure of the chick embryos in ovo. *Childs Nerv Syst*, 28, 969-976.
- Öznurlu Y, Celik I, Sur E, Ozaydin T, Oğuz H, Altunbaş K, 2012. Determination of the effects of aflatoxin B1 given in ovo on the proximal tibial growth plate of broiler chickens: Histologic, histometric and immunohistochemical findings. *Avian Pathol*, 41, 469-477.
- Özparlak H, Ünsal S, 2006. Organik insektisit fipronil'in saf ve ticari formülasyonlarının tavuk yumurtası testiyle LD50 tayini ve embriyotoksik etkilerinin belirlenmesi. *SUFEPD*, 27, 83-98.
- Prelusky DB, Hamilton RMG, Foster BC, Trenholm HL, Thompson BK, 1987. Optimization of chick embryotoxicity bioassay for testing toxicity potential of fungal metabolites. *J Assoc Anal Chem*, 70, 1049-1055.
- Romanoff AL, 1997. Life in twenty-one days. *Extention Bulletin*, 205. <http://www.msstate.edu/dept/poultry/avianemb.htm>, Erişim tarihi:12.2.2008
- Rosenbruch M, 1994. Early stages of the incubated chicken egg as a model in experimental biology and medicine. *Altex*, 11, 199-206.
- Rosenbruch M, 1997. The sensitivity of chicken embryos in incubated eggs. *Altex*, 14, 111-113.
- Tavakkoli H, Derakhshanfar A, Salandari S, 2014. Investigation on the using of linco-spectin solution for in ovo administration in chicken embryo. *IJABBR*, 2, 110-116.
- Traş B, Elmas M, 2016. Ağrı kesici, ateş düşürücü ve yangı giderici ilaçlar, in: *Veteriner İlaç*, Ed: Yazar E, Olgun-Çelik Matbaası, Konya, Türkiye, pp: 311-342.
- Traş B, İzci C, Elmas M, 1995. Fluniksın meglumin (Finadyn)'in eklem sıvısına geçiş oranının belirlenmesi. *Eurasian J Vet Sci*, 11, 65-66.
- Vatansever HS, Umur AŞ, İnan VS, Selçuki M, 2003. The effects of methotrexate on the development of neural tube defects in the chick embryo. *Turk J Vet Anim Sci*, 27, 1119-1125.
- Vesely D, Vesela D, 1995. Embryotoxic effects of a combination of zearalenone and vomitoxin (4-dioxynivalenole) on the chick embryo. *Vet Med Czech*, 40, 279-281.
- Whitsel AI, Johnson CB, Forehand C, 2002. An in ovo chicken model to study the systemic and localized teratogenic effects of valproic acid. *Teratology*, 66, 153-163.
- Wolf T, Luepke NP, 1997. Formation of micronuclei in incubated hen's eggs as a measure of genotoxicity. *Mutat Res Gen Tox En*, 394, 163-175.
- Yazar E, 2010. Kemirgenler, in: *Egzotik Hayvan Hastalıkları ve Beslenmesi*, Ed: Maden M, Erman Ofset, Konya, Türkiye, pp:111-128.