



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ



TAVUK EMBRİYOSU GELİŞİMİ ÜZERİNE

CYFLUTHRIN ETKİSİ

Damla PİRİK

Biyoloji Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.
ANAkkALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TAVUK EMBRİYOSU
GELİŞİMİ ÜZERİNE
CYFLUTHRİN ETKİSİ

Damla PİRİK

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 01/02/2019

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Sibel HAYRETDAG

ANAkkALE

Damla PİRİK tarafından Prof. Dr. Sibel HAYRETDAG yönetiminde hazırlanan ve 01/02/2019 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Tavuk Embriyosu Gelişimi Üzerine Cyfluthrin Etkisi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. Sibel HAYRETDAG

.....

Başkan

Prof. Dr. Aynur KONYALI

.....

Üye

Doç. Dr. Belda ERKMEN

.....

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: FLY-2016-764

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Damla PİRİK

TEŐEKKÖR

Bu alıőma boyunca bana her tűrlű imkan tanıyan, çalıőmam boyunca tűm bilgi ve tecrűbelerini benimle paylaőan, benden yardımlarını esirgemeyen saygı değer danıőman hocam Prof. Dr. Sibel HAYRETDAG’a, deneylerim için gerekli laboratuvar araç-gereçlerini kullanmamda imkan sağlayan Sayın Prof. Dr. Cemal Varol TOK’a, birçok konuda yardımını esirgemeyen Sayın Arő. Gör. Dr. Mert GÖRKAN’a, laboratuvar çalıőmalarında bana yardımcı olan Merve YILMAZ’a, Batuhan Yaman YAKIN’a, hayatımın her evresinde bana maddi ve manevi destek olan babam Mesut PİRİK’e ve annem Yıldız PİRİK’e, eğitim hayatımda desteğini esirgemeyen abim Mehmet PİRİK’e sonsuz teőekkűrlerimi sunarım.

Damla PİRİK
anakkale, őubat 2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

μ	Mikron
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
μg	Mikrogram
ml	Mililitre
Kg	Kilogram
gr	Gram
mg	Miligram
g/mol	Molar kütle
ppm	Milyonda bir
pg	Pikogram
%	Yüzde oranı
L	Litre
°C	Santigrat derece
ED	Embriyonik gün
AkP	Alkalın fosfataz
AcP	Asit fosfataz
LH	Lüteinleştirici hormon
LDH	Laktat dehidrojenaz
ALT	Alanin amino transferaz
AST	Aspartat amino transferaz
HH	Hamburger ve Hamilton (1951) sıkalası
DM	Deltamethrin
C	Kontrol
O	Zeytinyağı
VitE	E vitamini
CN	Cypermethrin
CNO	Cypermethrin+zeytinyağı
CNE	Cypermethrin+E vitamini
CNOE	Cypermethrin+zeytinyağı+E vitamini
DDT	Dikloro difenil trikloroethan

LD50	Lethal doz
RNA	Ribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
B	Böbrek
d	Distal tüp
dt	Dermatom
G	Glomerulus
h	Hepatosit hücreleri
K	Kalp
KC	Karaciğer
m	Miyotom
p	Proksimal tüp
S	Sömit
s	Sinüzoidler

ÖZET

TAVUK EMBRİYOSU GELİŞİMİ ÜZERİNE CYFLUTHRIN ETKİSİ

Damla PİRİK

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Sibel HAYRETDAG

01/02/2019, 63

Bu çalışmada sentetik pyrethroidler (piretroit) içerisinde yer alan cyfluthrin pestisitinin erken embriyonik gelişim dönemindeki (3 ve 5 günlük) tavuk embriyolarına olası etkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaçla döllenmiş tavuk yumurtalarının hava boşluklarından içeriye uygulamanın başında ve bir kez, mısır yağı içinde çözündürülmüş 0,01, 0,04 ve 0,08 µg/L cyfluthrin enjekte edilmiştir. Deney düzeneği; 1 kontrol grubu, 1 yağ kontrol grubu, 3 uygulama grubundan oluşmaktadır. Her grupta 5 adet döllenmiş yumurta kullanılmıştır. Kontrol ve cyfluthrin'e maruz bırakılan embriyolar gelişimlerinin üç ve beşinci günlerinde yumurtadan çıkartılarak morfolojik ve histolojik olarak incelenmiştir. Morfolojik incelemeler sonucunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artan cyfluthrin konsantrasyonuna bağlı olarak 3 günlük embriyolarda kan adacıklarında deformasyon ve gelişim geriliği; 5 günlük embriyolarda ekstremite, beyin ve göz gelişiminde hasarlar tespit edilmiştir. Histolojik değerlendirmelerde ise cyfluthrin'in artan konsantrasyonu ile birlikte 3 ve 5 günlük embriyolardan alınan kesitlerde notokord, karaciğer, böbrek ve kalp doku hücrelerindeki bozukluklarda artma tespit edilmiştir. Sonuç olarak döllenmiş yumurta içerisine uygulanan dozlardaki cyfluthrin'in kanatlıların erken embriyonik gelişimi sırasında özellikle bazı organların gelişimi için toksik etki gösterdiğini söylemek mümkündür.

Anahtar sözcükler: Cıvcıv Embriyosu, Cyfluthrin, Embriyonik Gelişim, Teratojenik Etki

ABSTRACT

CYFLUTHRIN EFFECTS ON CHICKEN EMBRYO DEVELOPMENT

Damla PİRİK

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Biology

Advisor: Prof. Dr. Sibel HAYRETDAG

01/02/2019, 63

The aim of this study is to reveal the potential effects of cyfluthrin pesticide, a synthetic pyrethroid, on hen embryos in early development stage (3- and 5-day). For this purpose, 0.01, 0.04 and 0.08 µg/L cyfluthrin dissolved in corn oil was injected through the air holes of hen eggs for once at the beginning of the experiment. There was 1 control group, 1 lipid control group, 3 experiment group and 5 fertilized eggs were used in each group. Embryos that were exposed to control and cyfluthrin were removed from the eggs on the third and fifth days of the embryonic development and analyzed morphologically and histologically. Morphological analyses revealed deformation and growth deficiency in 3-day old embryos, and damages in extremities, brain and eye development in 5-day old embryos. Histological analyses of slices collected from 3- and 5-day old embryos showed increased defects in notochord, renal and cardiac tissue cells with the elevated concentration levels of cyfluthrin. In conclusion, cyfluthrin administered into fertilized egg can have toxic effects on the development of some organs during the early embryonic development of fowls.

Keywords: Chick Embryo, Cyfluthrin, Embryonic Development, Teratogenic Effect

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Kuş Yumurtasının Genel Yapısı	3
2.1.1.Yumurtanın Kabuğu ve Kabuk zarları	3
2.1.2. Albumin.....	4
2.1.3. Vitellus	5
2.2. Kuşlarda Embriyonik Gelişim.....	6
2.3. Kuş Embriyoları ve Toksisite.....	10
2.4. Cyfluthrin ve Özellikleri	14
2.4.1.Cyfluthrin ve Toksisite çalışmaları	15
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1. Materyal	18
3.1.1.Kuluçkalık Yumurtalar	18
3.1.2.Kimyasal.....	18
3.2.Yöntem.....	18
3.2.1. Cuyfluthrin Uygulamsı.....	18
3.2.2. Morfolojik İncelemeler.....	19
3.2.3. Histolojik İncelemeler	21
3.2.3.1. Parafin Blokların Hazırlanması	21
BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	22
4.1. Bulgular.....	22

4.1.1. Morfolojik Değerlendirmeler	22
4.1.2. Histolojik Değerlendirmeler	25
4.2. Tartışma.....	51
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	56
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	I



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Uzun eksen düzleminde kesit aracılığı ile gösterilen tavuk yumurtası yapısı	3
Şekil 2.2. Yumurta kabuğunun enine kesiti	4
Şekil 2.3. Kuş gelişim evleri (DB Lab, 2003)	9
Şekil 3.1. Embriyoların yumurtadan toplanması (özgün).....	20
Şekil 3.2. Mikrotomla seri kesit ve preperasyon işlemi (özgün)	21
Şekil 4.1. 3 günlük civciv embriyosu (Cebra-Thomas, 2004).....	22
Şekil 4.2. Yumurtaların makroskopik fotoğrafları. A: kontrol grubuna ait 3 günlük embriyo (), B: 0,01 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyoda kan adacıkları deformasyonu dolaşım sistemi hasarı (), C: 0,04 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyoda kan adaları hasarı ve gelişim geriliği (), D: 0,08 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyoda gelişim geriliği (), hemoraji.....	23
Şekil 4.3. 5 günlük civciv embriyosu (Fety, 2004)	24
Şekil 4.4. Yumurtaların makroskopik fotoğrafları. A: kontrol grubuna ait 5 günlük embriyo (), B: 0,01 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyoda beyin bölgeleri, göz, ekstremitte tomurcuklarında ve omurgada gelişim anomalisi ve geriliği (), C: 0,04 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyoda göz ve ekstremitelerde gelişim geriliği, iç kanama (), D: 0,08 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyoda ön ve orta beyin gelişmemiş, ekstremitte, omurga ve gözde gelişim geriliği ().	25
Şekil 4.5. Kontrol grubuna ait, 3 günlük total embriyo kesiti. Sömitler (S), dermatom (dt) ve miyotom (m). H&E.	26
Şekil 4.6. Kontrol grubuna ait, 3 günlük total embriyo kesiti. Karaciğer (KC), hepatosit hücreleri (h), sinüzoidler (s). H&E.	27
Şekil 4.7. Kontrol grubuna ait, 3 günlük total embriyo kesiti. Böbrek (B), distal tüp (d). H&E.	27
Şekil 4.8. Kontrol grubuna ait, 3 günlük totale mbriyokesiti. Kalp (K) kas dokusu. H&E.	28
Şekil 4.9. 0,01 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, sömitler (S), dermatom (d) ve miyotom (m). H&E.	29
Şekil 4.10. 0,01 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, karaciğer dokusu (KC), hepatosit hücreleri (h), sinüzoidler (s). H&E.....	29
Şekil 4.11. 0,01 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, böbrek dokusu (B), distal tüp (d), distal tüp epitel hücrelerinde dejenerasyon (). H&E.	30
Şekil 4.12. 0,01 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, kalp (K) kas dokusu. H&E	30
Şekil 4.13. A ve B: 0,04 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, sömitlerin (S) görünüşü, sömit gelişiminde deformasyon (), miyoblastik uzama (), vakuolizasyon (). H&E.	32
Şekil 4.14. 0,04 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, karaciğer dokusunda genişlemiş sinüzoidler (), hepatositlerde kümeleşme (). H&E.....	33
Şekil 4.15. 0,04 µg/Ldoz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, kalp (K) kas dokusunda hücre azalma ve dejenerasyon (). H&E.	33
Şekil 4.16. A ve B: 0,08 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, sömitlerin (S) görünüşü, dermatom ( d) ve miyotom (m ) hücresel farklılaşmada deformasyon. H&E.	35
Şekil 4.17.0,08 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, karaciğer (KC)	

dokusunda genişlemiş sinüzoidler (➡), hepatosit kümeleri (⊕). H&E.	36
Şekil 4.18. 0,08 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, kalp (K) dokusunda ödem oluşumu (⊕). H&E.	36
Şekil 4.19. 0,08 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, böbrek (B) dokusunda distal tüp epitel hücreleri (■). H&E.	37
Şekil 4.20. Kontrol grubuna ait, 5 günlük total embriyo kesiti. Sömitlerin (S) görünüşü, sömitlerde miyoblast uzaması (←). H&E.	38
Şekil 4.21. Kontrol grubuna ait, 5 günlük total embriyo kesiti. Karaciğer (KC), hepatosit hücreleri (h), sinüzoidler (s). H&E.	39
Şekil 4.22. Kontrol grubuna ait, 5 günlük total embriyo kesiti. Böbrek (B), distal tüp (d), proksimal tüp (p) ve glomerulus (G). H&E.	39
Şekil 4.23. Kontrol grubuna ait, 5 günlük total embriyo kesiti. Kalp (K), kas dokusu. H&E.	40
Şekil 4.24. 0,01 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, sömitlerin (S) görünüşü, sömitlerde miyoblast uzamasında hücrel deformasyon (↗). H&E.	41
Şekil 4.25. 0,01 doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, karaciğer (KC) dokusunda genişlemiş sinüzoidler (➡), hepatositlerde kümeleşme (⊕) ve kordonlaşma (✱). H&E.	41
Şekil 4.26. 0,01 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, böbrek (B) dokusunda glomerül hücrelerinde atrofi, bowman kapsül alanında genişleme (■), distal tüp ve proksimal tüpler arasında genişleme (■). H&E.	42
Şekil 4.27. 0,01 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, kalp (K) kas dokusu dejenerasyonu (↗). H&E.	42
Şekil 4.28. A ve B: 0,04 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, sömitlerin (S) görünüşü, sömitlerde nekroz oluşumu (▲). H&E.	44
Şekil 4.29. A ve B: 0,04 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, karaciğer (KC) dokusunda genişlemiş sinüzoidler (➡), hepatositlerde kümeleşme (⊕) ve kordonlaşma (✱). H&E.	45
Şekil 4.30. A ve B: 0,04 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, böbrek (B) dokusunda distal tüp ve proksimal tüpler arasında genişleme (■), distal tüplerde atrofi (◆). H&E.	46
Şekil 4.31. 0,04 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, kalp (K) kas dokusunda vakuolizasyon (○) ve ödem oluşumu (⊕). H&E.	47
Şekil 4.32. A ve B: 0,08 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, sömitlerin (S) görünüşü, sömitlerde nekroz oluşumu (▲) ve genel yapıda kanama. H&E.	48
Şekil 4.33. A ve B: 0,08 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, karaciğer dokusunda genişlemiş sinüzoidler (➡), hepatositlerde kümeleşme (⊕) ve kordonlaşma (✱), hepatositlerde nekroz (▼), eritrosit (●). H&E.	49
Şekil 4.34. A ve B: 0,08 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, böbrek doku glomerül hücrelerinde atrofi, bowman kapsül alanında genişleme (■), glomerül ücrelerinde, distal ve proksimal tüplerde epitel hücre nekrozu (◆). H&E.	50
Şekil 4.35. 0,08 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, kalp kas dokusu dejenerasyonu ve hemaraji (↗). H&E.	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Albumin içeriği.....	5
Çizelge 2.2. Vitellusun içeriği	5
Çizelge 3.1. Deneyssel plan deseni	19



BÖLÜM 1

GİRİŞ

Pestisitler, zirai alanda kullanımı tercih edilen çeşitli kimyasal madde ve preparatlardır. Bulundukları alanlarda var olan zararlı organizmaları yok etmek, kontrol altında tutmak ya da zararlı etkilerini azaltmaya yönelik olarak kullanılmaktadır. Olumsuz etki gösteren organizmalar, insanların besinlerine, ürünlerine zarar veren, hastalık yayan böcek, bitki patojenleri, yabani otlar, yumuşakçalar, kuşlar, memeliler, balıklar ve sürüngenler olabilmektedir. Pestisitlerin uygun kullanımı yararlı olsa da insanlar ve diğer canlılar için potansiyel toksisiteden dolayı sorunlara yol açabilmektedir. Bilinçli ve bilinçsiz olarak çevreye bırakılan pestisitler hava, su, toprak, yağmur, sis, kar, buz ve yüzey sularında bulunabilir. Bundan dolayı canlılar pestisitlerden çeşitli şekillerde etkilenebilmektedirler (Anonim, 2012).

Son yıllarda, pestisit grupları içerisinde yer alan piretroitlerin (pyrethroid) kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Bu gruba dahil pestisitler; tarım arazileri, antifungal ajanlar, kemiriciler ve böceklerle mücadelede kullanıldığı gibi, hayvanların taşıyıcı olduğu vektör hastalıklarıyla mücadelede, rodentlere karşı ve kişisel olarak evlerin içlerinde ve bahçelerde yaygın kullanıma sahiptir. Bu yaygın kullanım, hedef olmayan canlılar üzerinde de olumsuz etkilere yol açabilmektedir (Cox, 1994).

Belediyeler ile Sağlık Bakanlığı'nın yaptığı incelemeler ve çalışmalar sonucunda çevre ilaçlaması ve halk sağlığını koruma amacıyla etkili bir şekilde kullanılan sentetik piretroitlere insan ve hayvanların sürekli maruz kalmasının kaçınılmaz olduğu belirtilmiştir. İncelemeler ve çalışmalar deney hayvanları ve memelilerde akut ve subakut zehirlilik bakımından güvenli olan bu maddelerin, uzun süreli maruziyeti durumunda aynı ölçüde güvenli olamayacağını göstermiştir (Yavuz ve ark., 1996). Rat ve farelerde yapılan çalışmalarda sentetik piretroit grubuna dahil olan bazı pestisitler; lenf, tiroid ve akciğer tümörlerine yol açabileceğini göstermektedir (Cabral ve Galendo, 1990; Cabral ve ark., 1990; Ishmael ve Lilchfield 1988).

Sentetik piretroit grubunda yer alan cyfluthrin; nispeten yeni bir insektisittir. Memeli türleri için güvenli olarak kabul edilmektedir. Ancak, cyfluthrin kullanımı incelendiğinde olumsuz etkileri ortaya çıkmaktadır (Cox, 1994).

Yapılan literatür taramalarında cyflutrin'in kuşlardaki embriyotoksik ya da teratojenik etkilerini ortaya koyan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Oysa kuşlar pek

çok özellikleri açısından embriyonik çalışmalarda bir model organizma olarak kabul edilmektedir. Kuş embriyolarının plesantaya sahip olmamaları, kimyasal ajanların kolay uygulanabilirliği, kısa sürede sonuçların gözlenebilmesi ve gelişim aşamaları hakkında oldukça yeterli bilgiye sahip olunması dolayısıyla; embriyotoksik, teratojenik, mutajenik ve genotoksik etkilerin belirlenmesi için yapılan testlerde sıklıkla tercih edilen bir gruptur (Jelinek, 1977). Özellikle prenatal toksisitenin belirlenmesinde memeli türleri ile yapılacak çalışmalara oranla kolaylık sağladığından, toksisite deneylerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Davey ve Tickle, 2007; Cebra-Thomas, 2004)

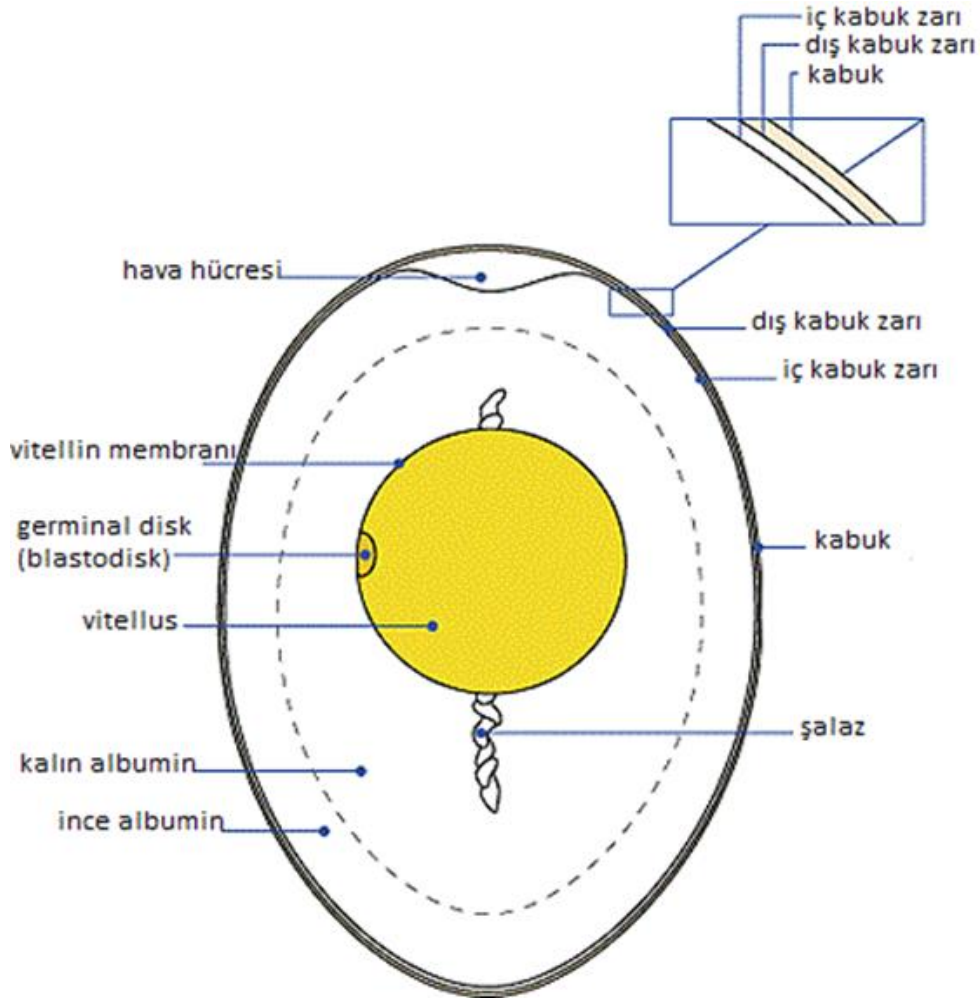
Bugüne kadarki literatürlerden elde edilen bilgilerden, cyfluthrin kullanımının çevre kirliliğinde artışa sebep olabileceği ve bu durumun organizmaları olumsuz etkileyebileceğini söylemek mümkündür. Deneysel çalışmalar için model organizma olan tavuk embriyosu üzerinde cyfluthrin'in etkisine yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamış olması sebebiyle planladığımız bu çalışmada; bir insektisit olan cyfluthrin'in, tavuk embriyosunda, erken gelişim dönemi üzerine etkilerinin, morfolojik ve histolojik değerlendirmeler ile ortaya konulması amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Kuş Yumurtasının Genel Yapısı

Kuş yumurtası, hacimsel olarak geniş orana sahip vitellus, daha az yer kaplayan ve vitellusun etrafını saran albümin, kabuk zarları ve kalsifiye kabuk olmak üzere 4 temel yapıdan oluşur (Şekil 2.1).



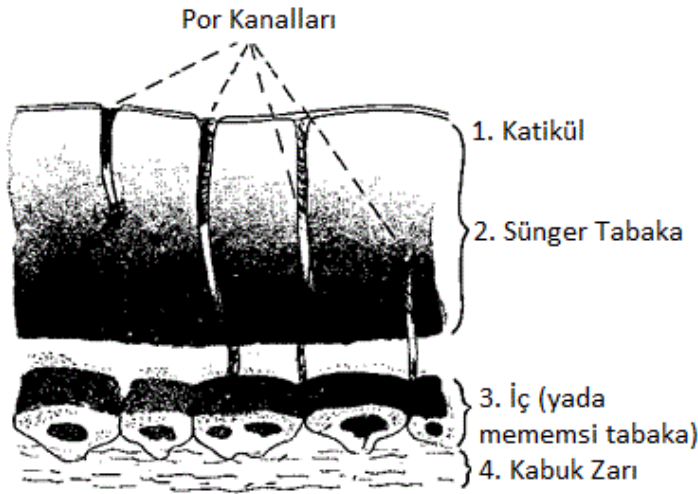
Şekil 2.1. Uzun eksen düzleminde kesiti gösterilen tavuk yumurtası yapısı (Ritchisong, 2017)

2.1.1. Yumurtanın Kabuğu ve Kabuk Zarları

Kuş yumurtası dişi bireylerin besinlerle aldıkları kalsiyum tuzlarının uterus bezinde yumurtaya eklenmesiyle kireç kabuk oluşur. Kireç kabuk yaklaşık 20 saatte meydana gelmektedir. Kabuk katmanlara sahiptir, bunlar (Patten, 1971; Smith, 1997):

1. Mememsi iç tabaka
2. Süngerimsi ara tabaka
3. Yüzeydeki katikül tabaka

Kabuk yapısının %94'ü kalsiyum karbonattır, az miktarda magnezyum karbonat, kalsiyum fosfat, organik maddeler ve fosfor vardır. Kabuğa rengini veren özellik ise genotipin kendine has bileşiminde farklı renk maddeleri barındırmasıdır. Yumurta kabuğunun katikül tabakasında bulunan gözenekler (porlar) gaz ve nem alış-verişini sağlar (Patten, 1971; Türkoğlu ve Sarıca, 2004).



Şekil 2.2. Yumurta kabuğunun enine kesiti (Ritchisong, 2017)

Yumurta zarı iki tabakadan oluşur. Kalın tabaka (40-60 μ) kabuğun hemen altında olup iç yapısını sarar, kabuk ile ince tabaka arasında yer alır. İnce tabaka (13-17 μ) ise albumini sarar, kalın tabaka ile albumin arasında kalır. Glikoprotein yapıdaki zar gaz geçişini engellemez. Fakat bakterilerin yumurta içerisine girerek kontamine olmasını engeller (Hamilton, 1952; Türkoğlu ve Sarıca 2004). Yumurta kloaktan dışarı atıldığında sahip olduğu ısı 41°C'dir. Dışarıda hızla soğumaya başlar, soğumayla birlikte büzülme meydana gelir ve dışarıdan hava almaya başlar. Bu sırada dış tabaka ve iç tabaka arasına

yoğun olarak giren hava etkisiyle küt uça hava boşluğu oluşur (Patten,1971; Hamilton, 1952; Türkoğlu ve Sarıca, 2004).

2.1.2. Albumin

Albumin hemen hemen homojen yapıdadır. Albumin ovidukt kısmında sentezlenir. Albuminde bulunan proteinler ovalbumin (%75), ovomukoid (%13), ovomusin (%7), ovokanal albumin (%3) ve ovoglobulin (%2)'dir. Ovomukoid ve ovomusin, glikoprotein (karbonhidrattan kombine), diğerleri yalnızca proteindir. Vitellin zara spiral şekilde bağlı yoğun bir tabaka olan küt uca ve dar uca doğru bağlanmış iki şalaz vardır. Bu iki şalaz ters yöne bükülerek vitellusun korunmasını sağlar. Albumin embriyo gelişimi için besin sağlarken aynı zamanda mekanik ve kimyasal etkilerden korur.

Çizelge 2.1. Albumin içeriği (Hamilton, 1952)

gr'daki miktar	Toplam	%
Toplam.....	32.9	100.0
Su.....	28.9	87,9
Katı.....	4.0	12.1
Organik maddeler.....	3.8	11.5
Proteinler.....	3.5	10.8
Yağlar.....	eser	--
Karbonhidratlar.....	0,3	0.6
İnorganik maddeler.....	0.2	0.6

2.1.3. Vitellus

Vitellusun büyük bir kısmını yağlar oluşturmaktadır ve embriyo için önemli bir gıda kaynağıdır. Bunlar; gliseritler (%62,3), fosfolipidler (%32,8), kolesterol (%4,9) ve eser miktarda bulunan serobrosittir. Vitellusa ait iki protein bilinir, bunlardan biri, toplam proteinin %77'sini oluşturan ovovitellin ve sülfür içeriği yüksek fosfoprotein grubudur. Değeri %23'ünü oluşturan ovolivetindir. Vitellus karbonhidratları, glukoz (%70), fosfolipidlerle kombine polisakkaritler, fosfoproteinler ve serebrositlerden oluşur. Diğer organik bileşikler pigment içerenler (karotenler, ksantofiller, riboflavin vs), vitaminler ve enzimlerdir (Hamilton,1952; Patten,1971).

Çizelge 2.2. Vitellusun içeriği (Hamilton, 1952)

gr'daki miktarı	Toplam %
Toplam.....18.7	100,0
Su.....9.1	48.7
Katı.....9.6	51.3
Organik maddeler.....9.4	50.2
Proteinler.....3.1	16.6
Yağlar.....6.1	32.6
Karbonhidratlar0.2	1.0
İnorganik maddeler.....0.2	1.1

Vitellus ve blastoderm vitellin zarı ile sarılmıştır. Vitellus beyaz ve sarı halka olarak iki farklı yapı içerir. Beyaz vitellusun birikimi latebra adı verilen merkezi bölgede olur. Latebra germinal diski (blastodisk) yumurtanın merkezine bağlayan kanaldır ve embriyonun beslenmesinde rol alır. Döllü yumurtalarda germinal disk embriyonun gelişmeye başladığı kısımdır. Germinal disk dölsüz yumurtalarda düzensiz bulunurken, döllü yumurtalarda düzenli, iri ve yuvarlaktır. Bu bölge blastoderme doğru yayılır ve pander çekirdeği olarak bilinen bir kitlenin altında bulunur. Latebra ve pander çekirdeğine ilave olarak sarı vitellusun daha kalın tabakaları arasında beyaz vitellusun ince tabakaları vardır. Vitellus en dışta olan vitellin zarı ile çevrilidir. Bu zar ince, kuvvetli ve renksiz bir zar olup vitellusun albumin içerisinde dağılmasını önler. Blastoderm hücreleri tarafından emilen vitellus yüksek oranda besin oranına sahiptir (Hamilton, 1952; Patten, 1971; Türkoğlu ve Sarıca, 2004).

2.2. Kuşlarda Embriyonik Gelişim

Kuş yumurtalarında embriyo gelişimi yumurtanın döllenmesiyle başlayıp yumurtlamaya kadar devam eder. Yumurta dış ortama bırakıldığında soğuma düzeyine göre minimuma iner ve şartlar uygun hale geldiğinde süreç devam eder. Çiftleşme gerçekleşikten sonra sperm hücreleri infundibulumu hareket eder ya da sperm tüplerinde depolanır. LH (luteinleştirici hormon) salgısının etkisiyle sperm yumurtayı dölemek üzere infundibulumu ilerlerler. Bol miktarda vitellus içeriğine sahip kuş yumurtasında bölünme ve gelişmeler az miktarda sitoplazma ve çekirdeğin bulunduğu animal kutupta

gerçekleşir. Hücre bölünmesi döllenmeden hemen sonra başlar, yumurtanın geri kalanı şekilleninceye kadar devam eder. Bölünme yarıklanma şeklinde gerçekleşir. Zigotun ilk bölünmesi yumurta istmustan geçerken tamamlanır. Bölünmeler 20 dakikada bir meydana gelir ve bölünmelerle yoğunlaşan hücre tabakası gastrulayı meydana getirir (Romanoff, 1997).

Kuluçka başladıktan sonra kalınlaşmaya başlayan hücre tabakası embriyonun kuyruk bölgesinde oluşmasıyla, primitif çizgi adını alır (Romanoff, 1997). Kuluçkanın 1. günü primitif çizgi meydana gelir (Türkoğlu ve Sarıca, 2004). Gelişimin ilerlemesi ile embriyonun başı ayırt edilebilir, sindirim sisteminin öncüsü ön barsak şeklini almaya başlar, kan adacıkları görünür ve nöral oluğu meydana getirecek olan yarık oluşur (Romanoff, 1997; Özparlak, 2006).

İkinci gün nöral oluk şekillenir ve baş gelişir. Kulak gelişmeye başlar ve göz mercekları oluşur. Kalp gelişimi gerçekleşirken, kan adacıkları birbirleriyle bağlantılar kurarak vasküler sistemi meydana getirir. Gelişimin 44. saatinde kalp ve damar sistemi arasında bağlanma gerçekleşir ve kalp atmaya başlar. Embriyonun gelişimi ile iki farklı dolaşım sistemi oluşur. Bunlardan ilki embriyo içi meydana gelen embriyonik sistem, ikincisi ise yumurta içinde oluşan ve yayılan vitellin sistemdir. Gelişimi devam eden embriyo evrelerinde iki farklı embriyo dışı dolaşım sistemi vardır. Oluşan vitellin sistem embriyoya besin aktarımı sağlar. Bir diğer dolaşım sistemi olan allantoik damarlardan oluşan sistemi ve allantoisteki atık ürünlerin saklanması ile ilgilidir. Embriyo gelişimini tamamlayıp yumurtadan çıktığında her iki dolaşım sistemi de işlevini kaybeder (Romanoff, 1997).

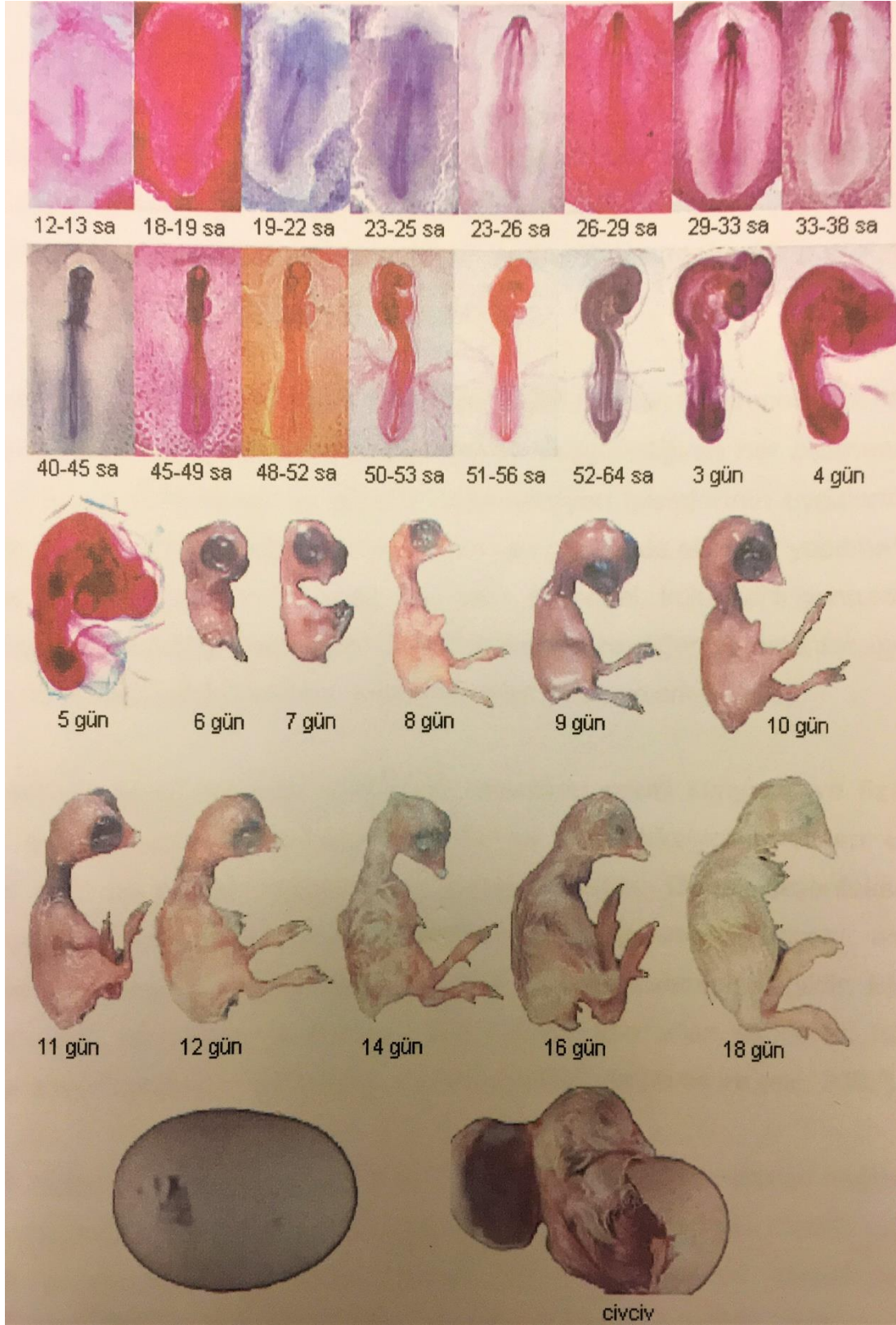
Üçüncü gün sonunda gaga gelişmeye başlar, kanat ve bacak tomurcukları oluşur. Başın ve boynun iki tarafından üç viseral yay gelişir. Bu oluşan yapılar arterial sistem, kulaktaki östaki borusu, yüz, çene ve bazı kanalsız bezlerin gelişiminde önem arz eder. Kuyruk ortaya çıkar. Embriyonun etrafı, korunması amacıyla içi sıvı ile dolu amnion ile çevrilir. Allantoik kese embriyo için solunum ve boşaltım organı görevi yapar. Embriyonun besini albuminden sağlanır ve kabuktaki kalsiyum embriyoya allantois tarafından aktarılır. Üç günlük embriyoda solunum sisteminin farklılaşmasında ilk gösterge faringeal bölgenin posteriorunda laringo-trakeal oluğun oluşmasıdır. Oluşum devam ederek trakeal büyüme uzadıkça kaudal kısım iki kısma ayrılarak akciğer tomurcuklarını oluşturur (Romanoff, 1997).

Dördüncü gün torsiyon ve fleksiyon devam eder. Embriyonun vücudu 90° döner ve vitellusun üzerinde sol tarafa doğru kayar. Baş ve kuyruk birbirine çok yakındır. Bu hali ile embriyo “C” şeklindedir. Sindirim ve solunum sisteminin bir parçası olan ağız, dil ve nazal açıklık gelişir. Dördüncü günün sonunda embriyo yaşamak için ihtiyaç duyduğu tüm organlara sahiptir ve embriyonun tüm kısımları tanımlanabilir (Romanoff, 1997).

Yedinci gün kanat ve ayak parmakları görünür durumdadır, kalp tamamıyla torasik boşluğu doldurur ve embriyo büyük ölçüde kuşa benzer. Onuncu günden sonra tüyler görünür ve gaga sert bir yapı kazanır. Ondördüncü gün pençeler şekillenir ve embriyo yumurtadan çıkış için pozisyonunu alır. Albumin desteği 16. günde tükenir. Böylece vitellus besin için temel kaynak halini alır. Onsekizinci gün sonunda gaga hava boşluğunu deler ve akciğer solunumu başlar. Yirminci gün sonunda civciv yumurtadan çıkma pozisyonunu alır (Romanoff, 1997).

Akciğer görevi gören allantois, civciv kendi akciğerlerini kullandıkça kurumaya başlar. Kuluçka başlangıcından 21 gün sonra yumurta dişi denilen gaganın üst kısmında bulunan sert boynuzumsu yapı ve boynun arka kısmında bulunan kasların yardımıyla yumurta kabuğunu kırar. Yumurtadan tamamen kurtulan civcivin göbek açıklığı kapanır ve kurumaya başlar. Civciv yumurtadan çıktıktan birkaç gün sonra gaga üzerindeki boynuzumsu yapı düşer. Protein, yağ, vitamin, mineral ve su açısından oldukça zengin olan vitellus yumurtadan çıktıktan sonra saatlerce civcive besin sağlayabildiğinden, yumurtadan çıkan civciv 72 saat boyunca beslenmeksizin yaşayabilir (Romanoff, 1997).

Hamburger – Hamilton skalası, civciv gelişiminde 46 kronolojik evreyi tasvir eden bir dizi görüntüdür. Görüntüler döllenmiş bir yumurta ile başlar ve tamamen gelişmiş bir civciv ile biter (Şekil 2.3). Gelişmekte olan bir civciv embriyosunun yaklaşık yaşını belirlemek için tanımlanmış bir evreleme dizisi oluşturmak için önemlidir. Bu çalışmada da canlı ve ölü embriyoların gelişme evrelerinin belirlenmesinde Hamburger ve Hamilton (1951) skalası (HH skalası) kullanılmıştır (Doty, 2011).



Şekil 2.3. Kuş gelişim evleri (DB Lab, 2003)

2.3. Kuş Embriyoları ve Toksisite

Endüstriyel ilaçlar, besin katkı maddeleri, ağır metaller ve pestisitlerin embriyotoksik, teratojenik etkilerinin belirlenmesi amacıyla kanatlı embriyoları deneysel testler için önde gelen materyallerden biridir. Kanatlı embriyosunun gelişim evlerinin çok iyi bilinmesi, çok sayıda kanatlı embriyosunun kullanılabilmesi ve toksisitenin değerlendirilmesinde memeli türlerde yapılacak çalışmalara karşı bir avantaj sağlaması nedeniyle döllü kanatlı yumurtası prenatal toksisitenin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Öznurlu, 2016).

Anwar ve Shakoori (2010), tavuk embriyolarında, sentetik piretroitler grubundan bir insektisit olan cypermethrin'in toksisitesini değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmada; döllenmiş tavuk yumurtalarına "0." günde, 50, 100, 200 ve 400 ppm konsantrasyonlarda asetonda çözölen cypermethrini enjekte etmişlerdir. Gelişimin 16. gününde embriyolardan alınan karaciğerler, üç parçaya ayrılmış ve tartılmıştır. Birinci parçalar tuzlu homojenat elde etmek için; ikinci parçalar lipit kolesterol ve nükleik asit ekstrasyonu için ve üçüncü parçalar histolojik çalışmalar için bouin fiksatifine alınmıştır. Analizler sonucunda, enzimler arasında AST (Aspartat amino transferaz), ALT (Alanin amino transferaz) ve LDH (Laktat dehidrojenaz) aktiviteleri anlamlı olarak yüksekken, amilaz, AkP (Alkalın fosfataz) ve AcP (Asit fosfataz) değerleri değişmemiştir. Biyokimyasal bileşenlerden hepatik glukoz ve toplam protein içeriği azalırken, glikojen ve DNA (Deoksiribonükleik asit) içeriği artmıştır. Diğer tüm bileşenler, çözülebilir protein, serbest amino asitler, toplam lipitler, kolesterol, üre, ürik asit ve RNA (Ribonükleik asit) içerikleri değişmeden kalmıştır. Karaciğerde, amilaz, alkalen fosfataz ve asit fosfataz aktiviteleri değişmemiştir. Bunun yanı sıra hepatik glukoz, toplam protein, toplam yağ, kolesterol, üre, ürik asit ve RNA içeriği, glikojen ve DNA içeriğinde azalma tespit edilmemiştir. Hepatik çözünür protein ve serbest amino asit içeriği değişmeden kalmıştır. Karaciğerde cypermethrin'in neden olduğu histopatolojik değişiklikler arasında hepatik parankimde sinüzoidal boşluklar, hepatositlerde sitoplazmik vakuoller ve nükleer yoğunlaşma, yağlı dejenerasyon, hidropik dejenerasyon ve nekroz görölmüştür.

Bhaskar ve ark. (2012), tavuk embriyoları üzerinde bir insektisit olan deltamethrin'in teratojenitesini değerlendirmişlerdir. Deltamethrin sentetik piretroitler adı verilen pestisitlerin bir üyesidir. Döllenmiş *Gallus domesticus* yumurtaları inkübasyonun 4. gününde, 37°C'de 60 dakika süreyle 12.5, 25 ve 50 mg L⁻¹ konsantrasyonlarda

deltamethrin emülsiyonlarına daldırılmıştır. Embriyolar 16. günde toplanarak mortalite oranı, yaş vücut ağırlığı, bürüt morfolojik ve iskelet malformasyonları açısından değerlendirilmiştir. Sonuçta deltamethrin uygulanmasından sonra embriyonik mortalitenin belirgin bir şekilde arttığı ortaya koyulmuştur. Deltamethrin ile muamele edilen embriyoların dış ve iskelet yapısında, malformasyonlar görülmüştür. Bunlar; baş bölgesinde: Küçük beyin (mikrosefali), beynin büyük kısmının yokluğu (anensefali), boyun bölgesinde: Dar boyun, bükümlü boyun, bacaklarda: Kısa ve bükülmüş bacaklar, vertebrada: Yanal omurga eğriliği (skolyoz), omurganın anterior eğriliği (lordiosis), omurganın posterior eğriliği (kifoz), kemik dokusunda ayrı kemik birleşmesi (synostosis), sternum: Doğuştan sternum yokluğu (asternia), üst ekstremit ve alt uzuvlarda: Kısalmış veya bükülmüş (humerus, radius, ulna, femur, tibia, fibula)'tür. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde deltamethrin'in embriyonik gelişimi önemli ölçüde olumsuz etkilediği tespit edilmiştir.

Andleeb ve ark. (2014), *Gallus domesticus*'ta permethrin tarafından indüklenen gelişimsel anomalileri incelemişlerdir. Permethrin piretroit grubuna ait bir inseksittir. Bu çalışmada belirlenen 4 farklı dozda (0.3125, 0.625, 1.25 ve 2.5 µg) permethrin 0.1 ml olacak şekilde yumurta içine uygulandıktan sonra civcivlerin teratojenitesi değerlendirilmiştir. Belirlenen dozlar mısır yağında çözdürülerek 4. günde yumurta içerisine enjekte edilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. Kuluçkanın 7. gününde embriyolar toplanmış morfolojik ve morfometrik analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçları, permethrin'in farklı konsantrasyonlarında meningoensefalosel (kafatasındaki bir açıklıktan bir kısım beyin, beyin zarları ve beyin-omurilik sıvısının dışarıya doğru fıtıklaşması), spina bifida (ayrık ya da açık omurga), hidrosefali (beyinde su toplanması sonucu kafanın anormal büyümesi), mikromeli (bacakların anormal biçimde küçük veya kısa oluşu), mikroftalmi (iki gözün anormal derecede küçük olması), ektopia kordis (kalbin kısmen veya tamamen toraks boşluğu dışında yerleşmesi), mikrognati (alt çene kemiğinin kısalığı), gastroşizis (göbek kordonunun lateralinde abdominal duvar kusuru oluşması) ve eksensefali (kafatası, yani kraniumun meydana gelmemesi) bulguları tespit edilmiştir. Doz artışına bağımlı bu anomaliler arasında ektopia kordis, mikromeli, mikrognati embriyoların çoğunluğunda görülmüştür.

Chowdhury ve ark. (2015), civciv (*Gallus domesticus*) embriyosunda sentetik piretroit olan transflurithrin'in ticari formülasyonunun teratojenik etkisini

değerlendirmişlerdir. Dölllenmiş *Gallus domesticus* yumurtaları, 6 gün boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir. Yumurtalar 8 grup olacak şekilde bölünmüştür ve herbir grupta 10 adet yumurta bulunmaktadır. Çalışmada kullanılan sentetik piretroit normal salin içerisinde çözülmüştür. Belirlenen 8 grup için 8 doz (0.0025, 0.005, 0.0075, 0.01, 0.0124, 0.0175, 0.025 mg/ml ve kontrol) herbir yumurtaya insülin iğnesi ile 1 ml olacak şekilde enjekte edilmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. Ondört gün sonra inkübasyon sonlandırılarak toplanan embriyoların mortalite oranı, vücut ağırlıkları ve morfolojik bozuklukları değerlendirilmiştir. Sonuçlar, ıslak vücut ağırlıklarının istatistiksel değerlendirme sonucu anlamlı kabul edilmiştir. Dört farklı doza (0.0075, 0.01, 0.0175 ve 0.025) maruz kalan embriyoların piretroit mortalite yüzdesi sırasıyla 20, 30, 50 ve 60’tan daha yüksektir. Değerlendirme sonucunda doz artışına bağlı olarak ölüm oranı artmıştır. Gözlenen malformasyonlar, Baş bölgesi: mikrosefali (küçük beyin), eksensefali (kafatası, yani kraniumun meydana gelmemesi), anensefali (beynin büyük kısmının yokluğu), Göz: mikrotalamus (bir ya da her iki gözün anormal derecede küçük olması), anoftalmus (gözlerden birinin ya da her ikisinin hiç olmaması), ekzoftalmus (göz büyümesi), Boyun: dar boyun, bükülmüş boyun, Gaga: gaga gelişiminde kusurlar, papağan gagası, yarık gaga, Bacak: kısa ve bükülmüş bacaklar/parmaklar ve diğer anomaliler, hematomlar (kanamanın doku içindeki birikimi), ektopia viscera/gastroşizis (göbek kordonunun lateralinde abdominal duvar kusuru oluşması) görülmüştür.

Bhaskar ve ark. (2016), deltamethrin’in ticari formülasyonu (Desic®)’in civciv embriyo gelişimi üzerine potansiyel toksisitesini değerlendirmişlerdir. Deltamethrin piretroit grubu bir insektisittir. Bu çalışmada Desic®’ten üç sulu emülsiyon konsantrasyonu (12.5, 25 ve 50 mg L⁻¹) hazırlanarak kullanılmıştır. Dölllenmiş *Gallus domesticus* yumurtaları hazırlanmış üç farklı insektisit konsantrasyonuna 0. günde 37°C’de 60 dakika batırılmıştır. Uygulama sonrası yumurtalar 7. embriyonik güne kadar inkübasyonda tutulmuştur. İnkübasyon sonunda toplanan embriyolar teratojenik ve biyokimyasal değişiklikler için değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler sonucunda Baş: mikrosefali (küçük beyin), eksensefali (kafatası, yani kraniumun meydana gelmemesi), anensefali (beynin ve kafatasının bir kısmının veya tamamının oluşmaması), Göz: mikrotalamus (bir ya da her iki gözün anormal derecede küçük olması), anoftalmus (gözlerden birinin ya da her ikisinin hiç olmaması), Boyun: dar boyun, bükülmüş boyun, Gaga: gaganın gelişiminde kusurlar, Ekstremiteler: kısa ve bükülmüş ekstremiteler/parmaklar, parmaklar arasında ağ bulunmaması,

Alt vücut: ectopia viscera/gastroşizis (göbek kordonunun lateralinde abdominal duvar kusuru oluşması), genel büyüme geriliği, karın kaslarında ve deride yoksunluk, kuyruk eksikliği, deri altında kanama, cilt ödemi ve hematon görülmüştür. Biyokimyasal içerik, Desic®'in uygulamasında total protein, total kolesterol ve tüm embriyoların DNA içeriği üzerinde anlamlı bir etki bulunmamış, ancak embriyoların toplam glikojen içeriğinin 25 ve 50 mg L⁻¹'de önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında embriyoların toplam RNA içeriği önemli ölçüde azalmıştır. En yüksek konsantrasyonda (Alanin amino transferaz) ALT aktivitesinde yükselme görülmüştür. Alkalın fosfataz (AkP), (Asit fosfataz) AcP ve embriyoların (Aspartat amino transferaz) AST aktiviteleri, kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak etkilenmemiştir.

Bhaskar ve Shahani (2015), deltamethrin'in ticari formülasyonu olan (Desic®)'in *Gallus domesticus* embriyo gelişimi üzerine hepatotoksik etkilerini incelemişlerdir. Dölllenmiş yumurtalar üç farklı deltamethrin (12,5, 25, 50 mg/L) konsantrasyonuna 60 dakika boyunca 37°C'de inkübasyondan önce 0. embriyonik gün (ED0) ve inkübasyonun 4. gününde (ED4) batırılmıştır. On altıncı embriyonik güne kadar inkübasyon devam ettirilmiştir. 50 mg/L deltamethrin'e maruz kalma önemli bir sonuç vermiştir, sırasıyla ED0 ve ED4'te maruz kaldıklarında karaciğerde toplam protein ve toplam glikojen içeriğinde azalma olurken, her iki gün için uygulanan konsantrasyonda toplam glutatyon içeriği azalmıştır. 0 ve 4. günde 25 ve 50 mg/L deltamethrin'e maruz kaldığında karaciğerde alkalın fosfataz aktivitesi anlamlı şekilde artmıştır, glutamat piruvat transaminaz aktivitesi ise sadece ED4'te 50 mg/L deltamethrin'e maruz kalan hayvanlarda belirgin bir artış göstermiştir. Histopatolojik değerlendirmede insektisit uygulanan embriyoların karaciğer kesitlerinde hafif hücresel lezyonlar olduğu görülmüştür. Gözlenen patolojik değişiklikler, hepatositlerin dejenerasyonu ve nekrozu, sitoplazmik vakuolizyon, genişlemiş ve tıkanmış sinüzoidal boşluklar, lökosit infiltrasyonları, merkezi venin tıkanması ve genişlemesini içermektedir.

Ahmad ve ark. (2018) bu çalışmada, cypermethrin (CN) uyguladıkları civcivlerin prenatal döneminde oluşabilecek anomalileri hafifletmek için uyguladıkları E vitamini (vit E) ve zeytinyağı (O)'nın potansiyel etkisini keşfetmeyi amaçlamışlardır. Cypermethrin son zamanlarda üreme ve gelişimsel bozukluklara karışan bir tip II piretroit insektisittir. Dölllenmiş yumurtalar (her biri 60), kontrol (C); CN, CNO (cypermethrin+zeytinyağı), CNE (cypermethrin+E vitamini) ve CNOE (cypermethrin+zeytinyağı+E vitamini) olarak

gruplara ayrılmıştır. Her grupta 60 yumurtadan 7, 14 ve 21 günlük inkübasyon için 20'li gruplar düzenlenmiştir. İnkübasyon sonrası değerlendirme sonuçları, yavruların vücut ağırlığı ve kuluçka oranı tüm gruplarda CN grubundan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Yedi günlük embriyolarda CN mazuriyetindeki anormallikler, büyüme geriliği, eksik gaga, mikroftalmi (iki gözün anormal derecede küçük olması), mikrosefali (küçük beyin), açık gözler, abdominal ödem ve ekstremitelerde deformasyon 14 ve 21 günlük embriyolarda düzensiz tüyler, konjenital glokom (göz içi basıncı yüksekliğine bağlı görememe), spina bifida (ayrık ya da açık omurga) ve ekstremitelerde deformasyon görülmüştür. CN'nin zeytinyağı ve vitE ile birlikte uygulanması bu anomalilerin ortaya çıkma oranını düşürmüştür. Bu nedenle tek başına CN'ye maruz kalınması halinde gelişimi olumsuz etkilediğini, E vitamini ve zeytinyağı ile birlikte uygulanmasının civciv oluşumunda CN kaynaklı embriyonik gelişim bozukluğunu azalttığı tespit edilmiştir.

Uggini ve ark. (2012) iki farklı sınıfsal böcek öldürücünün ticari formülasyonu ile Rhode Island Red (kırmızı ada tavuğu) döllenmiş tavuk yumurtalarının gelişim toksisitesini incelemişlerdir. Bunlardan birincisi chlorpyrifos ve cypermethrin kombinasyonu ve ikincisi *Actinomyces*, toprak bakterisinin fermantasyon ürünü spinosad'tır. Chlorpyrifos zararlıları öldürmek için kullanılan bir organofosfat pestisittir. Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlarda "0." günde kombinasyon olarak uygulanan inseksitit dozları 0.01, 0.05 ve 0.1 µg/yumurta, *Tracer* dozları 100, 500 ve 750 µg/yumurta konsantrasyonlar belirlenmiş ve her yumurtaya 50 µl hacimde tek doz olarak uygulanmıştır. Kombine olarak uygulanan pestisit üç farklı doz seviyesinde, aksiyel ve apendiküler iskelette önemli embriyonik malformasyonlar meydana getirdiği gözlenmiştir. Uygulanan 0.01 µg/yumurta dozda, morfolojik olarak belirgin bir etki görülmemekle birlikte, kararsız bir yürüyüş gözlenmiştir. Uygulanan 0.05 µg/yumurta doza ait embriyolardaki anormallikler, çarpık bacak, bükülmüş falanks, gaga deformiteleri ve mikroftalmi (iki gözün anormal derecede küçük olması) görülmüştür. Uygulanan 0,1 µg/yumurta dozda beyin ve omurgada kordon açıklığı, gaga deformiteleri, anoftalmi (gözlerden birinin ya da her ikisinin hiç olmaması) ve göbek fıtığı görülmüştür. Doz arttıkça embriyo gelişiminde olumsuz etkilerin arttığıda görülmüştür. *Tracer* için farklı dozlar değerlendirilmiştir ve toksik etkisinin düşük olduğu ve sadece 750 µg/yumurta dozda hidrosefali (beyinde su toplanması sonucu kafanın anormal büyümesi) ve edemik durum gözlenmiştir. Vücut ve karaciğer ağırlıklarında farklılık gözlenmemiş ve eksenel

veya apendiküler deformasyonlar görülmemiştir.

2.4. Cyfluthrin ve Özellikleri

Piretroit grubu insektisitler, uzun süredir bilinen kimyasallardır. Ancak son yıllarda önem kazanmışlardır. *Pyrethrum* cinsine ait türlerin çiçeklerinin öğütülmesi ile elde edilen piretrum ekstraktı %1-2 piretrin içermektedir. Doğal *Pyrethrum*'ların insektisit olarak birçok avantajı vardır. Bunların geniş spektrumlu olmaları, memelilere karşı zehirlilik düzeylerinin düşük olması ve doğal koşullarda kısa sürede dekompoze olmalarıdır. Fakat kolay bozulmalarının yanı sıra, üretim maliyetinin oldukça yüksek olması ve üretiminin sürekli olmasındaki zorluk açısından doğal piretroitler dezavantajlıdır. Piretroitlerin ortamın derecesine göre etkinliği değişmektedir. Düşük sıcaklığa göre yüksek sıcaklıkta etkisi daha fazladır. Dezavantajdan kaynaklı olarak üreticiler için sentetik üretim daha alternatif bir seçenek olmuştur. Sentetik piretroitler, ışığa dayanıklılığı ve kalıntı etkisi yüksek insektisitler olarak tarımda geniş kullanım alanına sahiptir. İnsanlar üzerinde sistemik ve akut toksisiteleri düşüktür, ancak zehirlenme belirtileri organik fosforlu bileşik zehirlenmeleri ile karıştırılabilir (Anonim, 2012).

CAS#: 68359-37-5

Molarkütle: 434,3 g/mol

Form: Macun sarısı kütlesi

Erime noktası: 60°C derece

Kimyasal adı: Siyano (4-floro-3-fenoksi-fenil) metil 3- (2,2-dikloroetenil) -2,2-dimetilsiklopropankarboksilat.

Moleküler formül: C₂₂H₁₈Cl₂FNO₃ (Chemical Fact Sheet 12/87).

2.4.1. Cyfluthrin ve Toksikite Çalışmaları

Cyfluthrin geniş septurumlu sentetik piretroitler içerisinde yer alan bir böcek öldürücüdür. Yapısal olarak organoklorlu pestisitlere benzer ve DDT (Dikloro difenil trikloroethan) gibi cyfluthrin yağ dokusunda hızlıca birikmektedir. Merkezi sinir sistemi dahil olmak üzere geniş bir etki alanına sahiptir. Ayrıca cyfluthrin üreme sistemi üzerine etki etmektedir. Balık, sucul diğer organizmalar ve arılar için çoğu piretroit gibi cyfluthrin yüksek toksik etki göstermektedir. Çeşitli alanlarda evlerin içlerinde, bahçelerde, gıda işleme kuruluşlarında ve tarım gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Cox, 1994).

Cyfluthrin, DDT toksisitesine benzer etkiler göstererek tükürük salgısında artma, koordinasyon bozukluğu, kas titrekliği, sarsıntı, hareket ve davranış değişiklikleri meydana getirmektedir (Anonim, 2007). Sıçanlarda yapılan çalışmalarda kaslarda nekroz ve sinir sisteminde aksonal dejenerasyon gözlenmiştir (Whalen, 1987). Tavuklardaki nörotoksosite çalışmalarında sinir dejenerasyonu meydana geldiği görülmüştür (Moran, 1989). Cyfluthrin istenmeyen böceklerle karşı öldürmek için tasarlanmış olmakla birlikte, diğer canlıları da olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu etkiler bal arıları, örümcekler, balıklar, kuşlar ve su omurgasızlarında gösterilmiştir. Belirtilen canlılar üzerinde düşük dozlarda öldürücü etkilere sahiptir. Buna ek olarak, ekosistemler üzerine yapılan çalışmalar, cyfluthrin'in normal ekosistem süreçlerini bozma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (Cox, 1994).

Syed ve ark. (2010) yaygın olarak kullanılan cyfluthrin'in teratojenik potansiyelini değerlendirmek üzere fareler ile bir toksik çalışma planlamışlardır. Birinci gruptaki gebe *Swiss albino* farelerine gebeliğin organogenetik fazı (5-14. günler) boyunca iki doz böcek ilacı (16 mg/kg ve 32 mg/kg vücut ağırlığı) verilmiştir. İkinci gruptaki farelere ise gebeliğin olgunlaşma evresinde (14-18. günler) aynı iki doz tekrar uygulanmıştır. Yüksek doza maruz kalan hayvanlar piretroit zehirlenmesinin karakteristik bir semptomu olan uyuşuk davranış sergilemiştir. Otopsiler gebeliğin 18. gününde gerçekleştirilip rutin teratojenik gözlemler yapılmıştır. Hiçbir fetüste harici malformasyon meydana gelmemiştir. Yüksek doz, canlı fetüs sayısını önemli ölçüde düşürmüş, ancak organogenez sırasında uygulanan dozun, olgunlaşma fazı esnasında böcek ilacına maruz kalmanın üreme parametrelerini önemli ölçüde etkilemediği saptanmıştır. Fetal dönemde meydana gelen anomaliler, kafatası kemiklerinin kemikleşmesinde azalma, kaburgaların kısa veya mevcut olmaması, hidrocefali (beyinde su toplanması sonucu kafanın anormal büyümesi), mikroftalmi (iki gözün anormal derecede küçük olması), anoftalmi (gözlerden birinin ya da her ikisinin hiç olmaması), pulmoner ödem ve subkutan ödeme yol açtığı gözlenmiştir.

Naveed ve ark. (2012) farelerin gelişmekte olan fetüslerinde β -cyfluthrin'i test etmişlerdir. Bu amaçla, insektisit üç farklı dozda 1.25, 2.50 ve 5.00 μ g/g olarak uygulanmıştır. Dozlar gebeliğin 6. gününde oral yoldan verilmiş, gebeliğin 18. gününde fetüsler alınmış ve morfolojik olarak değişimler görülmüştür. Mikrocefali (küçük beyin), anoftalmi (gözlerden birinin ya da her ikisinin hiç olmaması), mikromelia (ekstremitelerin olması gerekenden daha küçük ve kısa olduğu durum), dismorfogenezis, displazi ve kısa

kuyruktur. Vücut ağırlığı, beyin büyüklüğü, gözün uzunluğu ve genişliği, ön ekstremiteler ve arka bacaklardaki uzunluk ve fetüslerin kuyruk uzunluğu ile ilgili morfometrik çalışmalar kontrollere karşı ($P < 0.001$) anlamlı fark göstermiştir. Çalışmada insektisit fare fetalleri üzerine potansiyel olarak tehlikeli olduğunu ve insanların da fetal gelişimine potansiyel olarak zararlı olabileceğini düşündürmektedir.

Yavuz ve ark. (1996) cyfluthrin'in tavşanlar üzerindeki teratojenik etkilerini araştırmışlardır. Cyfluthrin 10, 25 ve 50 mg/kg dozlarda ağız yoluyla gebeliğin 4. gününden 20. gününe kadar uygulanmıştır. Gebeliğin 27. gününde fetüslerin incelenmesi için tavşanlara ötanazi yapılmıştır. İncelenen fetüslerde herhangi bir iskelet anomalisine rastlanılmamıştır. Ancak, yanak oksipital ve boy ölçülerinde, fetüs ve plasenta ağırlıklarında azalma saptanmıştır. Kontrol grubuna göre cyfluthrin uygulanan tavşanlarda erken embriyonik ölüm (post implantasyon kayıp) sıklığı daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, cyfluthrin'in akciğer hipoplazisine ve böbrek pelvisinde genişlemeye, kalp, karaciğer ve böbrek ağırlıklarında azalmaya sebep olduğu ortaya konulmuştur.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kuluçkalık Yumurtalar

Bu çalışmada kullanılan döllenmiş tavuk yumurtaları, Ankara Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Atak-S genotipine ait 50 adet embriyolu tavuk yumurtası kullanılmıştır. Elde edilen döllenmiş yumurtalar enjeksiyon saatine kadar karanlık bir alanda yaklaşık 15-18°C'arasında bir çevre sıcaklığı sağlanarak en fazla 2 gün süreyle muhafaza edilmiştir. Bu çalışma 2015/08-02 numaralı etik kurul izni ile gerçekleştirilmiştir.

Embriyo gelişim evreleri Hamburger ve Hamilton (1992) skalasına (HH skalası) göre belirlenip, organların oluşumu bu skalaya göre değerlendirilmiştir (Hamburger ve Hamilton, 1992). Çalışmada oluşturulan gruplara ait embriyolar, embriyonik gelişimin 3. (organ taslaklarının oluştuğu) ve 5. (organ gelişimlerinin tamamlandığı aşama) günlerinde inkübasyondan alınarak incelenmiştir.

3.1.2. Kimyasal

Çalışmada kullanılan cyfluthrin (Cas#: 68359-37-5, Molar kütle: 434,3 g/mol, Kimyasal adı: Siyano (4-floro-3-fenoksi-fenil) metil 3- (2,2-dikloroetenil) -2,2, dimetil siklopropan karboksilat, Moleküler formül: C₂₂H₁₈Cl₂FNO₃, %95-100 saflık) HEKTAŞ firmasınca temin edilmiştir. Kimyasal için mısır yağı çözücü olarak kullanılmıştır. Bu sebeple kontrol grubu; normal kontrol (hiçbir madde verilmeyen) ve yağ kontrol (sadece yağ verilen) şeklinde oluşturulmuştur.

3.2. Yöntem

3.2.1. Cyfluthrin Uygulaması

Çalışmada, steril şartlar altında mısır yağında çözdürülen saf cyfluthrin solüsyonu kullanılmıştır. Cyfluthrin'in tavuk embriyosu üzerine etkisine yönelik erişilebilir literatür taramasında herhangi bir çalışmaya rastlanmadığı için, doz ayarlaması arılar için öldürücü doz olan LD₅₀ =0,04µg baz alınmıştır. Bu doz döllenmiş yumurta için orta doz olarak belirlenmiştir. Buna göre yumurta içerisinde enjekte edilen dozlar; 0,01; 0,04; ve 0,08

$\mu\text{g/L}$ 'dir. Çalışma planı 3 uygulama ve 2 kontrol (normal ve yağ kontrol) grubu olacak şekilde düzenlenmiştir Çizelge 3.1.

Çizelge 3.1. DeneySEL Planı

	Kontrol	Yağ Kontrol	1.Doz 0,01 $\mu\text{g/L}$	2.Doz 0,04 $\mu\text{g/L}$	3.Doz 0,08 $\mu\text{g/L}$
3. Gün Döllenmiş Embriyo Sayısı	5	5	5	5	5
5. Gün Döllenmiş Embriyo Sayısı	5	5	5	5	5

Döllenmiş tavuk yumurtaları pestisit enjeksiyonu yapılmadan önce, nemli bezle silinmiş ve ardından %70'lik alkol ile enjeksiyon yapılacak (hava hücresinin bulunduğu) bölge temizlenmiştir. Özel yumurta delici kullanılarak yumurtalar delinmiş ve dozlama, yumurta içine enjekte edilerek uygulanmıştır. Enjeksiyon sonrası hava almasını ve kontaminasyonu önlemek için delinen bölgeler parafinle kapatılmıştır. Döllenmiş yumurtalar dozlama işleminin ardından proje desteği ile alınan, kendinden çevirmeli kuluçka makinası CT120 SH Kuluçka Makinesi/ÇİMUKA kullanılarak %65-68 bağıl nemde 37,8°C inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.2. Morfolojik İncelemeler

İnkübasyon sonrası embriyonik gelişimin 3 ve 5. gününde inkübasyon sonlandırılmış ve embriyolar toplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Embriyoların yumurtadan toplanması (özgün)

Toplanan embriyolarda tespit edilen morfolojik değişiklikler fiksatif konulmadan önce, proje kapsamında alınan Celestron 44362 Cosmos LCD dijital mikroskop altında incelenerek fotoğrafları çekilmiştir. Embriyolar dış ortamda çok bekletilmeden fikse edilmek üzere %10 formaldehite alınmıştır. Oda sıcaklığında 48 saat bekletilmiştir. Daha uzun muhafaza için 48 saat sonra %70'lik etanol içerisine alınıp ve +4°C de dolapta muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Histolojik İncelemeler

3.2.3.1. Parafin Blokların Hazırlanması

Alkol içerisinde bekleyen embriyolar parafin bloklama prosedürüne tabi tutulmuştur. Bloklaması gerçekleşen embriyo dokularından Leica marka mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan her bir kesit Leica marka ısıtma tablası üzerinde 45°C dehiyone su ile lam üzerine fıkse edilmiştir (Şekil3.2.).



Şekil 3.2. Mikrotomla seri kesit ve preperasyon işlemi (özgün)

Hazırlanan bloklardan seri kesitler alınarak hazırlanan preparatlar, hematoksiyen-eozin (Allison RT and Barr WT 1985), yöntemi ile boyanmış ve Zeiss marka AXIO kameralı ışık mikroskobu altında incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

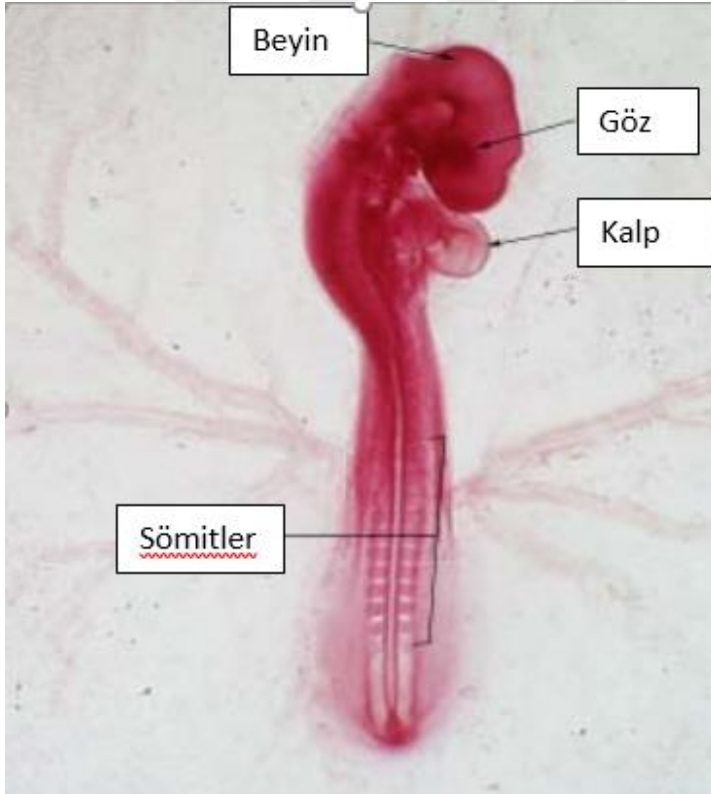
BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

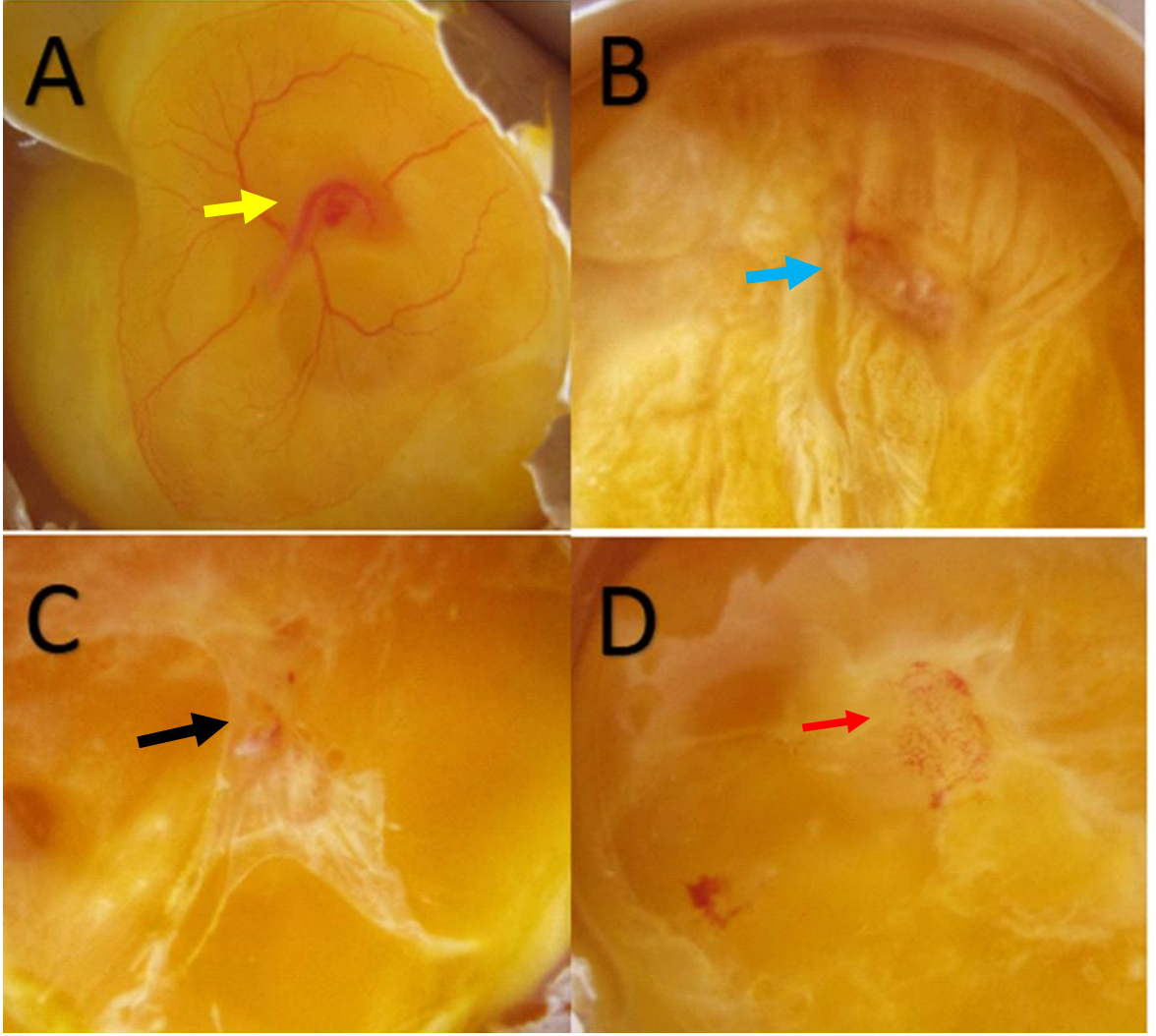
4.1. Bulgular

4.1.1. Morfolojik Değerlendirmeler

İnkübasyon sonunda toplanan tavuk embriyoları morfolojik olarak incelenmiş, tespit edilmiş ve bulgular fotoğraflanmıştır. Üç günlük kontrol grubuna ve cyfluthrin'in 3 farklı (0,01; 0,04; ve 0,08 $\mu\text{g/L}$) dozuna ait embriyolar değerlendirilmiştir. Gözlenen bulgular, kontrol grubuna ait normal gelişme göstermiş embriyolarla karşılaştırıldığında; 0,01 $\mu\text{g/L}$ doz uygulanan 5 adet embriyodan 3'ünde kan adacıklarında bozulma, beyin, göz, kalp ve sölmit oluşumunda gelişme geriliği, vitellusta bozulmalar tespit edilmiş; 0,04 $\mu\text{g/L}$ doz uygulanan 5 adet embriyodan 3'ünde genel gelişme geriliği ve vitellusta bozulmalar gözlenmiş; 0,08 $\mu\text{g/L}$ doz uygulanan 5 adet embriyodan 4'ünde ise kan adacıklarının oluşumunda da hasar meydana gelmiş ve buna bağlı gelişimsel bozukluğun olduğu görölmüşür (Şekil 4.2).

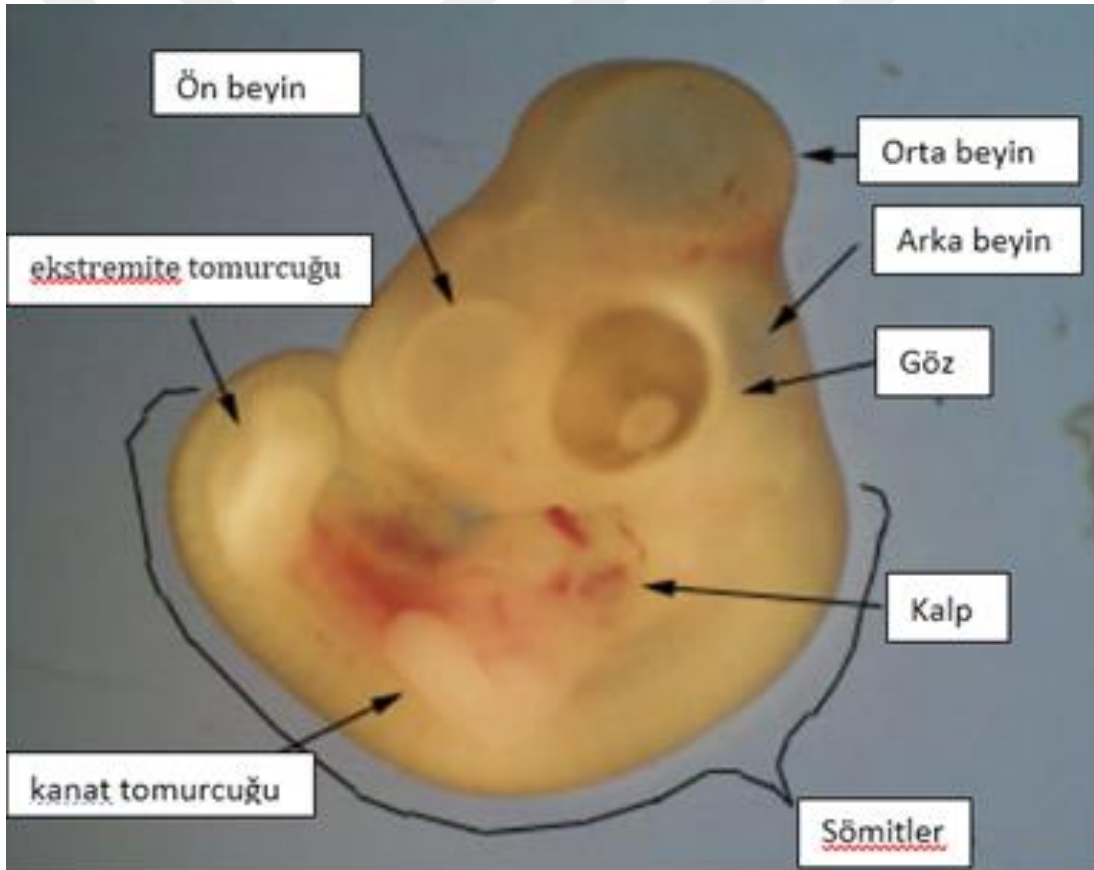


Şekil 4.1. 3 günlük civciv embriyonu (Cebra-Thomas, 2004)

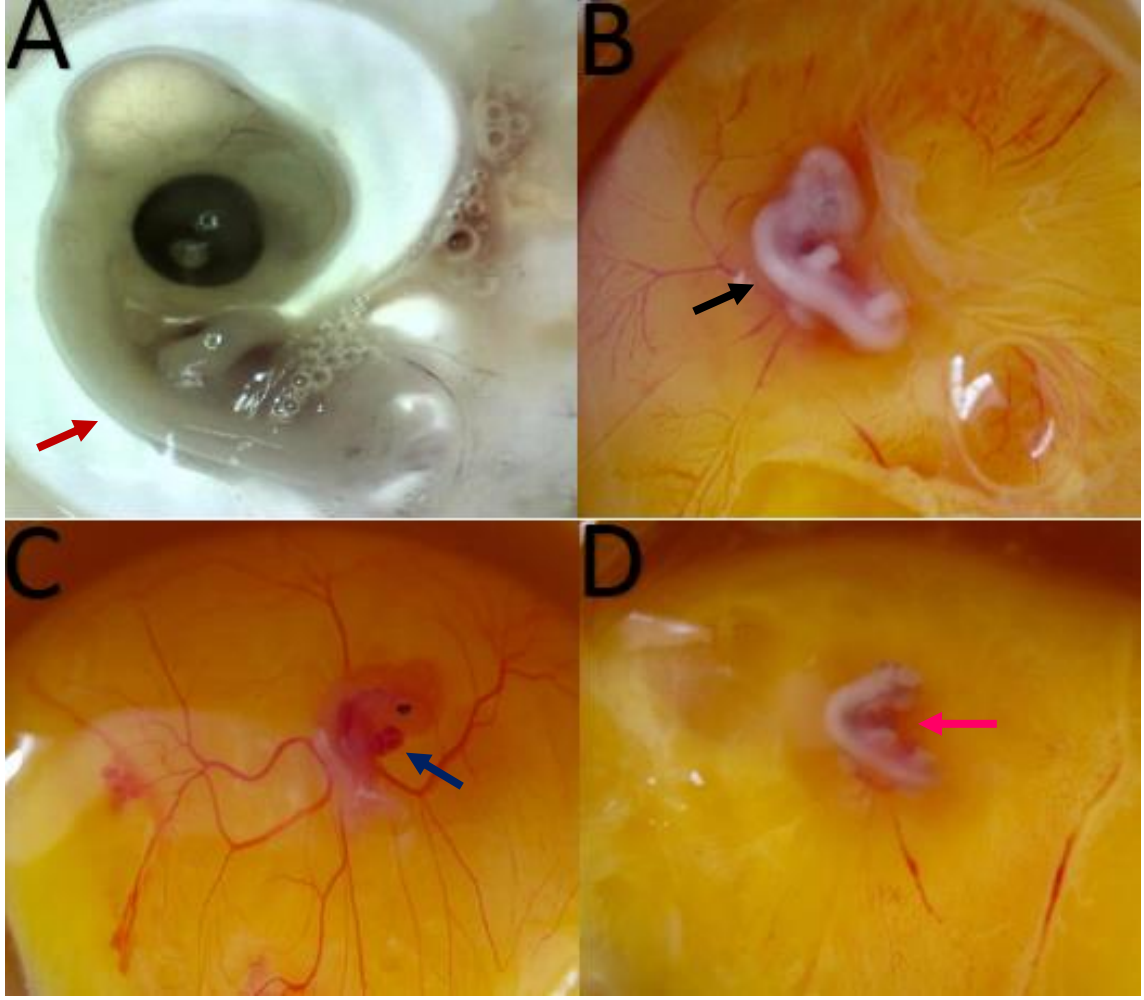


Şekil 4.2. Yumurtaların makroskobik fotoğrafları. A: kontrol grubuna ait 3 günlük embriyo (→), B: 0,01 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyoda gelişme geriliği ve vitellusta bozulmalar (→), C: 0,04 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyoda kan adacıkları oluşumunda hasar ve gelişme geriliği (→), D: 0,08 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyoda gelişme geriliği, kan adacıkları oluşumunda hasar (→)

Beş günlük embriyoların kontrol grubuna ve cyfluthrin'in 3 farklı (0,01; 0,04; ve 0,08 $\mu\text{g/L}$) dozuna ait embriyolar değerlendirilmiştir. Morfolojik olarak karşılaştırıldığında, gelişime bağlı anomaliler göze çarpmıştır. Kontrol grubuna ait embriyoların tümü normal gelişim gösterirken, 0,01 $\mu\text{g/L}$ doz uygulanan 5 adet embriyodan 3'ünde beyin, göz, kalp, ekstremité tomurcuklarında gelişme geriliği ve omur gelişiminde eğrilik tespit edilmiş; 0,04 $\mu\text{g/L}$ doz uygulanan 5 adet embriyodan 4'ünde göz ve ekstremité tomurcukları gelişme göstermemiş ve kalp dışarıya doğru gelişmiş; 0,08 $\mu\text{g/L}$ doz uygulanan 5 adet embriyodan 4'ünde beyin ve ekstremité tomurcukları gelişme göstermemiş, göz gelişiminde hasar, bükülmüş boyun ve vitellusta oluşan kan adacıklarında deformasyon olduğu görülmüştür (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. 5 günlük civciv embriyosu (Fety, 2004)



Şekil 4.4. Beş günlük embriyoların makroskobik fotoğrafları. A: kontrol grubuna ait 5 günlük embriyo (→), B: 0,01 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyoda beyin bölgeleri, göz, ekstremite tomurcuklarında ve omurgada gelişim anomalisi (→), C: 0,04 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyoda göz ve ekstremite tomurcuklarında gelişme geriliği ve dışarıya doğru gelişmiş kalp (→), D: 0,08 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyoda gelişme göstermemiş beyin, ekstremite, omurga ve gözde gelişim geriliği (→)

4.1.2. Histolojik Değerlendirmeler

Yapılan histolojik incelemelerde, normal-kontrol ve mısır yağı-kontrol grubu arasında histolojik açıdan herhangi bir farklılık bulunmamıştır. Bu nedenle kontrol grubu olarak normal kontrol grubu esas alınmış ve bu doğrultuda histopatolojik değerlendirmeler yapılmıştır.

Cyfluthrin uygulanan döllenmiş tavuk yumurtalarında, gelişimin 3. ve 5. günlerinde embriyoların karaciğer, kalp, böbrek ve merkezi sinir sistemi üzerinde doza bağlı olarak

histopatolojik değişiklikler tespit edilmiştir.

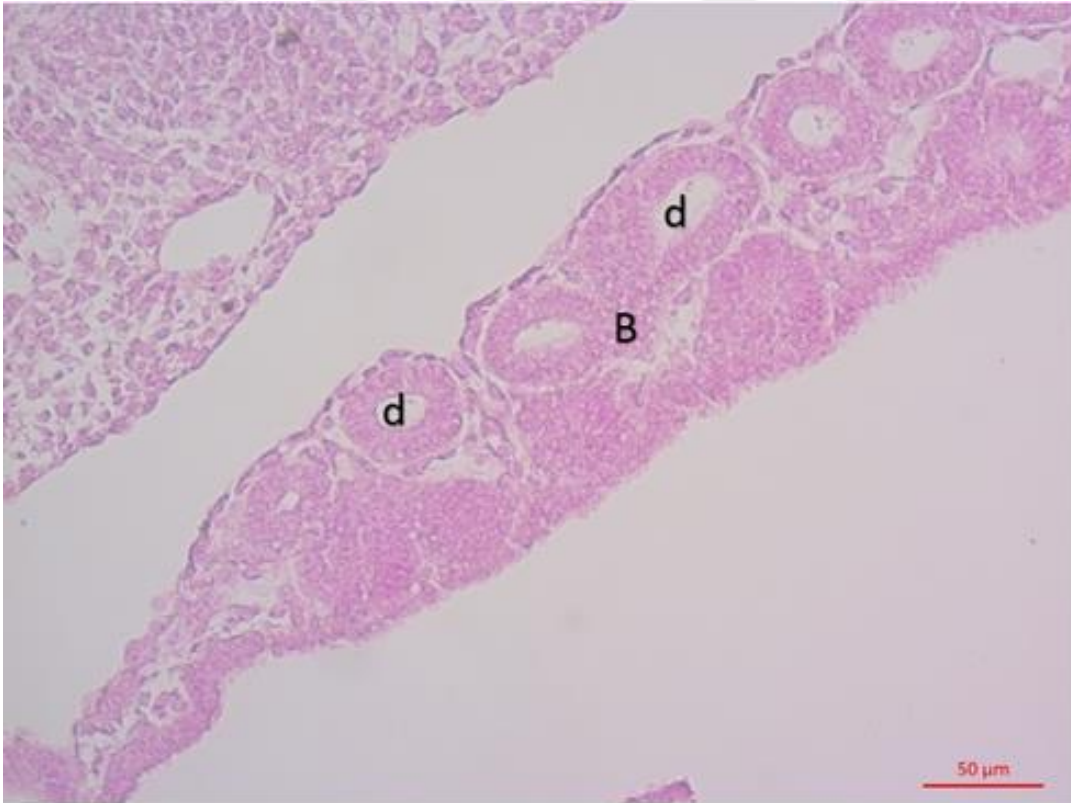
Kontrol grubuna ait 3 günlük embriyoların total kesitleri incelendiğinde sömitlerin normal görünümde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Karaciğer dokusunu oluşturan hepatositler, merkezi ven, sinüzoidler ve karaciğerin genel hücre yapısında herhangi bir anomaliye rastlanmamıştır (Şekil 4.6). Bbreği oluşturan tek katlı kübik epitel hücrelerinin yapıları net ve genel olarak böbrek oluşumu normal grnmindedir (Şekil 4.7). Gelişmekte olan kalpten alınan kesitler kas dokusu hücreleri sıkı ve düzenli görüntü vermektedir (Şekil 4.8).



Şekil 4.5. Kontrol grubuna ait, 3 günlük total embriyo kesiti. Smitler (S), dermatom (dt) ve miyotom (m) kas dokusu. H&E



Şekil 4.6. Kontrol grubuna ait, 3 günlük total embriyo kesiti. Karaciğer (KC), hepatosit hücreleri (h), sinüzoidler (s). H&E

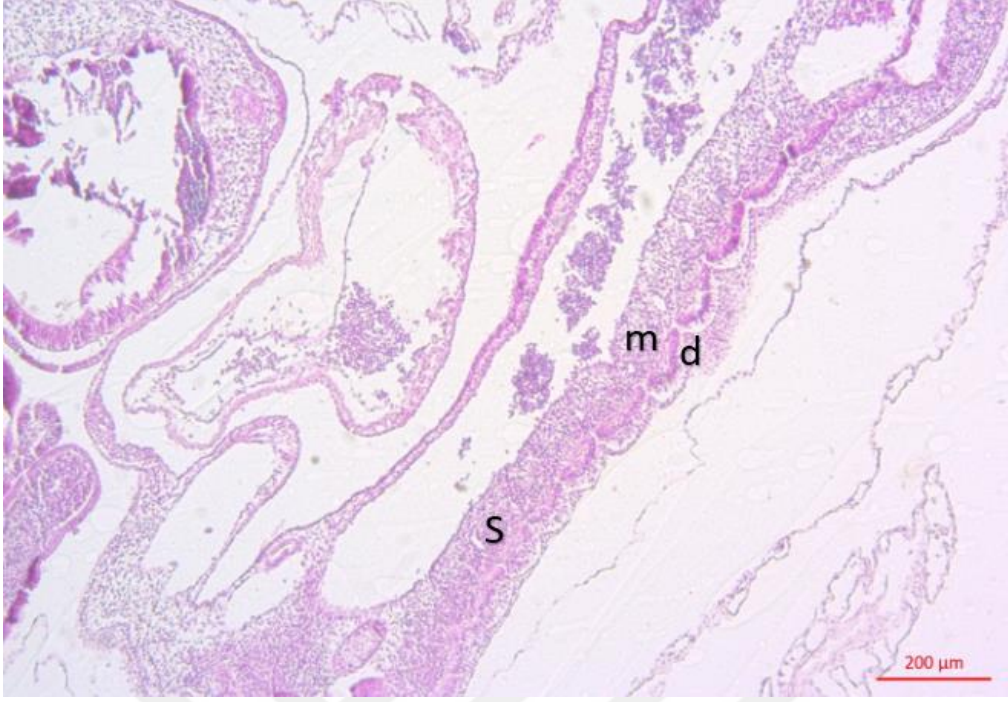


Şekil 4.7. Kontrol grubuna ait, 3 günlük total embriyo kesiti. Böbrek (B), distal tüp (d). H&E

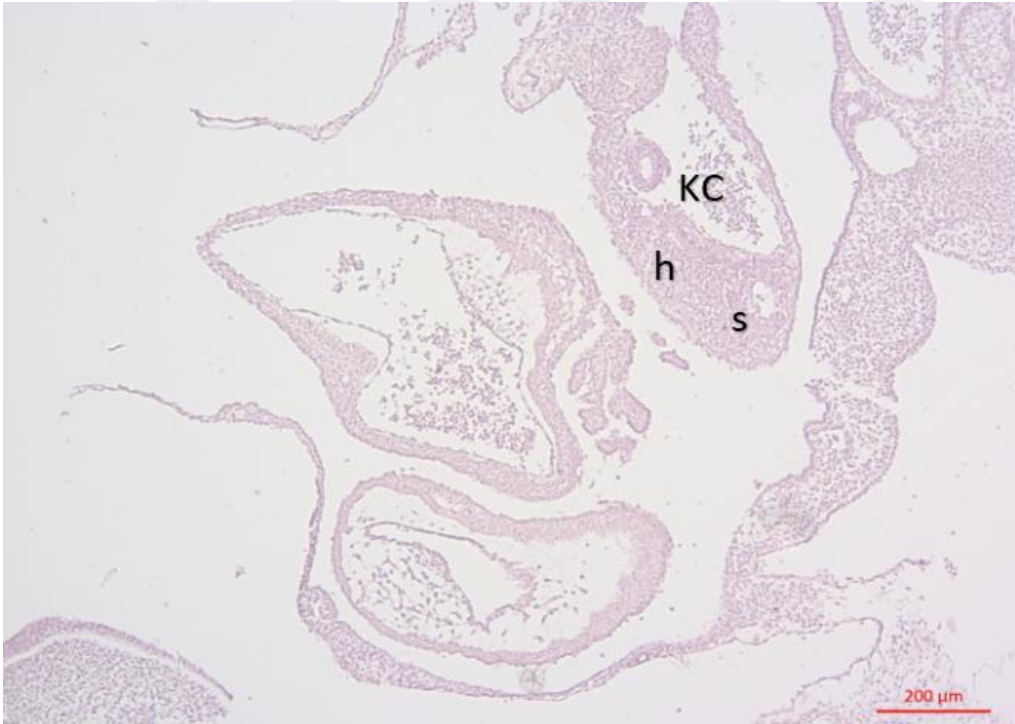


Şekil 4.8. Kontrol grubuna ait, 3 günlük total embriyo kesiti. Kalp (K) kas dokusu. H&E

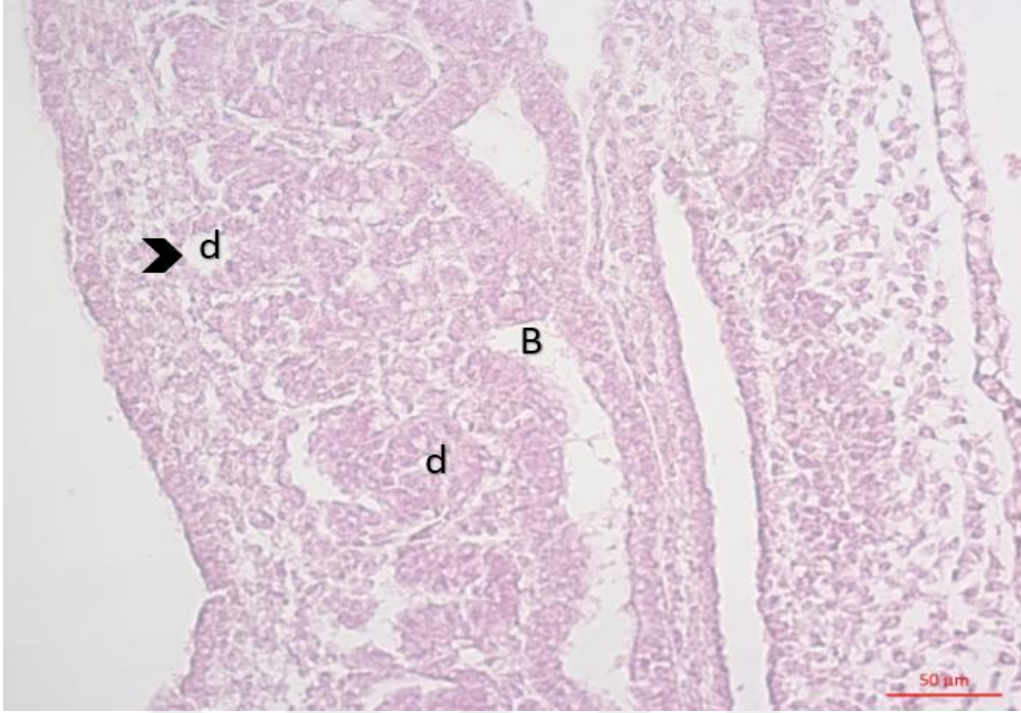
Üç günlük uygulama grubundan 0,01 µg/L doza maruz kalan embriyoların sömitleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklılık görülmemiştir (Şekil 4.9). Karaciğer dokusu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Şekil 4.10). Beş adet embriyodan 2'sinde böbrek hücre yapısı değerlendirilmiş ve distal tüp hücrelerinde kübik epitel hücre özelliğini kaybettiği ve dejenerasyon meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 4.11). Kalp kası hücrelerinde de kontrol grubu ile benzer özellikler görülmüştür (Şekil 4.12).



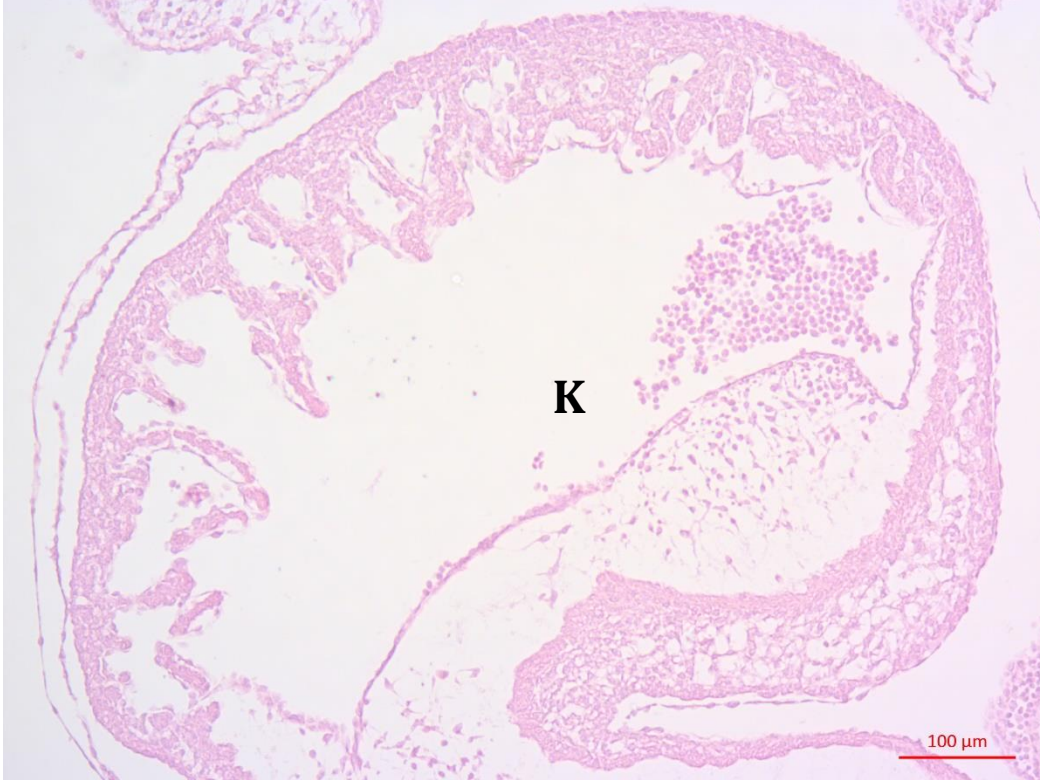
Şekil 4.9. 0,01 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, smitler (S), dermatom (d) ve miyotom (m). H&E



Şekil 4.10. 0,01 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, karaciğer dokusu (KC), hepatosit hücreleri (h), sinüzoidler (s). H&E



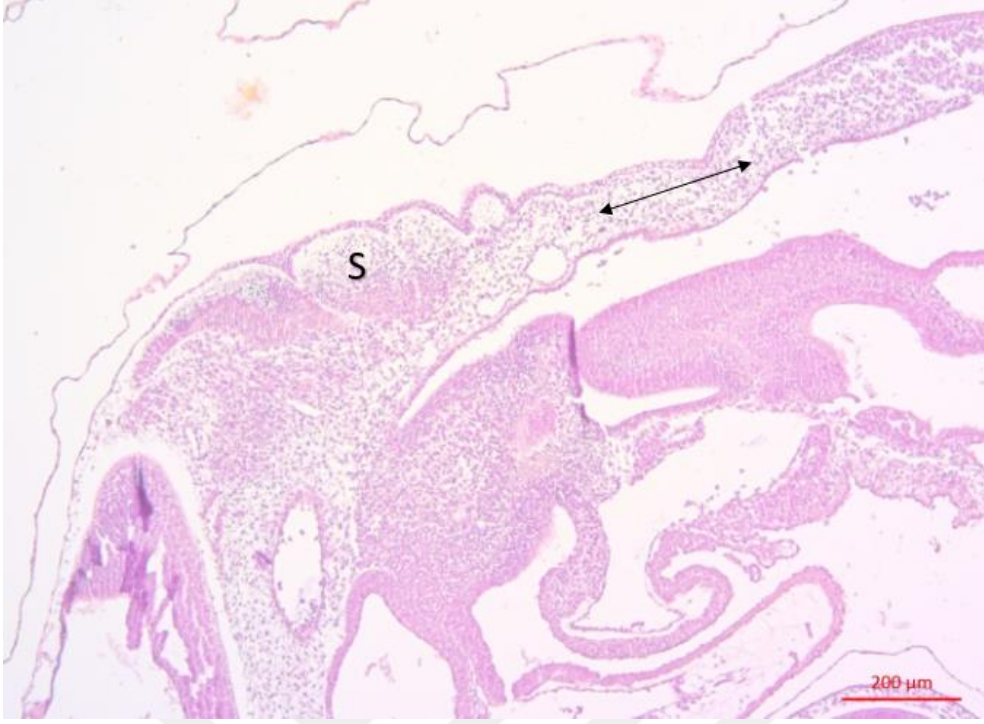
Şekil 4.11. 0,01 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, böbrek dokusu (B), distal tüp (d), distal tüp epitel hücrelerinde dejenerasyon (➤). H&E



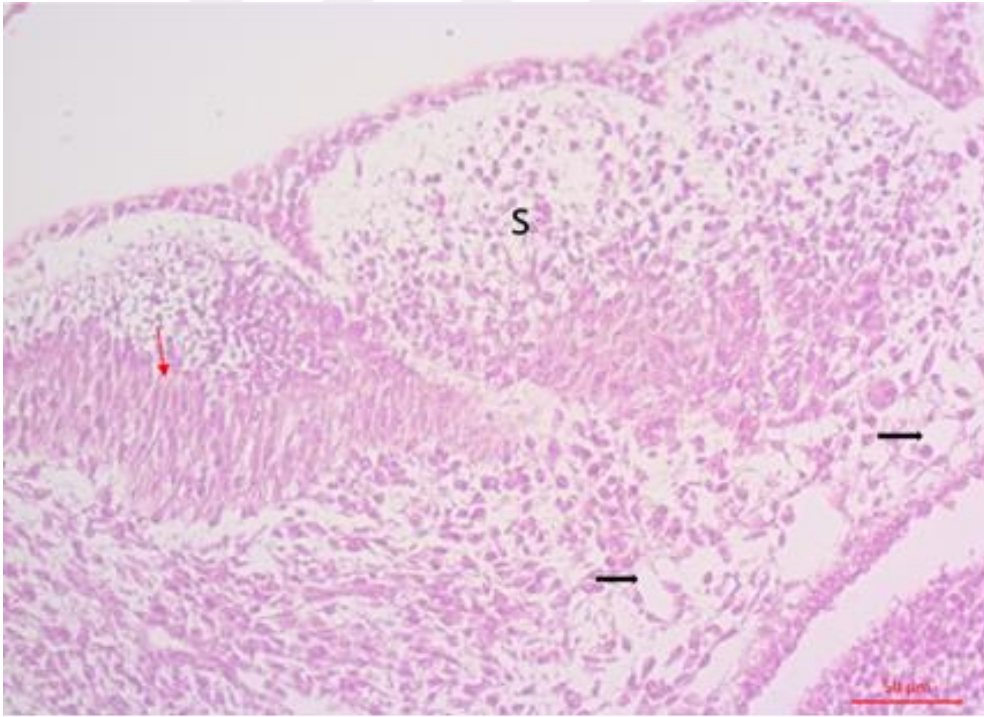
Şekil 4.12. 0,01 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, kalp (K) kas dokusu. H&E

Üç günlük uygulama grubundan 0,04 µg/L cyfluthrin'e maruz bırakılan 5 adet embriyodan 3'ünde smit gelişimi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, gelişimsel bazı anomaliler tespit edilmiştir. Beş adet embriyodan 3'ünde, üç smitten sonra sömitlerin bulunması gereken hat daralmış ve smit oluşumu görülmemiştir. Doku bütünlüğü kaybolmuş ve hücrelerin sitoplazmalarını kaybederek atrofi olduğu grlmştir. Bazı hücrelerde vakuolizasyon meydana gelmiştir (şekil 4.13). Beş adet embriyodan 2'sinin karaciğer dokusu incelendiğinde hepatositlerde dejenerasyon, sinüzoidlerde genişleme grlmştir (şekil 4.14). Beş adet embriyodan 2'sinin kalp kasında ise hücrelerde azalma ve dejenerasyon tespit edilen bulgular arasındadır (şekil 4.15).



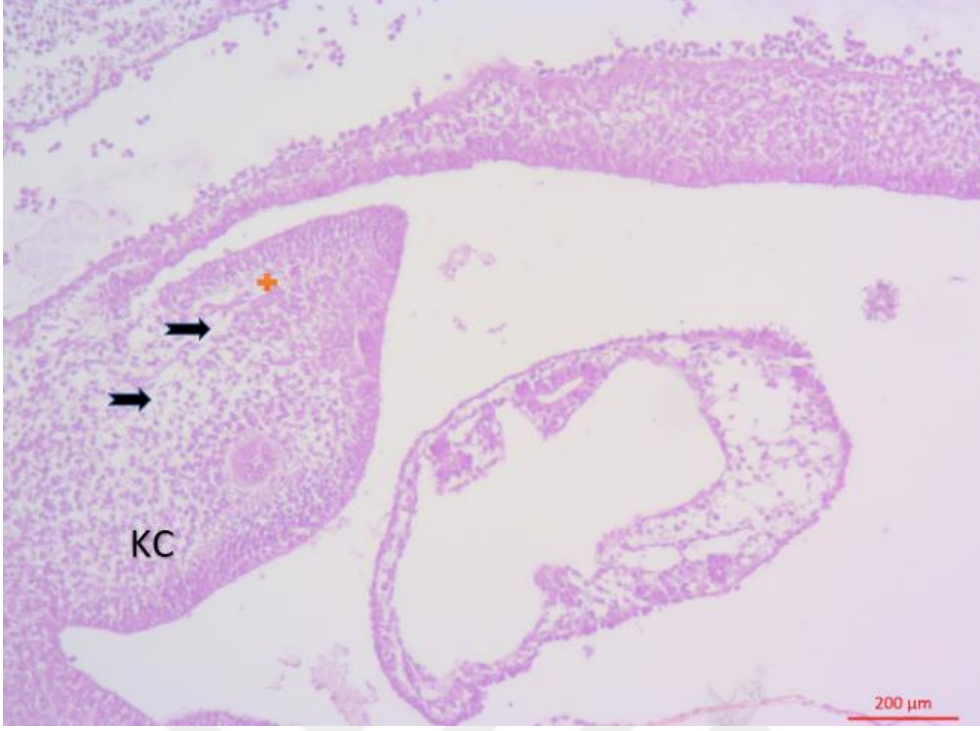


A

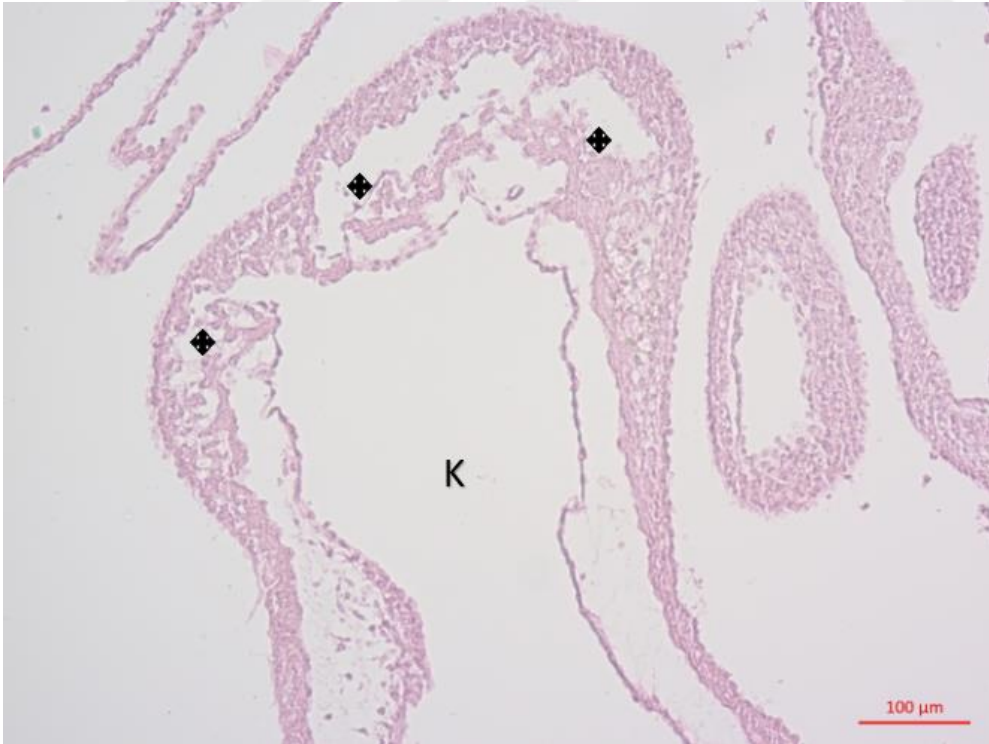


B

Şekil 4.13. A ve B: 0,04 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, s6mitlerin (S) g6r6n6ş6, s6mit gelişiminde deformasyon (↔), miyoblastik uzama (↗), vakuolizasyon (→). H&E



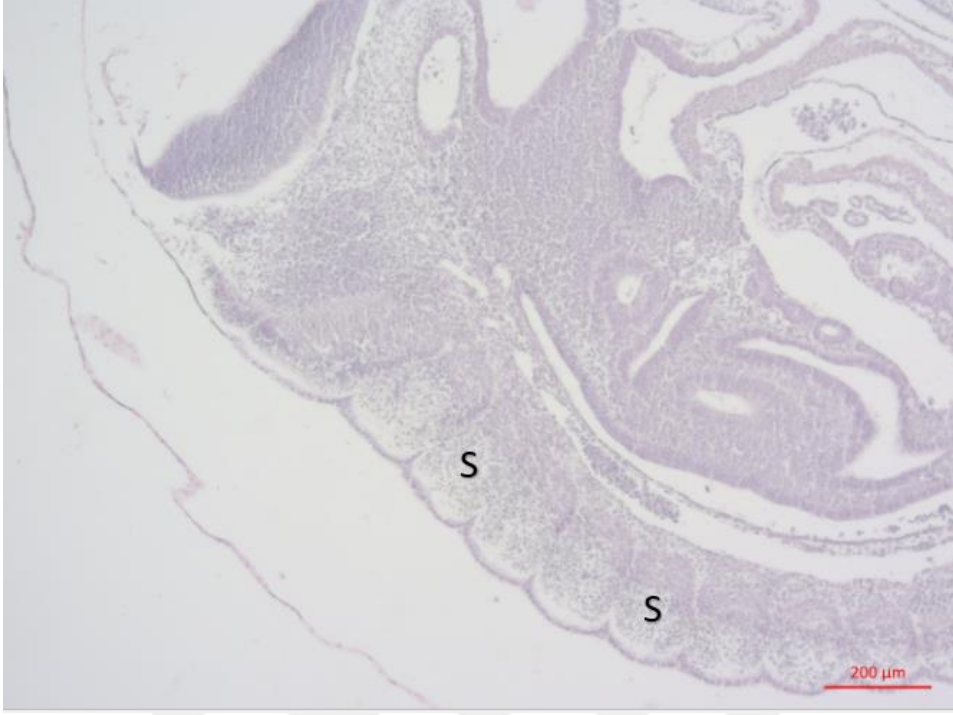
Şekil 4.14. 0,04 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, karaciğer dokusunda genişlemiş sinüzoidler (→), hepatositlerde kümeleşme (+). H&E



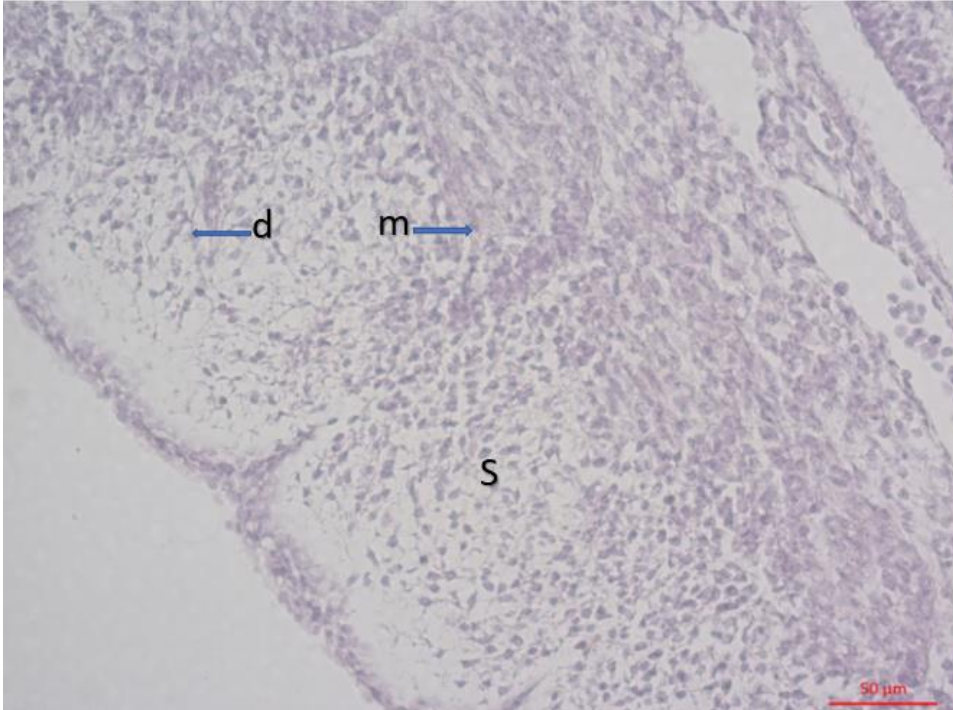
Şekil 4.15. 0,04 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, kalp (K) kas dokusunda hücresel azalma ve dejenerasyon (◆). H&E

Üçüncü güne ait en yüksek doz olan 0,08 µg/L cyfluthrin'e maruz kalan 5 adet embriyodan 3'ünde s mitler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında normal gelişim göstermemiştir. Dermatome ve miyotome hücreleri farklılaşmalarını tamamlayamamış dejenerasyona uğramışlardır (şekil 4.16). Beş adet embriyodan 3'ünün karaciğer hücrelerinde sinüzoidler genişlemiş, hücrelerin morfogenezinde anomali meydana gelmiştir (şekil 4.17). Beş adet embriyodan 2'sinin kalp kas hücrelerinde ödem oluşumu görülmüştür (şekil 4.18). Böbrek yapısı incelendiğinde kübik epitel hücrelerinin oluşturduğu distal ve proksimal tüplerde kontrol grubuna göre farklılık görülmemiştir (şekil 4.19).





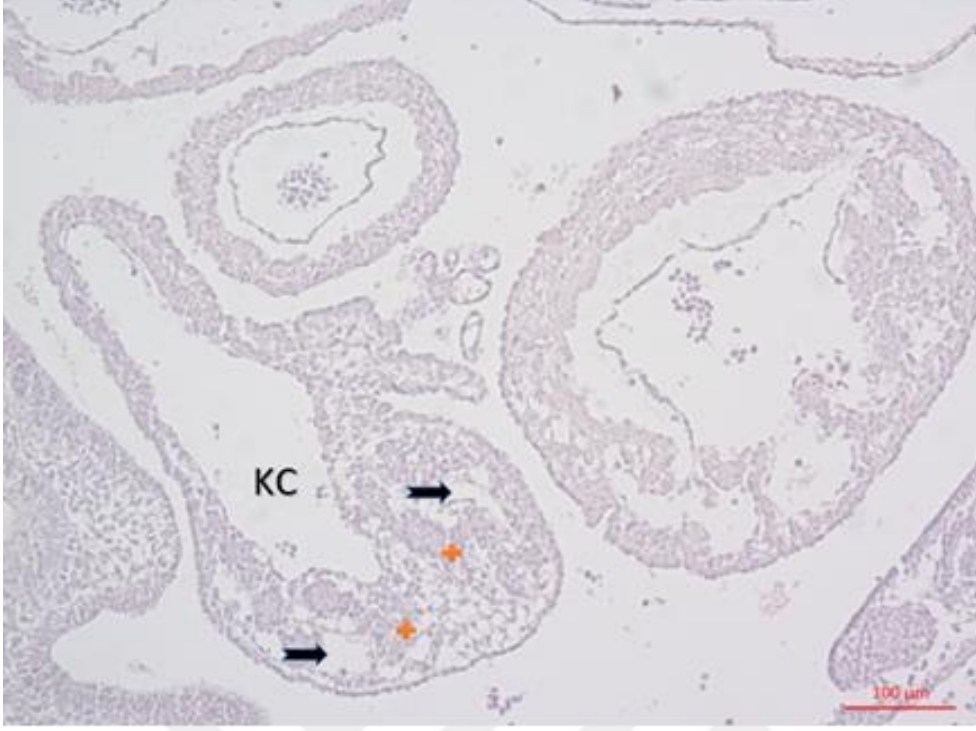
A



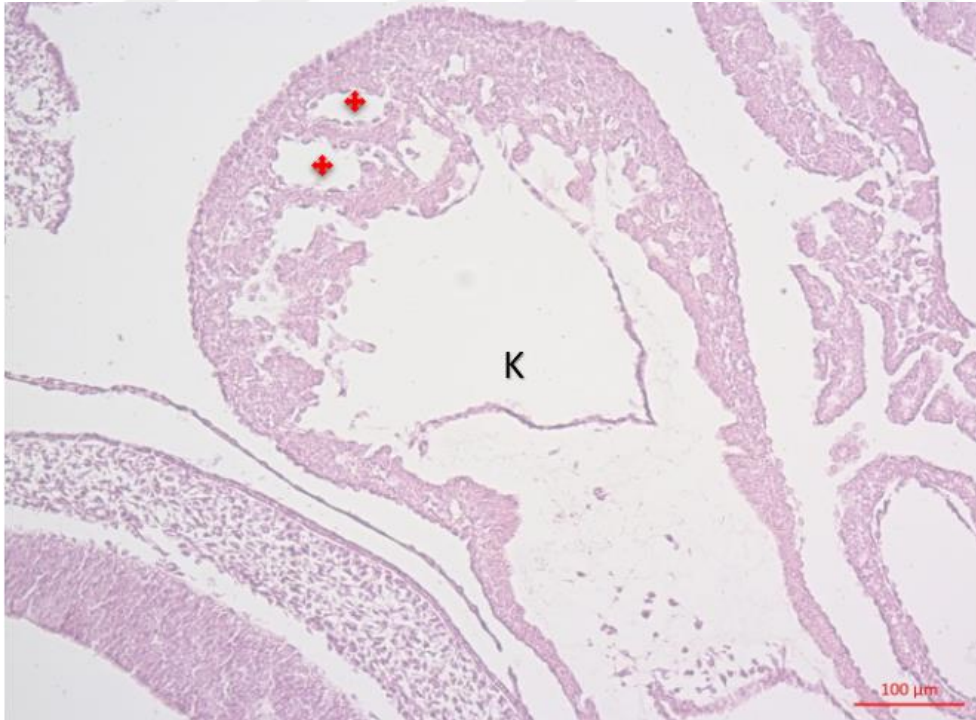
B

Şekil 4.16. A ve B: 0,08 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, s6mitlerin (S) g6r6n6ş6, dermatom (← d) ve miyotom(m→) h6cresel farklılaşmada deformasyon.

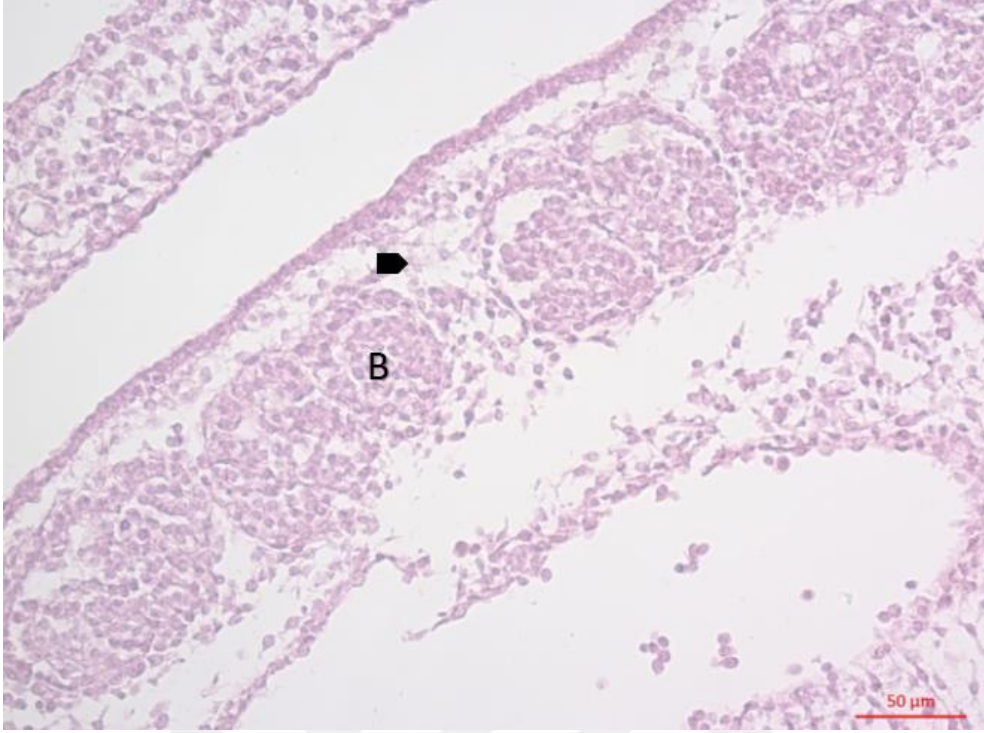
H&E



Şekil 4.17. 0,08 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, karaciğer (KC) dokusunda genişlemiş sinüzoidler (➡) hepatosit kümeleri (+). H&E



Şekil 4.18. 0,08 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, kalp (K) kas dokusunda ödem oluşumu (+). H&E



Şekil 4.19. 0,08 µg/L doz uygulanan 3 günlük embriyo kesitlerinde, böbrek (B) dokusunda distal tüp epitel hücreleri (■). H&E

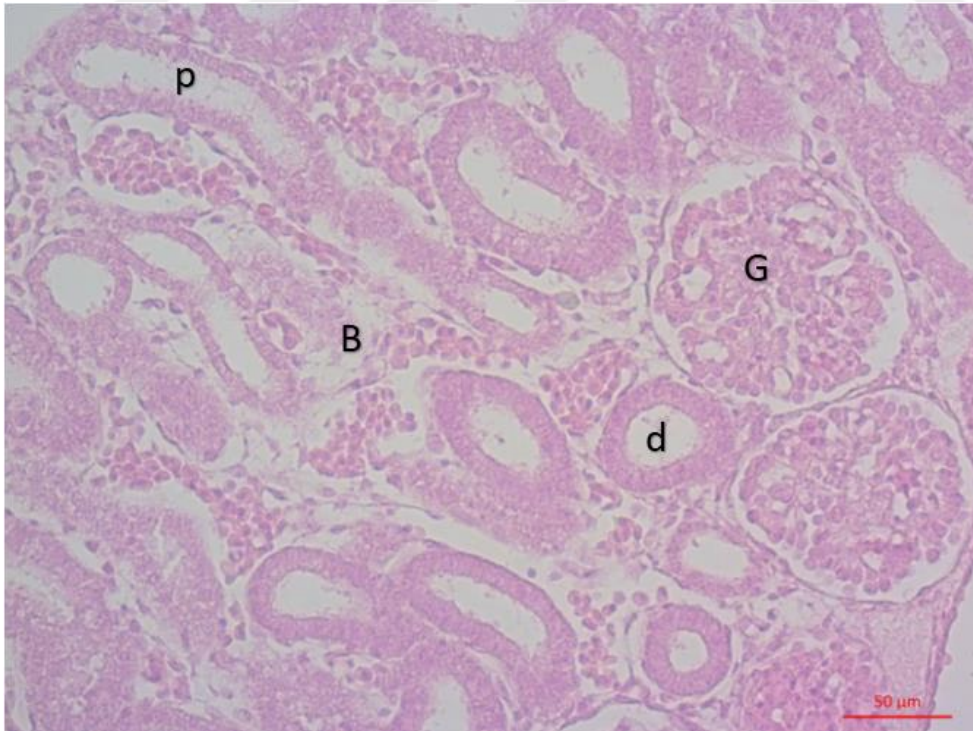
Organların oluşum aşamasının tamamlandığı 5 günlük embriyolar ele alındığında kontrol grubundaki tüm embriyolar normal gelişim göstermiştir. Embriyoların smit hücreleri sağlıklıdır. Smitlerdeki kesitlerde miyoblast farklılaşması belirginleşmeye başlamıştır (şekil 4.20). Embriyoların karaciğer dokusunda hepatosit hücreleri, sinüzoidler, sentral ven belirgin ve hücreler düzenlidir (şekil 4.21). Böbrek, kübik epitel hücreleri distal ve proksimal tüpü oluşturmuşlardır. Böbreklerdeki filtrasyon görevini yapan glomerlus hücrelerinin oluşumu tamamlanmıştır (şekil 4.22). Kalp gelişimi tamamlanmıştır. Kalp'in dış kısmında bulunan epikardiyum kalın olamayan hücre tabakasıyla kalbi sarar. Epikardiyum ve endokardiyum arasında miyokardiyum kas dokusunu oluşurmaktadır (şekil 4.23).



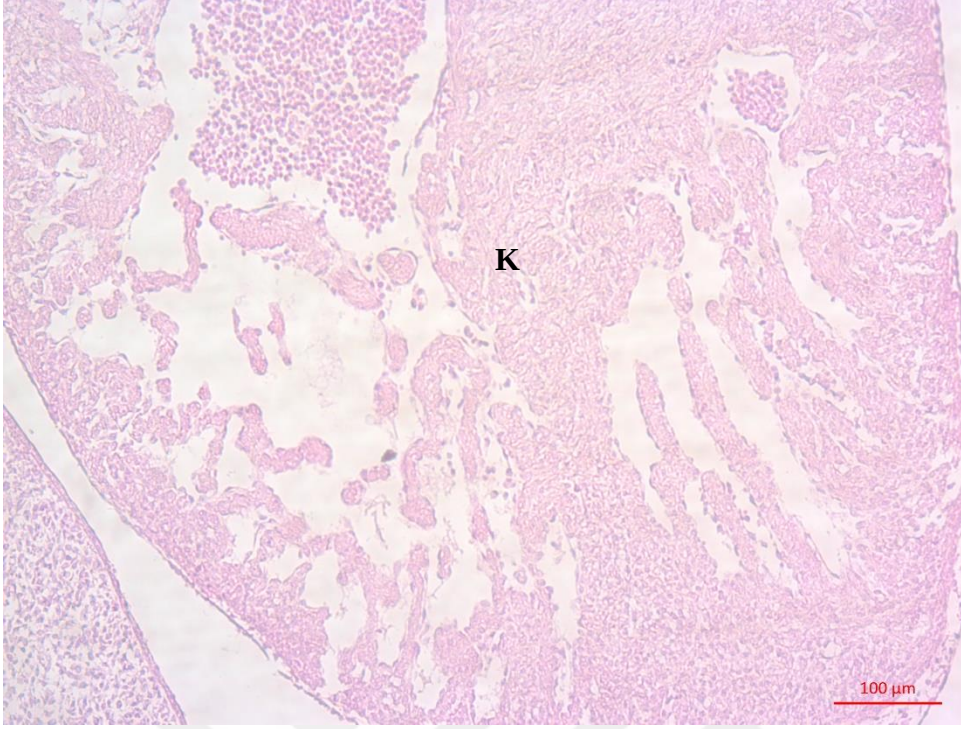
şekil 4.20. Kontrol grubuna ait, 5 günlük total embriyo kesiti. Sömitlerin (S) görünüşü, sömitlerde miyoblast uzama (←). H&E



Şekil 4.21. Kontrol grubuna ait, 5 günlük total embriyo kesiti. Karaciğer (KC), hepatosit hücreleri (h), sinüzoidler (s). H&E

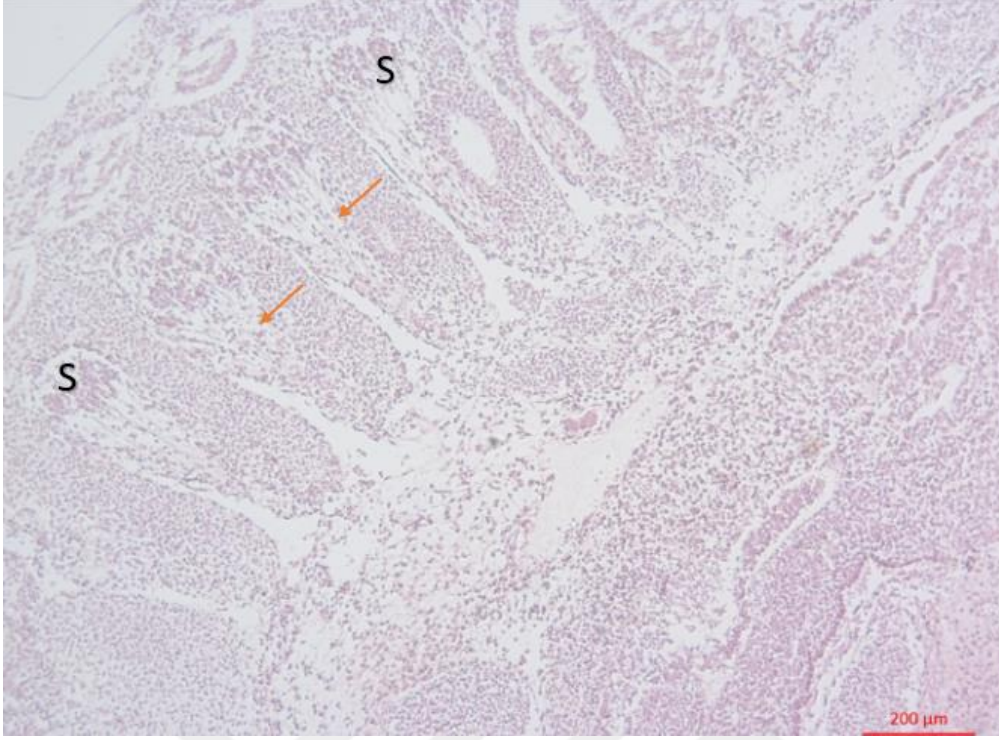


Şekil 4.22. Kontrol grubuna ait, 5 günlük total embriyo kesiti. Böbrek (B), distal tüp (d), proksimal tüp (p) ve glomerulus (G). H&E

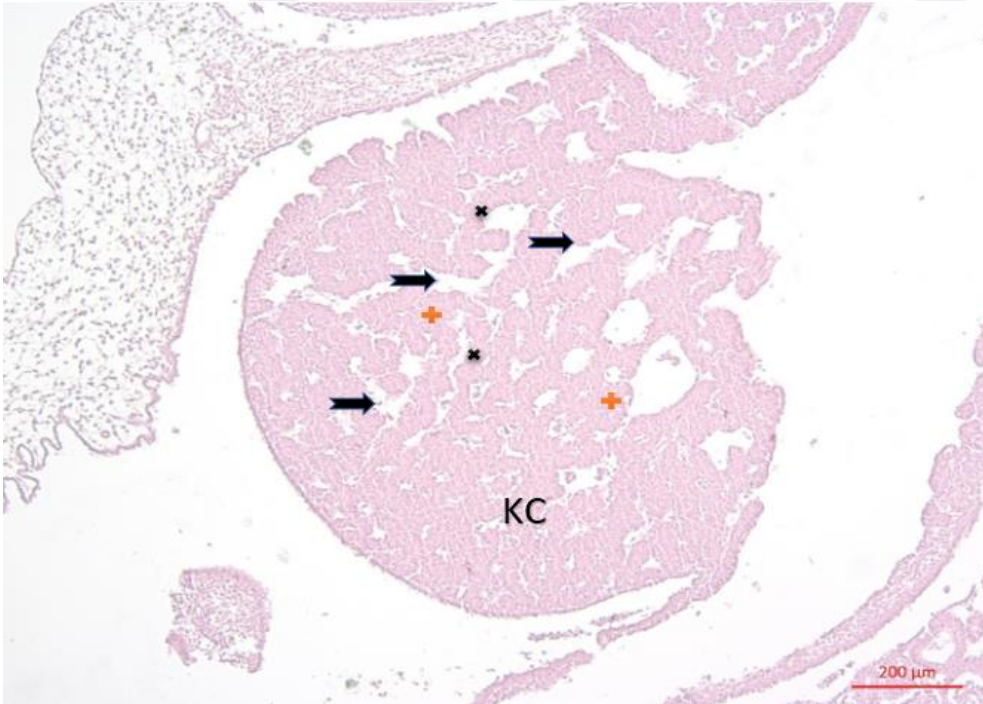


Şekil 4.23. Kontrol grubuna ait, 5 günlük total embriyo kesiti. Kalp (K), kas dokusu. H&E

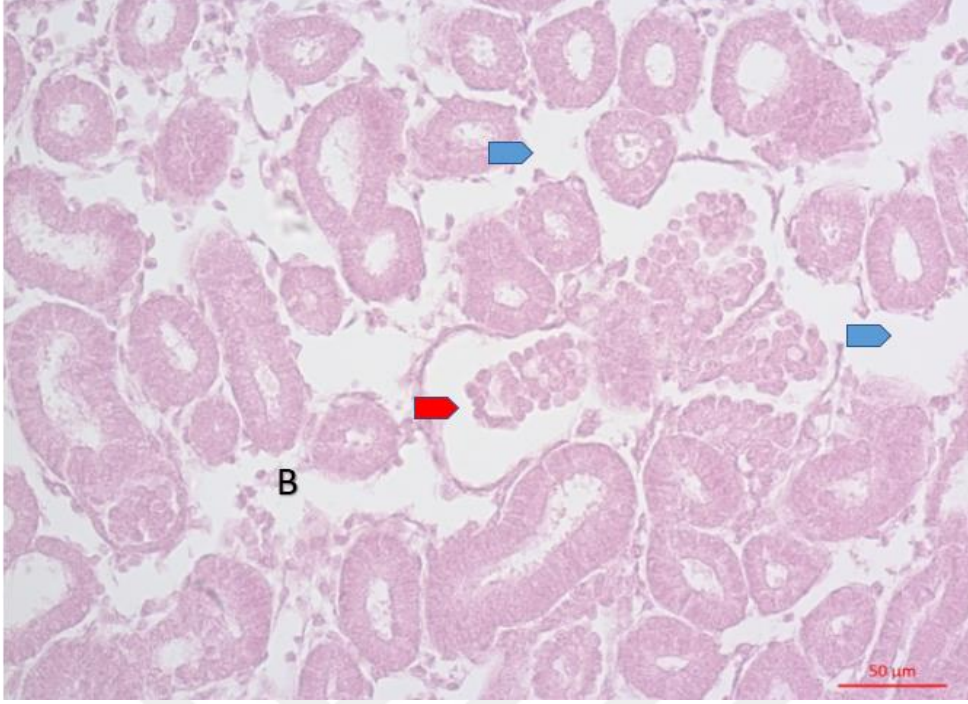
Beşinci güne ait 1. uygulama grubu olan 0,01 µg/L cyflutrin'e maruz bırakılmış yumurtalardan gelişen 5 adet embriyodan 3'ünde s6mit h6crelerinde d6zensizlik artmıştır. Miyoblastik uzamada h6creler d6zensizdir ve deformasyon g6r6lmektedir (Şekil 4.24). Beş adet embriyodan 2'sinin karaciğer h6crelerinde sin6zoidler genişlemiştir. Hepatosit h6crelerinde k6melenme ve kordonlaşma yapısı meydana gelmiştir (Şekil 4.25). Beş adet embriyodan 3'6n6n b6brek yapısında glomer6l h6crelerinin k666lmesiyle atrofi meydana gelmiştir. Glomer6l ve bowman kaps6l6 arasındaki alanda boşluk meydana gelmiştir. Distal ve proksimal t6pler arasında h6creler d6zensizlik ve genişleme g6r6lmektedir (Şekil 4.26). Beş adet embriyodan 2'sinde kalp incelendiğinde h6creler dokunun dejenerasyonu tespit edilmiştir (Şekil 4.27).



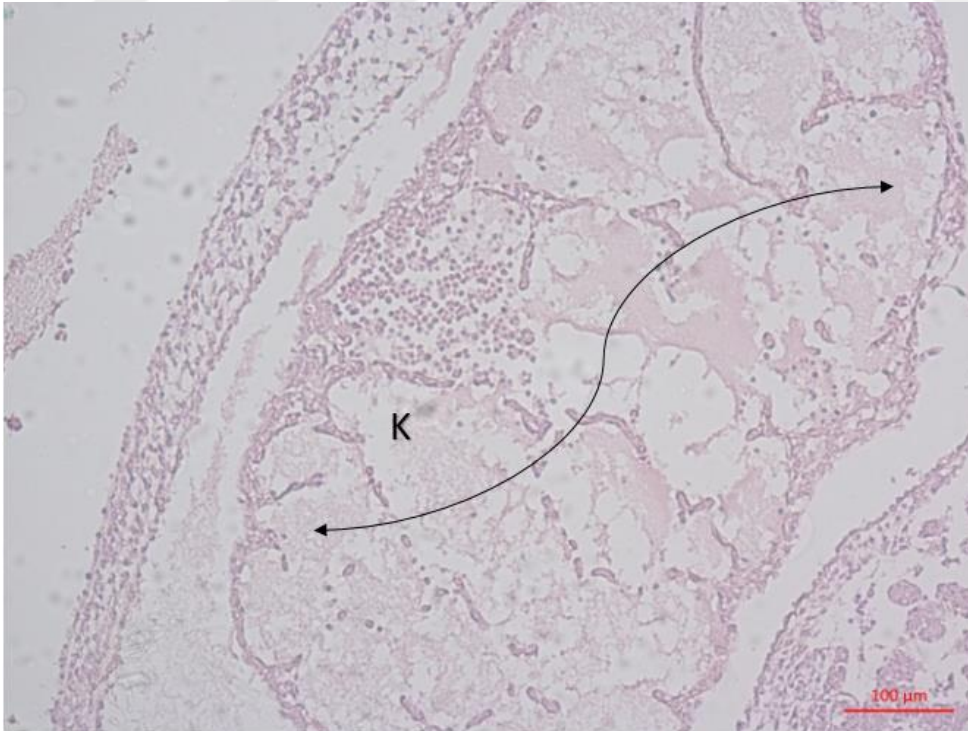
Şekil 4.24. 0,01µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, sömitlerin (S) görünüşü, sömitlerde miyoblast uzamasında hücresel deformasyon (↗). H&E



Şekil 4.25. 0,01 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, karaciğer (KC) dokusunda genişlemiş sinüzoidler (➡), hepatositlerde kümeleşme (+) ve kordonlaşma gösteren hepatositler (✗). H&E



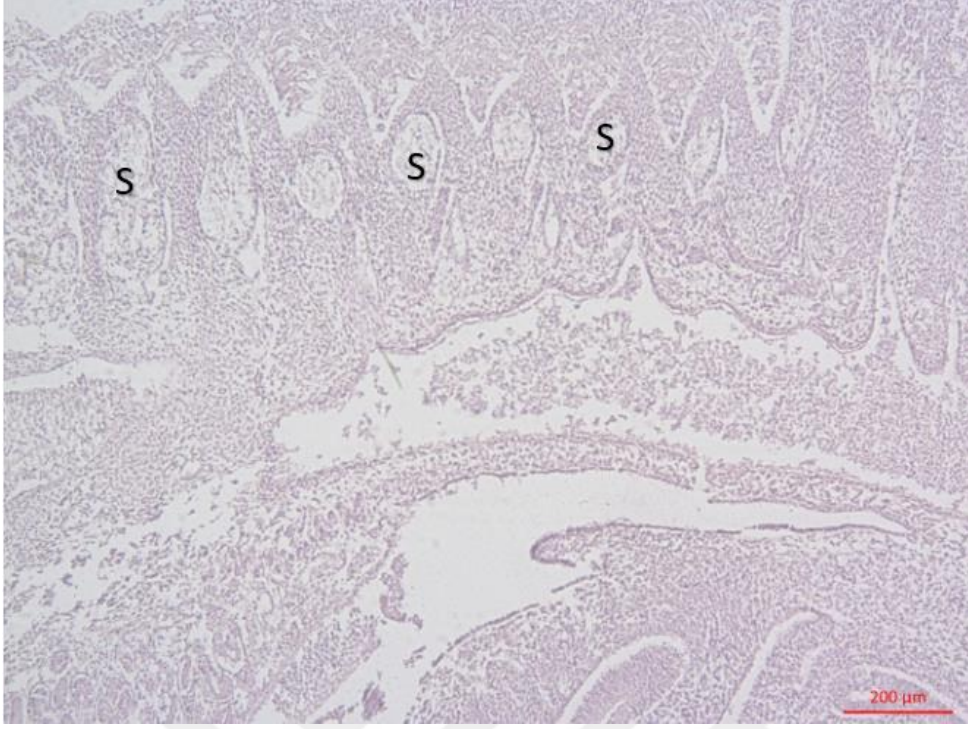
Şekil 4.26. 0,01 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, böbrek (B) dokusunda glomerül hücrelerinde atrofi, bowman kapsül alanında genişleme (➡), distal tüp ve proksimal tüpler arasında genişleme (➡). H&E



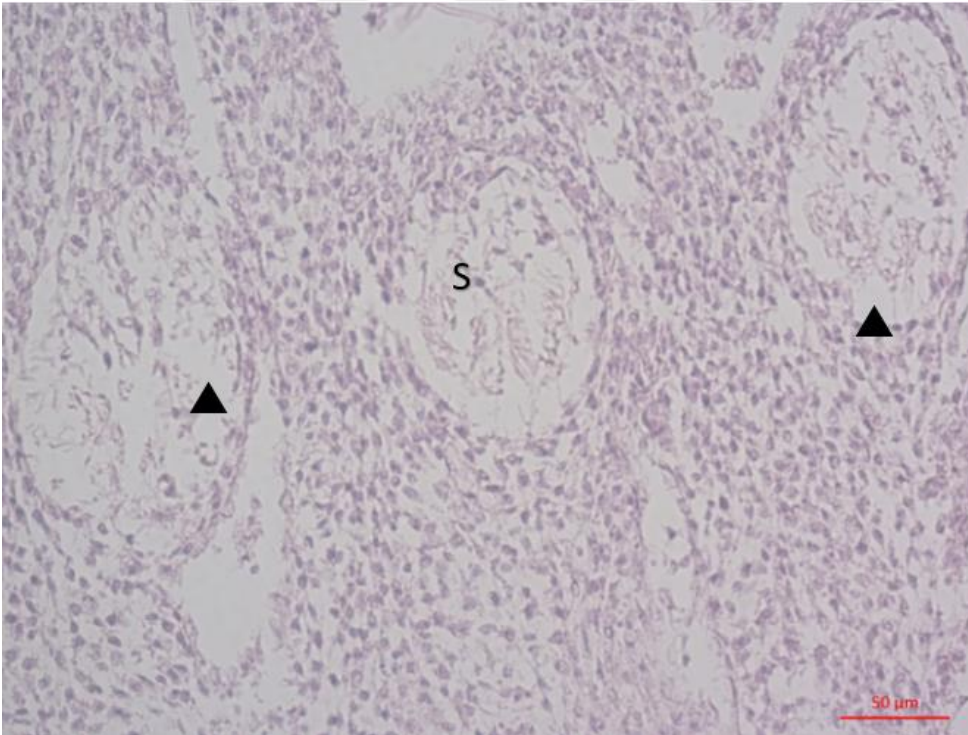
Şekil 4.27. 0,01 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, kalp (K) kas dokusu dejenerasyonu (↪). H&E

Beş günlük 0,04 µg/L cyfluthrin uygulanan embriyolar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 5 adet embriyodan 2'sinde sömitlerde düzensizlikler görülmüş ve miyoblastik uzama oluşmamış, sömitlerde nekroz görülmüştür (şekil 4.28). Beş adet embriyodan 3'nde karaciğer dokusunda genişlemiş sinüzoidler, hepatosit hücrelerinde kümeleşme ve kordonlaşma görülmüştür (şekil 4.29). Beş adet embriyodan 3'nde böbrek yapısının bütünlüğü bozulmuş haldedir. Distal ve proksimal tüplerin arasında genişlemeler çok fazla oluşmuştur. Distal tüplerde kübik epitel hücrelerinin bazal laminadan ayrımı ve atrofi oluşumu görülmüştür (şekil 4.30). Beş adet embriyodan 3'nde kalp kas dokusu hücre bütünlüğünü kaybetmeye başlamıştır. Kas dokusunda ödem oluşumu görülmüştür (şekil 4.31).



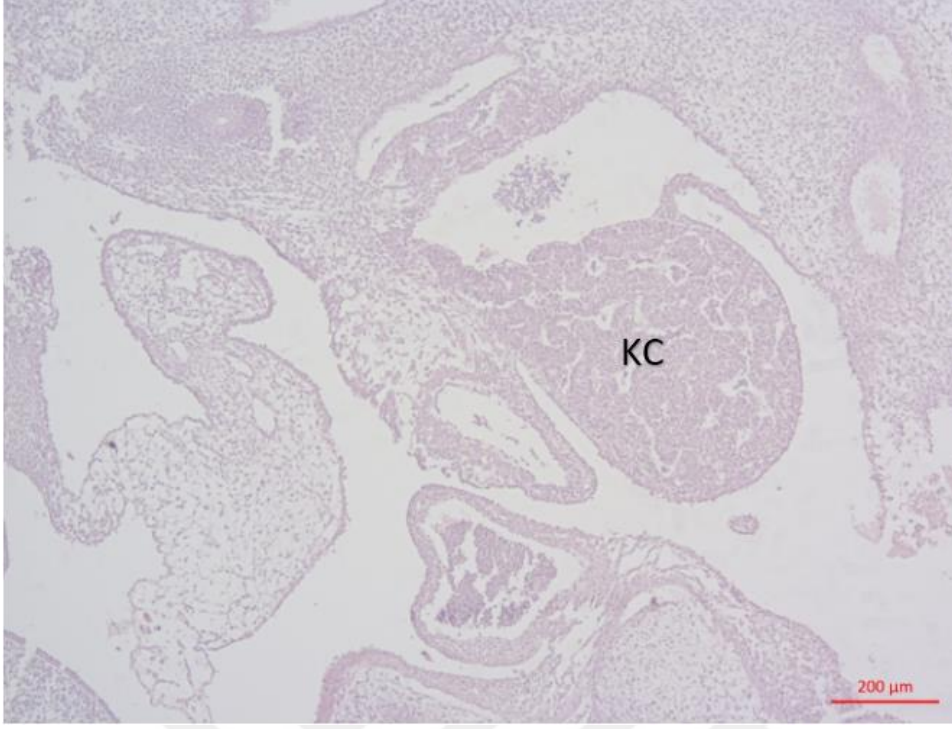


A

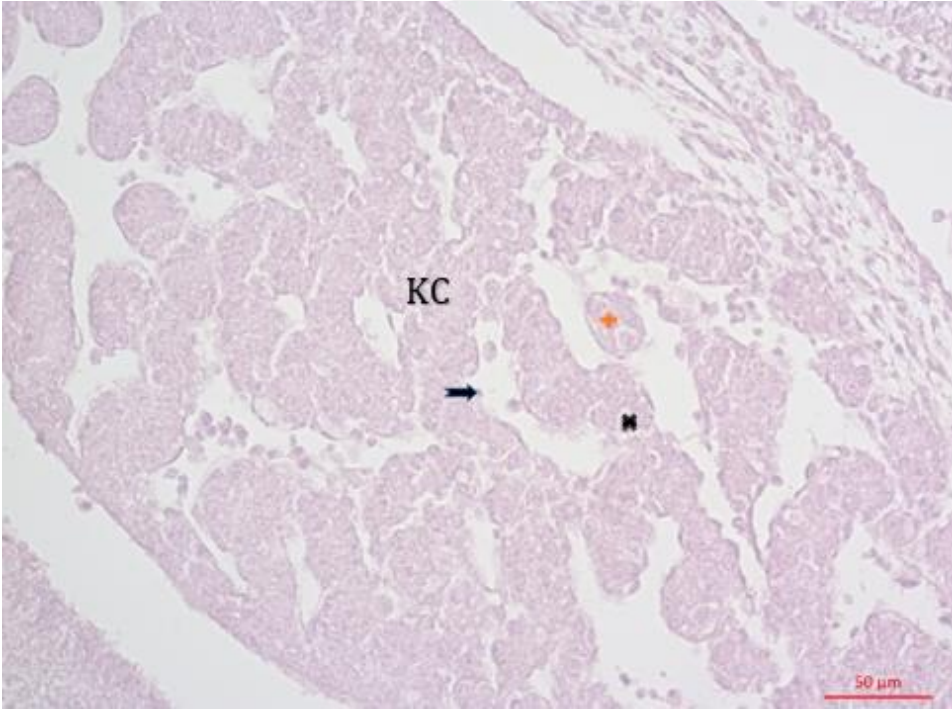


B

Şekil 4.28. A ve B: 0,04 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, sömitlerin (S) görünüşü, sömitlerde nekroz oluşumu (▲).H&E

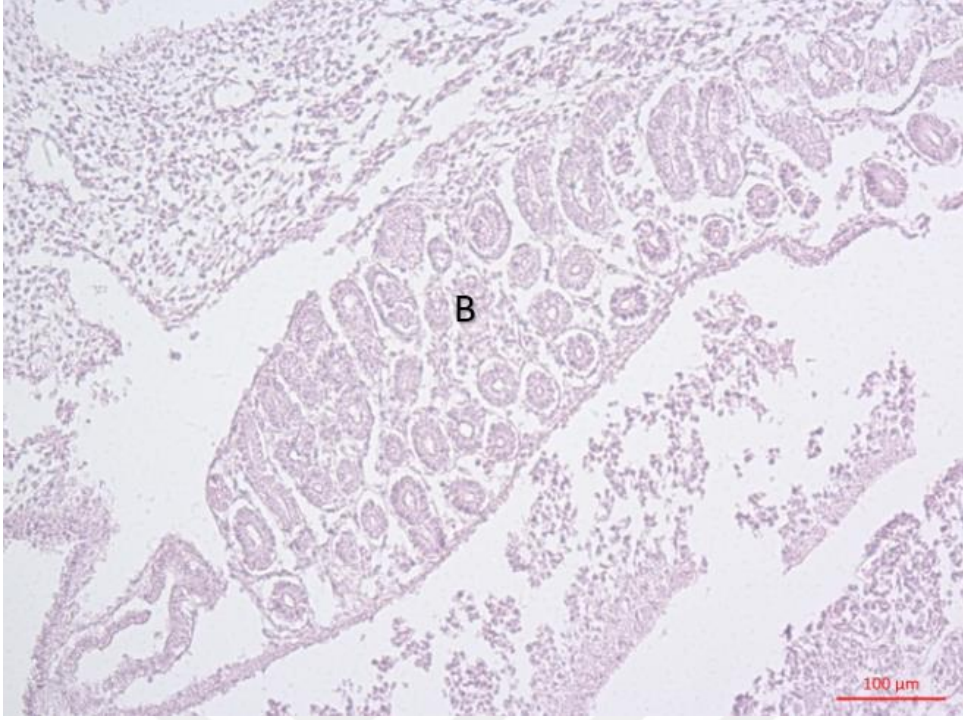


A

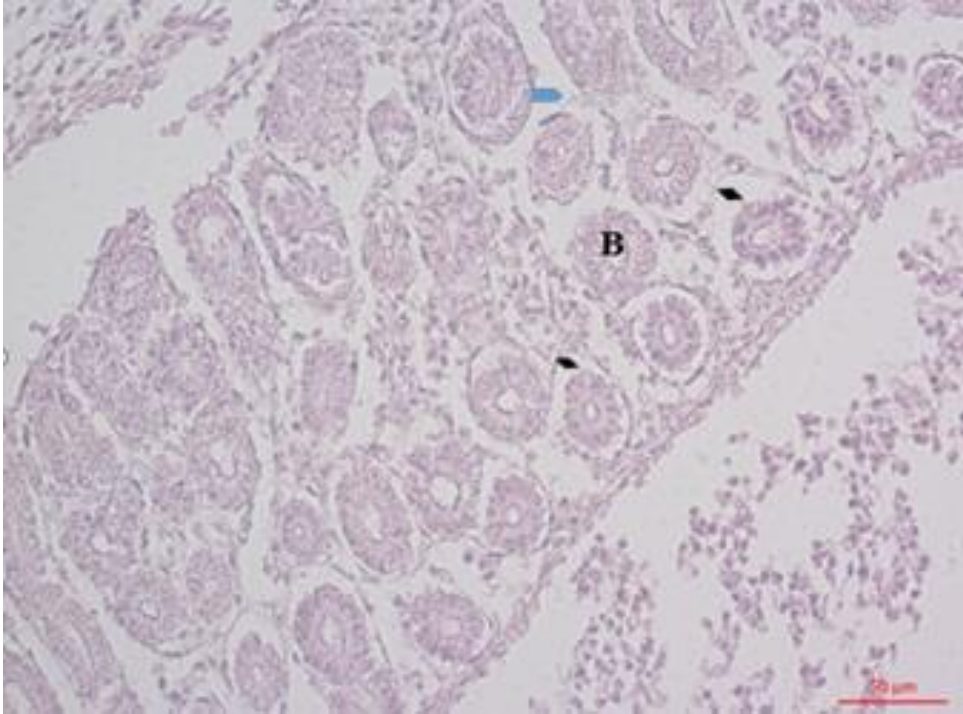


B

Şekil 4.29. A ve B: 0,04 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, karaciğer (KC) dokusunda genişlemiş sinuzoidler (→), hepatositlerde kümeleşme (+) ve kordonlaşma (■). H&E

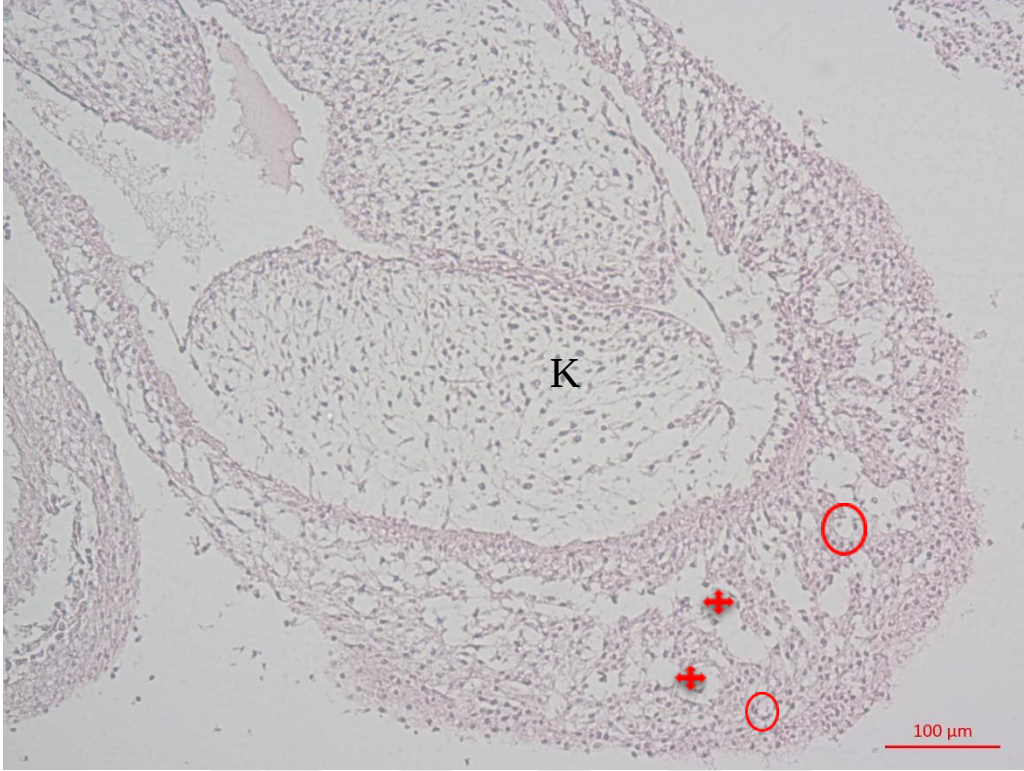


A



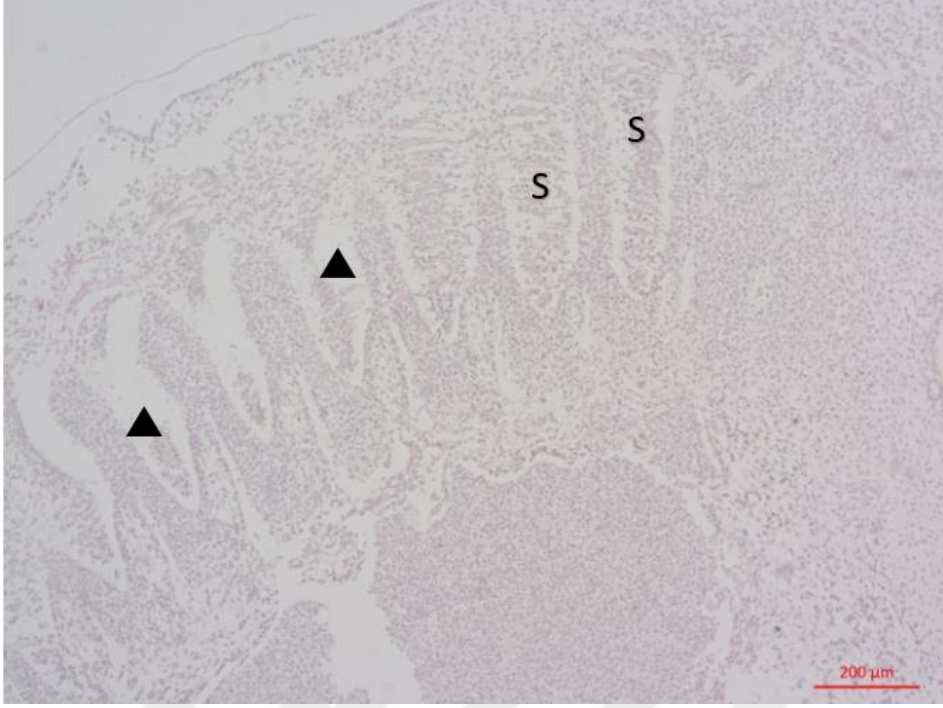
B

Şekil 4.30. A ve B: 0,04 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, böbrek (B) dokusunda distal tüp ve proksimal tüpler arasında genişleme (➡), distaltüplerde atrofi (➡).H&E

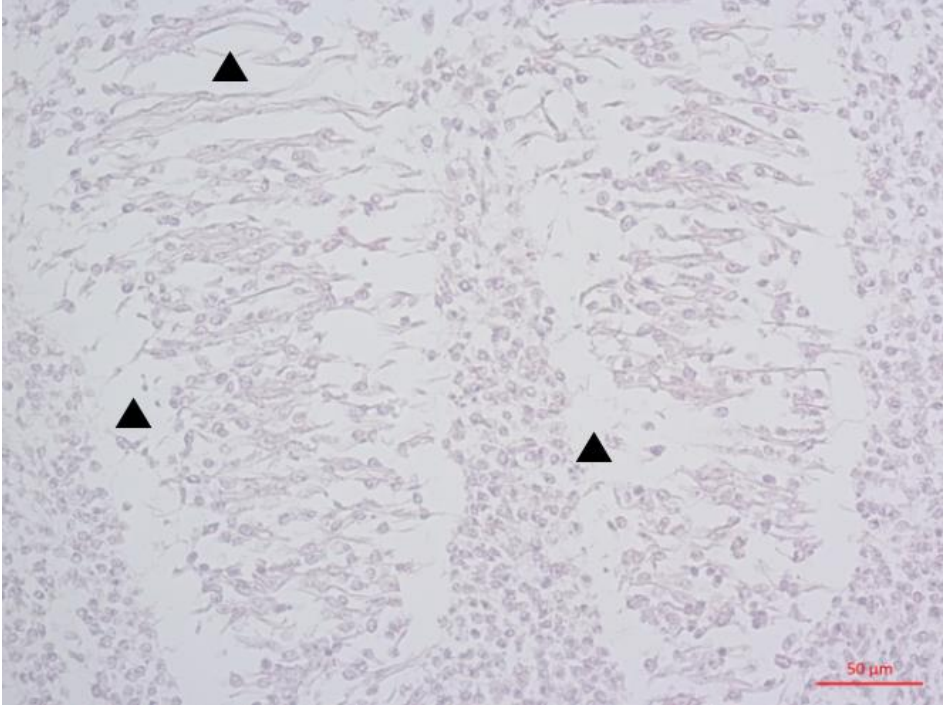


Şekil 4.31. 0,04 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, kalp (K) kas dokusunda vakuolizasyon (○) ve ödem oluşumu (+). H&E

Beşinci güne ait en yüksek doz olan 0,08 µg/L cyfluthrin'e maruz bırakılan yumurtalardan gelişen 5 adet embriyodan 3'ünde sömitlerin hücresel düzensizliği artmıştır, hücre yapısında bozulma tespit edilmiştir (Şekil 4.32). Beş adet embriyodan 4'ünde karaciğer dokusunun hücresel bütünlüğü ileri boyutta bozulmaya uğramıştır. Sinüzoidler arası boşluklar artmıştır. Boşluklarda yoğun eritrositler görülmektedir. Hepatosit hücrelerinde kümelenme ve kordonlaşma meydana gelmiştir (Şekil 4.33). Beş adet embriyodan 4'ünde böbrek yapısı bütünüyle dejenere olmuştur. Glomerül hücrelerinde atrofi oluşumu ile bowman kapsülü arasında genişleme. Distal ve proksimal tüplerde epitel hücre nekrozu meydana gelmiştir (Şekil 4.34). Beş adet embriyodan 3'ünde kalp incelendiğinde kalbi meydana getiren kas tabakalarında dejenerasyon ve hemarojiye neden olduğu görülmüştür (Şekil 4.35).

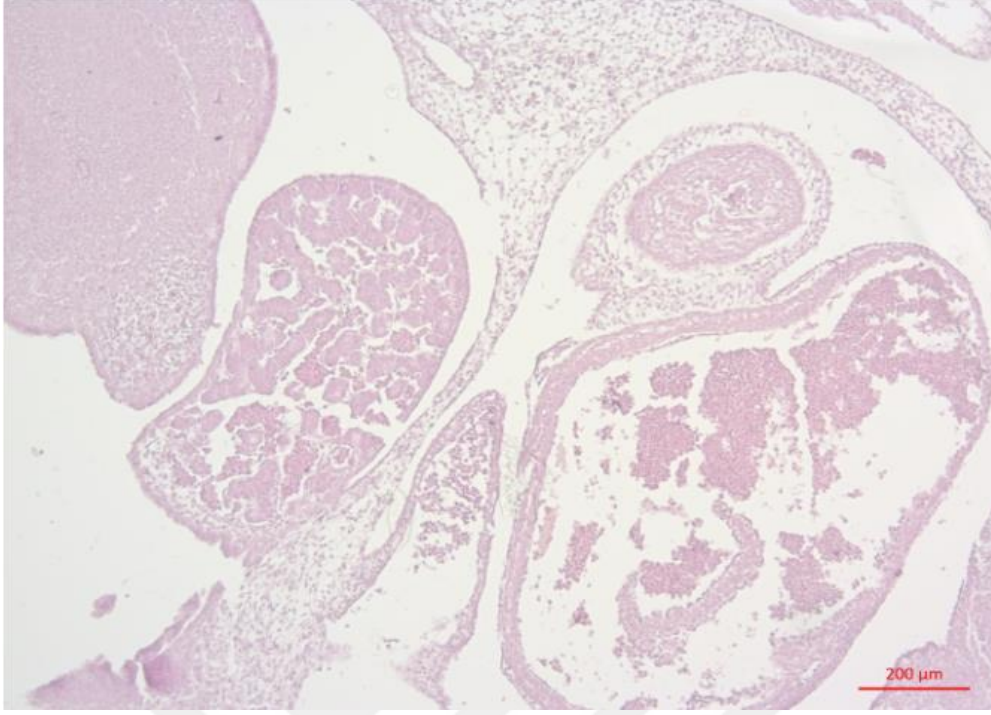


A

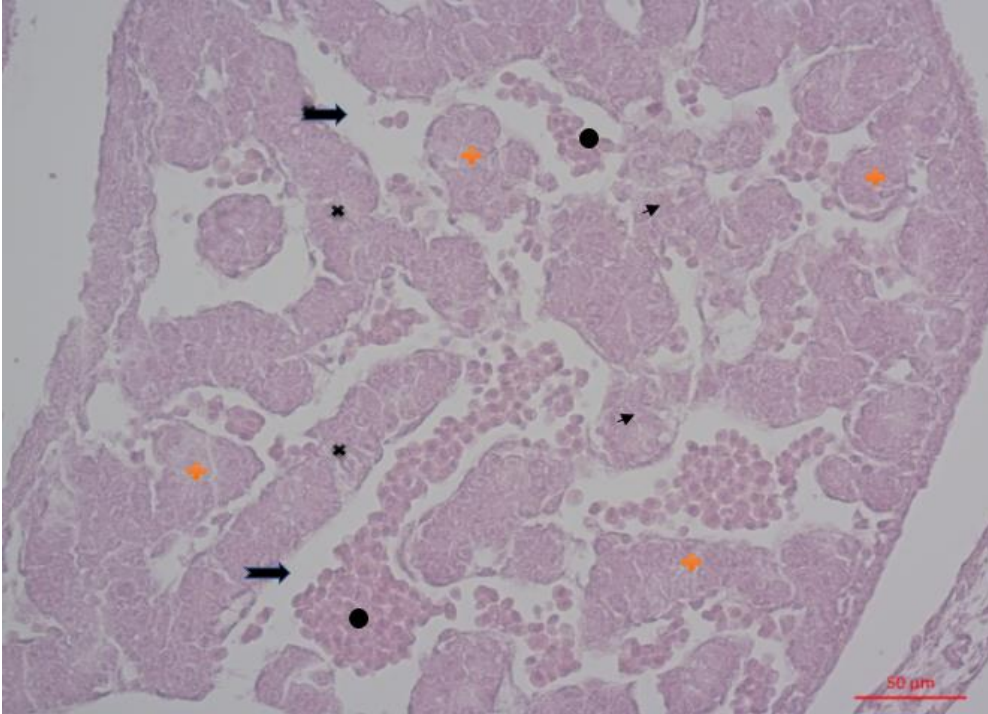


B

Şekil 4.32. A ve B: 0,08 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, s6mitlerin (S) g6r6n6ş6, s6mitlerde nekroz oluşumu (▲) ve genel yapıda kanama. H&E

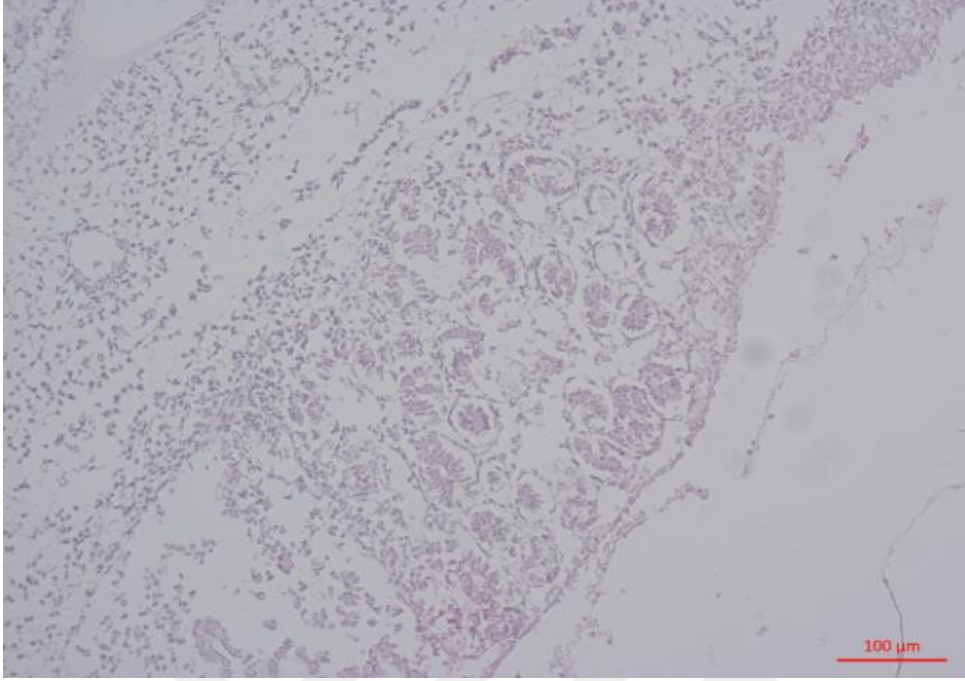


A

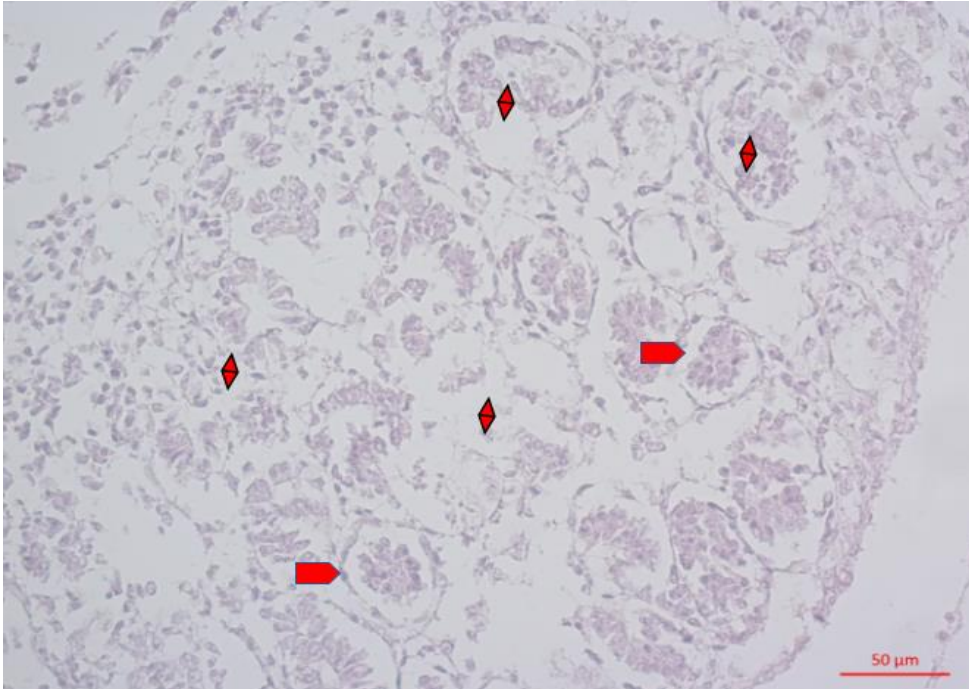


B

Şekil 4.33. A ve B: 0,08 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, karaciğer dokusunda genişlemiş sinuzoidler (→), hepatositlerde kümeleşme (+) ve kordonlaşma (*), hepatositlerde nekroz (→), eritrosit (●). H&E

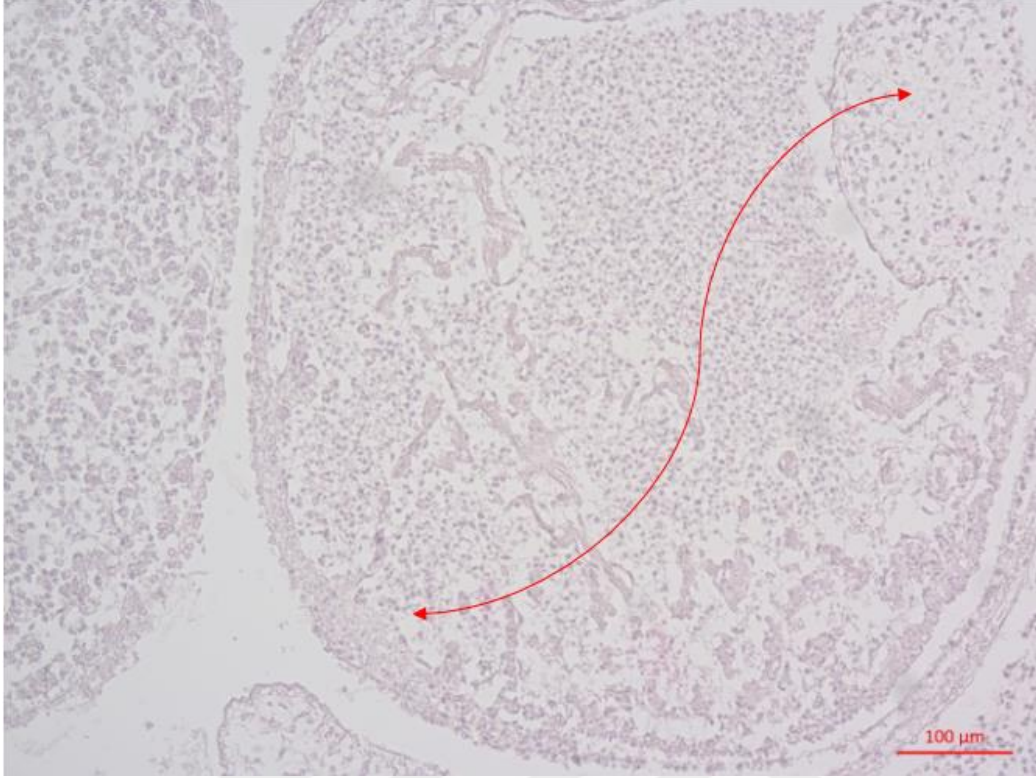


A



B

Şekil 4.34. A ve B: 0,08 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, böbrek doku glomerül hücrelerinde atrofi, bowman kapsül alanında genişleme (➡), glomerül hücrelerinde, distal ve proksimal tüplerde epitel hücre nekrozu (◆). H&E



Şekil 4.35. 0,08 µg/L doz uygulanan 5 günlük embriyo kesitlerinde, kalp dokusu dejenerasyonu ve hemaraji (↔). H&E

4.2. Tartışma

Dünya nüfusunun artışına bağlı olarak besin ihtiyacını sağlamak amacıyla tarım ilaçlarının kullanımı kaçınılmazdır ve yoğunluğu da her geçen gün artmaktadır. Ürünleri zararlılarından korumak amacıyla pestisit kullanımı, tarımla sınırlı kalmayıp, evlerde, bahçelerde, depo alanlarında kullanılmaktadır (Aktar ve ark. 2009; Chandola ve ark. 2011; Gupta ve ark. 2012). Bu nedenle pestisitlerin bilinçli ya da bilinçsiz olarak yaygın kullanımından kaynaklanan çevresel kirlilik günümüzde bir tehdit unsuru oluşturmaktadır (Sánchez-Bayo 2006).

Temel olarak pestisitlerin kullanım amacı hedef organizmalar (böcek, fungus, bitki, vs..) olsa da diğer canlılar için de olası potansiyel toksik etkiye sahiptir (Cox, 1994). Bu nedenle hedef olmayan organizmaların bu pestisitlerden etkilenme şekillerini ortaya koyan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda hedef olmayan organizmaların çeşitli yollarla maruz kaldıkları pestisitlerden, biyokimyasal, histopatolojik, fizyolojik veya embriyotoksosite açısından ne yönde etkilendikleri ortaya konulmaya çalışılmıştır. Fluvalinate'ın lebistes balıkları (*Poecilia reticulata*) üzerine akut etkisini, gümüş sazan

balığında deltamethrin'in biyokimyasal ve histolojik etkilerini, permetrin ve sipermethrin'in, düşük konsantrasyonlarda zebra balığının embriyonal gelişimi üzerine toksisitesi, tavuk embriyolarında permethrin tarafından indüklenen gelişimsel anomaliler, albino fareler üzerine cyfluthrin'in teratojenik etkisi, tetramethrin'in albino farelerde serum proteinleri üzerine etkisi, lambda-cyhalothrin'in sıçan böbrekleri üzerindeki toksik etkileri, tavşanlarda cyfluthrin'in toksik etkileri, (Yavuz ve ark. 1996; Çalışkan, 2010; Syed ve ark. 2010; Fetoui ve ark., 2010; Yalçinkaya ve Yerli, 2013; Yang ve ark. 2014; Anleeb ve ark. 2014; Karim ve ark. 2016) bu anlamda yapılmış çok sayıda çalışma içerisinde örneklerdir.

Sentetik bir piretroit olan cyfluthrin yaygın olarak kullanılan pestisitlerdendir. Literatür taramalarında cyfluthrin ve cyfluthrin'in dahil olduğu sentetik piretroitlerin toksisitesi ile ilgili tavşanlar üzerinde teratojenik etkilerini, sazan balıklarında sublethal toksisite ile oluşabilecek biyokimyasal, hematolojik ve histopatolojik değişiklikleri, albino rat karaciğeri üzerinde histokimyasal etkileri, albino fareler üzerine potansiyel teratojenik etkiyi, hamile farelere beta-cyfluthrin uygulanarak fetüslerde meydana gelebilecek teratojeniteyi, ratlarda karaciğer ve böbrek üzerine etkilerini, deltamethrin'in balıklar üzerine toksisitesini, sıçanlarda cypermethrin kaynaklı üreme toksisitesini, tavuk embriyosu üzerine permethrin'in gelişimsel anomalilerini, transfluthrin'in civciv embriyoları üzerine teratojenik ve embriyotoksik etkilerini, deltamethrin'in civciv embriyosu üzerine toksisitesini (Yavuz ve ark. 1996; Sepici-Dinçel ve ark. 2009; Bhushan ve ark. 2010; Syed ve ark. 2010; Ahmad ve ark. 2018; Amin ve Hashem 2012; Yılmaz ve ark. 2014; Sharma ve ark. 2014; Andleeb ve ark 2014; Chowdhury ve ark. 2015; Bhaskar ve ark. 2016) çalışmışlardır. Ancak sentetik piretroitlere ait literatür taramasından elde edilen bilgilere göre, cyfluthrin'in tavuk embriyosuna etkisi konusunda yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada model organizmalardan tavuk embriyosu üzerine sentetik bir piretroit olan cyfluthrin'in üç ayrı dozda (0,01, 0,04 ve 0,08 µg/L), erken dönem (gelişimin 3. ve 5. günü) embriyo gelişiminde embriyotoksisite ve teratojenik etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Kanatlı yumurtaları; kısa sürede embriyoların elde edilebilir olması, bu nedenle deneylerin tekrar edilebilirliğinin mümkün olması, gelişimin kolaylıkla gözlemlenebilmesi, organogenez süresinin kısa olması, embriyo gelişim safhalarının iyi bilinmesi, çok sayıda embriyo kullanılması yapılacak çalışmalar için avantaj sağlamaktadır (Vesely ve Vesela

1991; Özcan 1992; Jelinek ve Marhan 1994; Davies ve Freeman 1995). Ayrıca Rosenbruch (1994 ve 1997) çalışmalarında kanatlı embriyosunun acıya duyarlılığının gelişmemiş olması ve kuluçka periyodunun erken evrelerinde (ilk üçte birlik evrede) kullanımının kolaylığı dolayısıyla hayvan deneylerine gerçek bir alternatif olabileceğini bildirmiştir. Bu sebeplerle bu çalışmada cyfluthrin embriyo toksisite için kanatlı yumurtasının kullanması tercih edilmiştir.

Kimyasalın yumurtaya uygulanma şekli ve zamanı önemli bir basamaktır. Kuş embriyoları ile ilgili yapılan embriyotoksisite çalışmalarında, kimyasalın veriliş biçimi ile ilgili emülsiyona daldırma (Bhaskar ve ark. 2012), fumigasyon ile muamele (Hayretdağ ve Kolankaya 2008) ve yumurta içine enjeksiyon yöntemleri kullanılmaktadır (Songur ve Kolankaya 2001; Ugğini ve ark. 2010; Andleeb ve ark. 2014). Pestisitlerin teratojenik etkilerini belirlemek için kuluçka başlangıcında hava kamarasına veya yumurta sarısına enjeksiyonu, ilaçların teratojenik etkilerini belirlemek için ise kuluçkanın 3. ve 4. gününde enjeksiyon yapılması gerektiğini vurgulamıştır (Özcan, 1992). Songur ve Kolankaya (2001) pentakloronitrobenzen'in tavuk embriyoları üzerine etkisini çalışmışlar ve döllenmiş yumurtaya *In ovo* yöntemi ile uygulama yapmışlardır. Kimyasalı çözücü içerisinde hazırladıktan sonra bir enjektör ile yumurtanın hava boşluğuna girerek vitellusa enjekte etmişlerdir. Uygulama kolaylığı, yumurtaların enfekte olma riskinin en düşük düzeyde olması, verilen solüsyonun homojen ve hızlı bir şekilde diffüze olması ve diğer yöntemlerde söz konusu olan yumurta içi basınçtaki artışın embriyoda meydana getirebileceği mekanik hasarları ortadan kaldırdığı için hava kamarası ideal enjeksiyon bölgesi olarak kabul edilmektedir (Prelusky ve ark., 1987; Çelik ve ark., 2000; Sur, 2001; Öznurlu, 2003). Bu sebeplerle bu çalışmada, döllenmiş yumurtaların 0. gününde enjektörle hava boşluğundan girilerek cyfluthrin yumurtanın hava boşluğundan içine doğrudan enjeksiyonu şeklindeki uygulama tercih edilmiştir. Diğer avantajlarının yanı sıra bu yöntem ile embriyonun doğrudan maruz kaldığı dozu bilmek mümkün olmaktadır.

Özcan (1992) yapmış olduğu çalışmada, ilaç teratojenitesini belirlemek için kuluçkanın 3. ve 4. gününde enjeksiyon yapılması gerektiğini vurgulamıştır. Çünkü embriyonun 3. gününde mitoz ve hücre diferansiyasyonu olaylarının hızlı bir tempoda gerçekleştiği gün olan organogenezin en kritik evresidir. Çok sayıda meydana gelen morfogenetik olay, kuluçkanın bu evresinde gerçekleşmektedir (Kucera ve Burnand, 1987; Etche, 1996). Bu dönemde embriyonik gelişimi bozan fiziksel ya da kimyasal etkiler

embriyonik ölümlere yol açabildikleri gibi, yapısal ve fonksiyonel bozukluklara da sebep olabilmektedir (Kucera ve Burnand, 1987). Beşinci günde embriyo yaşamak için ihtiyaç duyduğu tüm organlara sahiptir ve embriyonun tüm kısımları tanımlanabilir (Romanoff, 1997). Bu evrede teratojenik ve embriyotoksik etkiler kısa sürede detaylı olarak gözlemlenebilmektedir. Bazı çalışmalarda tavuk embriyo gelişiminin 7., 14., 16. ve 21. gününe ait embriyotoksik ve teratojenik etkilerini incelemişlerdir (Anwar ve Shakoori 2010; Andleeb ve ark. 2014; Chowhury ve ark. 2015; Ahmad ve ark. 2018). Embriyonik dönemin en başında olası karşılaşılan bir kimyasal, embriyonik sürecin tamamlanmasını olumsuz yönde etkileyecektir. Bu nedenle bu çalışmada 0. günden itibaren uygulanan cyfluthrin'in değişik dozlarda hücre çoğalması, göçü ve farklılaşmasını ne yönde etkilediğini belirleyebilmek için erken gelişimin kritik evresi olan 3. ve 5. gün tercih edilmiştir. Organ gelişim ve taslaklarının olduğu bu aşamalarda meydana gelen herhangi bir düzensizlik embriyonun diğer gelişim aşamalarını olumsuz yönde etkileyeceğinden, 3. ve 5. günlerde rastlanan teratojenik etkilerin belirlenmesi oldukça önemlidir.

Morfolojik incelemelerde cyfluthrin'in dahil olduğu sentetik piretroitlere maruz bırakılan tavuk embriyolarında, anensefali, mikrosefali, asternia, kısalmış ve bükülmüş bacaklar, mikrotalamus, anoftalmus, dar boyun, bükülmüş boyun, ektopia kordis, gastroşizis, hidrosefali, displazi ve mikromelia gibi morfolojik bozukluklara rastlanmıştır (Bhaskar ve ark. 2012; Andleeb ve ark. 2014; Chowdhury ve ark. 2015; Bhaskar ve ark. 2016; Uggini ve ark. 2012; Syed ve ark. 2010; Naveed ve ark. 2012). Bu çalışmada da benzer olarak dar boyun ve bükülmüş boyun, ekstremitte tomurcuklarında gelişim geriliği ve olması gerekenden küçük göz yapısına rastlanmıştır. Bu bulguların yanı sıra, daha sonra oluşacak olan damar sisteminin öncülleri olan kan adacıkları oluşumunda deformasyon tespit edilen diğer önemli bir bulgudur. Benzer bulgulara rastlanılan Songur ve Kolankaya'nın (2001) yaptıkları çalışmada da belirttiği gibi bu durumun nedeni, muhtemelen erken embriyonik gelişimdeki hücre göçü mekanizmalarının bozulmasından kaynaklı olabilir.

Erişilebilir literatürlerde cyfluthrin'in farklı türler üzerindeki histolojik etkisi ile ilgili veriler kısıtlıdır (Sepici-Dinçel ve ark. 2009). Ulaşılan çalışmalarda verilen bulgular, karaciğerde sinüzoidal boşluklarda genişleme, dejenerasyon ve hücresel bütünlükte bozulma, böbrekte bowman kapsülünde boşluk, epitel hücrelerde dejenerasyon ve genişlemeler şeklindedir (Omotuyi ve ark. 2006; Oularbi, 2014; Rajawat ve ark. 2015;

Abde-Daim, 2016; Andem, 2016). Bu çalışmada da morfolojik bulguların daha mikro seviyede neler olduğunu görebilmek adına yapılan histolojik kesitlerin incelenmesi sonucu, 3 günlük embriyolarda sömitlerde atrofi, karaciğer hepatositlerinde dejenerasyon, sinüzoidlerde genişleme görülmüştür. Beş günlük embriyoların smitlerinde; hücresel düzensizlik artmış, karaciğerde; sinüzoidal boşluklar artmış, hepatositlerde kümeleşme ve kordonlaşma meydana gelmiş ve böbrekte; glomerül hücrelerinde atrofi, kalp; kas tabakasında dejenerasyon olduğu bulunmuştur. Cyfluthrin uygulanan döllenmiş kanatlı yumurtalarında artan doz etkisiyle embriyo gelişiminde olumsuz etkilerin arttığı da görülmüştür.



BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sentetik piretroitler grubundan bir insektisit olan cyfluthrin'in embriyotoksik etkilerini ortaya koymak amacıyla planlanan bu çalışma neticesinde kuş embriyolarının erken embriyonik gelişim aşamalarında, doz artışına bağlı olarak artan gelişimsel toksisitesi ortaya konulmuştur. Çalışmadan elde edilen morfolojik ve histolojik bulgular, bu insektisite yönelik literatürdeki az sayıdaki embriyotoksisite çalışmalarına önemli katkı sağlayacaktır.

Bunun yanı sıra, sentetik piretroit grubundaki insektisitler, diğer insektisit gruplarına (organik fosforlu, karbamat ve organik klorlu insektisitler gibi) göre çevreye ve diğer canlılara olan etkileri bakımından daha güvenli kimyasallar olarak kabul edilmektedirler. Ancak tüm diğer çalışmalarda olduğu gibi bu çalışma da göstermiştir ki, hedef organizmalar için kullanılan pestisitlerde uygulamada gerekli tedbirler alınmaz ise, hedef olmayan organizmaların da bu pestisitlerden etkilenmeleri kaçınılmazdır. Özellikle uygulanan pestisitinin hedef organizması üzerinden beslenen canlılar, bu kimyasallardan daha fazla etkilenebilmektedir. Bu nedenle, kimyasalların uygulanması esnasında doz, uygulama biçimi ve süresine dikkat edilmesi son derece önemlidir.

Tüm organizmalarda embriyonik dönem, her türlü çevresel etki için son derece hassas bir dönemdir. Bu dönem içerisinde karşılaşılabilecek herhangi bir olumsuz etki gelişim mekanizmalarını etkileyip sağlıklı bireylerin oluşmasını engelleyebilir. Bu durum türün neslinin devamı için oldukça önemlidir. Bu nedenle embriyotoksisite çalışmaları ve kimyasallara yönelik etki mekanizmalarının ortaya konulması oldukça önemlidir.

Bu anlamda yapılmış olan bu çalışmanın hem uygulanan cyfluthrin ile ilgili literatürde az sayıda çalışmanın olması, hem de bir model ve aynı zamanda hedef olmayan organizma olan kuş embriyoları ile çalışılması bakımından literatüre önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bundan sonra geliştirilen farklı çalışmalarla birlikte elde edilen bulgular doğrultusunda, kullanılması kaçınılmaz olan pestisitlerin, en güvenilir şekilde, en uygun dozlarda kullanılması tavsiye edilmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahmad K.R., Shehry K., Raees K., Kanwal M.A., Abbas T. and Ullah A., 2018. Adverse Effects of cypermethrin on the Chick (*Galus domesticus*) Development are Reversed by Co-Treatment with Vitamin E and Olive Oil. *Pak. Vet. J.*, 38(1):46-50.
<http://dx.doi.org/10.29261/pakvetj/2018.009>.
- Abdel-Daim M., El-Bialy B., Abdel H.G., Radi M.A., Hefny H.A., Hassan A.M., 2016. Antagonistic Effects of *Spirulina Platensis* Against Sub-Acute Deltamethrin Toxicity in Mice: Biochemical and Histopathological Studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Volume 77: 79-85 p.
- Aktar M.D., Wasim Sengupta D., Chowdhury A., 2009. Impact of Pesticides Use in Agriculture: Their Benefits and Hazards. *Interdis Toxicol* 2(1):1–12.
- Amin K.A. and Hashem K.S., 2012. Deltamethrin-Induced Oxidative Stress and Biochemical Changes in Tissues and Blood of Catfish (*Clarias gariepinus*): Antioxidant Defense and Role of Alpha-Tocopherol. *BMC Veterinary Research*, 8, 45. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-8-45>.
- Andem A.B., Ibor O.R., Joseph A.P., Eyo V.O., Edet A.A., 2016. Toxicological Evaluation and Histopathological Changes of Synthetic Pyrethroid Pesticide (Cypermethrin) Exposed to African Clariid Mud Catfish (*Clarias gariepinus*) Fingerlings. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*. 8(5); 360-367.
- Anonim. Cyfluthrin, 2007. Chemicalwatch Factsheet,
<https://www.beyondpesticides.org/assets/media/documents/pesticides/factsheets/cyfluthrin.pdf>
- Anonim. T.C. Millî Eğitim Bakanlığı, 2012. Çevre Sağlığı, Pestisitler 850ck0054 Ankara.
- Andleeb S., Kalsoom S., Ghazanfar S., Shaukat S. and Hanif S., 2014. Developmental Anomalies Induced by Permethrin in *Gallus Domesticus*. *Punjab Univ. J. Zool.*, Vol. 29 (2): pp.63-67.
- Anwar K., Shakoory A.R., 2010. Cypermethrin Toxicity in the Liver of Developing Chick Embryo. *J. Zool.*, vol. 42(6): pp. 725-733.

- Bhaskar N., Shahani L., Taparia N., Bhatnagar P., 2012. Effect of Deltamethrin Containing Formulation on Developing Chick Embryo: Morphological and Skeletal Changes. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*, 4(4): 81-87.
- Bhaskar N., Shahani L., 2015. Assessment of Biochemical and Histopathological Changes in the Liver of Chick Embryo Treated with a Commercial Deltamethrin Formulation. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 5(3): 63-681.
- Bhaskar N., Shahani L., Bhatnagar P., 2016. Toxicological Implications of a Commercial Formulation of Deltamethrin (Decis®) in Developing Chick Embryo. *Human and Ecological risk Assessment an International Journal*, 22(2): 369-378.
- Bhushan B., SAXENA N. and SAXENA P.N., 2010. Beta-Cyfluthrin Induced Histochemical Alterations in the Liver of the Albino Rat. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 2010 Vol. 37 No. 2.
- Cabral J.R.P., Galendo D., 1990. Carcinogenicity Study of the Pesticide fenvalerate in Mice. *Cancer Lett*, 49: 13-18.
- Cabral J.R.P., Galendo D., Laval M., Lyandral N., 1990. Carcinogenicity Studies with Deltamethrin in Mice and Rats. *Cancer Lett*, 49: 147-152.
- Chandola M., Rathore M., Kumar B., 2011. Indigenous Pest Management Practices Prevalent Along the Hill Farmers of Uttarakhand. *Indian J Tradit Knowl* 10(2):311–315.
- Çalışkan M., 2010. Sentetik Bir İnsektisit Olan Tetrametrinin Albina Fare (*Mus musculus*)'lerin Serum Proteinleri Üzerine Etkileri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 67(2):65-71.
- Cebra-Thomas A.J., 2004. Observation of Living and Photography of Chick Embryos. *Biology 24 Laboratory Handout*. Swarthmore College, PA,
https://www.swarthmore.edu/NatSci/sgilber1/DB_lab/Chick/Chick_web_pages/EBC_hickEmbryos%20Final/EBChickEmbryos_dev.html
- Çelik D., Oğuz H., Demet Ö., Boydak M., Dönmez H.H., Sur E. and Nizamlioğlu F., 2000. Emryotoxicity Assay of Aflatoxin Produced by *Aspergillus parasiticus* Nrrl 2999. *British Poultry Science* 41 (4), 401-409.

- Chowdhury R., Chatteraj S., Bandyopadhyay A., Dey S.R., 2015. Teratogenic and Embryotoxic Effects of Synthetic Pyrethroids on Chick (*Gallus Domesticus*) Embryo. Indian Journal of Biology; Volume 2 Number 1.
- Cox C., 1994. Cyfluthrin. Journal Of Pesticide Reform, Vol.14, No. 2.
- Culling C. F. A., Allison R. T., Barr W. T., 1985. Cellular Pathology Technique (4th Ed.). Butterworth-Heinemann. 650 p.
- Davey M.G., Tickle C., 2007. The Chicken as a Model for Embryonic Development. Cytogenet Genome Res, 117: 231-239.
- Davies WJ. and Freeman SJ., 1995. Chick Embryotoxicity Screening Test (CHEST I and II). In: O'Hare S and Atterwill CK (eds.) Methods in Molecular Biology. In Vitro Toxicity Testing Protocols, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 43, 307-310.
- DB Lab, 2003. Chicken Embryo Development, <http://www.ext.tv.edu/resources/4h/virtualfarm/poultry>.
- Doty M., 2011. "Hamburger-Hamilton Staging Series (1951)". School of Life Sciences. Center for Biology and Society. Embryo Project Encyclopedia. <https://embryo.asu.edu/pages/hamburger-hamilton-staging-series-1951>.
- Etches R., 1996. Reproduction in Poultry. CAB International, Cambridge.
- Fetoui H., Makni M., Garoui E.M. and Zeghal N., 2010. Toxic Effects of Lambda-Cyhalothrin, A Synthetic Pyrethroid Pesticide, On The Rat Kidney: Involvement of Oxidative Stress and Protective Role of Ascorbic Acid. Experimental and Toxicologic Pathology, 62(6), 593-599.
- Fety L., 2004. Developmental Biology, Swarthmore College, Spring, https://www.swarthmore.edu/NatSci/sgilber1/DB_lab/Chick/Chick_web_pages/Lauren_Fety/chick_web.html.
- Gupta SK, Pal AK, Sahu NP, Saharan N, Mandal SC, Chandraprakash Akhtar MS, Prusty AK., 2012. Dietary Microbial Levan Ameliorates Stress and Augments Immunity in *Cyprinus carpio* fry (Linnaeus, 1758) EXPOSED to Sub-Lethal Toxicity of Fipronil. Aquacult Res. Doi:10.1111/are.12030.

- Hamilton H. L., 1952. Lillie's Development of Chick. Henry Holt and Company, New York, 624p.
- Hamburger V., Hamilton H. L., 1992. A Series of Normal Stages in the Development of Chick Embryo. *Developmental Dynamics*, 195: 231-272.
- Hayretdağ S., Kolankaya D., 2008. Investigation of the Effects of Pre-Incubation Formaldehyde Fumigation on the Tracheal Epithelium of Chicken Embryos and Chicks. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 32(4): 263-267.
- Ishmael I., Lilchfield M. H., 1988. Chronic Toxicity and Carcinogenic Evaluation of Permethrin in Rats and Mice. *Fundam Appl Toxicol*, 11: 308-322.
- Jelinek R., 1977. The Chick Embryotoxicity Screening Test (CHEST). In: *Methods in Prenatal Toxicology*, G. Thieme, Stuttgart.
- Jelinek R. and Marhan O., 1994. Validation of Chick Embryotoxicity Screening Test (CHEST). A Comparative Study. *Functional and Developmental Morphology* 4 (4), 317-323.
- Karim A., Ali W., Ahmad N., Irfan M., Shakir H. A., 2016. Histological and Biochemical Study of Liver of Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) After Acute Exposure to Pyrethoride (Deltamethrin). *Punjab Univ. J. Zool.*, Vol. 31 (2), pp. 229-236.
- Kucera P. and Burnand M.B., 1987. Routine Teratogenicity Test That Uses Chick Embryos *In Vitro*. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 7, 427-447.
- Naveed A., Naveed K. Asmatullah, 2012. Exposure to β -Cyfluthrin During Pregnancy Induces Teratogenecity in Murine Foetuses. *Pakistan J. Zool.*, vol. 44(6), pp. 1515-1519.
- Omotuyi I. O., Oluyemi K. A., Omofoma C. O., Josiah S. J., Adesanya O.A, Saalu L. C., 2006. Cyfluthrin-Induced Hepatotoxicity in Rats. *African Journal of Biotechnology*, 5: pp. 1909-1912.
- Oularbi H.K., 2014. Biochemical and Histopathological Changes in The Kidney and Adrenal Gland of Rats Following Repeated Exposure to Lambda-Cyhalothrin. *Journal of Xenobiotics*. Volume 4:2240.
- Özcan M., 1992. Hidrokinon'un Gelisim Toksisitesinin Döllenmis Tavuk Embriyosunda

- Analiz ve Değerlendirilmesi. G. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.Türkiye.
- Öznurlu Y., 2003. Yumurtaya Verilen Aflatoksin B1'in, Etçi Piliçlerin Kemik Dokularının Embriyonik Gelişimi Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi. S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya. Türkiye.
- Öznurlu M., 2016. Erken Dönemde Yumurtaya Enjekte Edilen Flunixin Meglumin'in Embriyotoksik ve Teratojenik Etkilerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi, Türkiye.
- Özparlak H., 2006. Yumurtaya Verilen Organik İnsektisit Fipronil'in Tavukların Embriyonik ve Kuluçka Sonu Erken Dönem Gelişim Üzerindeki Zararlı Etkilerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi. Selçuk Üniversitesi. Türkiye.
- Patten B. M., 1971. Early Embryology of the Chick. McGraw-Hill Book Company.s.284. Toronto.
- Prelusky D.B., Hamilton R.M.G., Foster B.C., Trenholm H.L. and Thompson B.K., 1987. Optimization of Chick Embryotoxicity Bioassay for Testing Toxicity Potential of Fungal Metabolites. *Journal-Association of Official Analytical Chemists* 70 (6), 1049-1055.
- Ritchisong G., 2017. BIO 554/754, Ornithology.
<http://people.eku.edu/ritchisong/ornitholsyl.htm>
- Romanoff A. L., 1960. The Avian Embryo. The Macmillan Company, New York, 1304p.
- Romanoff A.L., 1997. Life in Twenty-one Days. Extension Bulletin, 205.
<http://www.msstate.edu/dept/poultry/avianemb.htm>
- Rajawat N.K., Soni I., Mathur P., 2015. Hepatotoxicity of Cyfluthrin After Acute Exposure in Swiss Albino Mice. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, pp. 128-134.
- Rosenbruch M., 1994. Early Stages of the Incubated Chicken Egg as a Model in Experimental Biology and Medicine. *Altex* 11 (4), 199-206.
- Rosenbruch M., 1997. The Sensitivity of Chicken Embryos in Incubated Eggs. *Altex* 14

(2), 111-113.

Sánchez-Bayo F. (2006). Comparative Acute Toxicity of Organic Pollutants and Reference Values for Crustaceans. I. Branchiopoda, Copepoda and Ostracoda. *Environmental Pollution* 139(3):385-420.

Sharma P., Huq A.U. and Singh R., 2014. Cypermethrin-induced reproductive toxicity in the rat is prevented by resveratrol. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases* 4(2):104.

Smith T. W., 1997. Avian Reproductive System. <http://www.msstate.edu/dept/poultry/avianemb.htm>

Songur S. H., Kolankaya D., 2001. Effects of Pentachloronitrobenzene on Somite Development and Fibronectin Distribution in Chick Embryos. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 16: 27-34.

Sur E., 2001. Yumurtaya Verilen Aflatoksin B1 (AFB1)'in Tavukların Lenfoid Organlarının Embriyonal Gelişimi Üzerindeki Etkilerinin Enzim Histokimyasal Yöntemlerle araştırılması. *S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, Konya.

Sepici-Dinçel A1, Çağlan Karasu Benli A, Selvi M, Sarıkaya R, Sahin D, Ayhan Ozkul I, Erkoç F. 2009. Sublethal Cyfluthrin Toxicity to Carp (*Cyprinus carpio* L.) Fingerlings: Biochemical, Hematological, Histopathological Alterations. *Ecotoxicol Environ Saf.* 72(5):1433-9.

Syed F., Soni I., John PJ., Bhatnagar P., 2010. Evaluation of Teratogenic Potential of Cyfluthrin, A Synthetic Pyrethroid in Swiss Albino Mice. *Toxicology and Industrial Health*, 26: 105–111.

Türkoğlu M., Sarıca M., 2004. Tavukçuluk Bilimi, Bey Ofset, s.336. Ankara.

Uggini G.K., Patel P.V., Balakrishnan S., 2012. Embryotoxic and Teratogenic Effects of Pesticides in Chick Embryos: A Comparative Study Using Two Commercial Formulations. *Environmental Toxicology*, 27(3):166-74.

Vesely D and Vesela D., 1991. The Use of Chick Embryo for Prediction of Some Embryotoxic Effects of Mycotoxins in Mammals. *Veterinarni Medicina Praha* 36 (3), 175-181.

- Whalen J.E., 1987. Memorandum to LaRocca, G. Review of Acute Toxicity Data in Support of the Registration of Tempotm Wettable Powder for Use in Food Handling Establishments. OPP, EPA.
- Yalçinkaya M. ve Yerli S.V., 2013. Fluvalinate'ın Lebistes Balıkları (*Poecilia reticulata*) Üzerine Akut Etkisinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara. Türkiye.
- Yang Y., Ma H., Zhou j., Liu J., Liu W., 2014. Joint Toxicity of Permethrin and Cypermethrin at Sublethal Concentrations to the Embryo-Larval Zebrafish. *Chemosphere*. Volume 96; 146-154.
- Yavuz H., Hazıroğlu R., Daşkın A., Filazi A., Sekkin S., Kul O., 1996. Tavşanlarda Siflutrin'in Teratojenik Etkilerinin Araştırılması. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 43: 421-42.
- Yılmaz M.B., Rencuzogullari E., Canli M., 2014. The Effects of Cyfluthrin on Some Biomarkers in the Liver and Kidney of Wistar Rats. *Send to Environ Sci Pollut Res Int.* 22(6):4747-52.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Damla PİRİK

Doğum Yeri: SİLİVRİ

Doğum Tarihi: 01.01.1991

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat
Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen
Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Hayretdağ S., Erkmen B., Pirik D., Tascı E., *Paracentrotus lividus* Sperm ve
Embriyolarına İmidaclopritin Etkisi, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir,
Türkiye, 23-27 Haziran 2014, ss.15-15.

Hayretdağ S., Erkmen B., Tascı E., Pirik D., Erkoç F., Formaldehit ve Malahit Yeşilinin
Deniz Kestaneleri (*Paracentrotus lividus*) Sperm ve Embriyoları Üzerine Yoksik
etkileri, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, Türkiye, 23-27 Haziran 2014,
ss.13-13.

Pirik D., Hayretdağ S., Cyfluthrin'in Cıvcıv Embriyosu Gelişimi Üzerine Etkisi,
Lisansüstü Öğrenci Kongresi, Trakya Üniversitesi, Trakya Üniversitesiteler Birliği,
15-16 Mayıs 2017.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: Koçak Farma-Biyoteknoloji Bölümü-Araştırmacı / Başlangıç:
03.04.2017- Çalışıyor

İLETİŞİM

E-posta Adresi: damlapirik@gmail.com

