

40366

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ZEBRABALIĞI'NIN (BRACHYDANIO
RERIO) EMBRYOLOJİK GELİŞİMİ
ÜZERİNE KADMIYUM KLORÜR VE
ÇİNKO KLORÜR GİBİ ÇEVRE
KİRLETİCİLERİNİN ETKİLERİ**

TEZ YÖNETİCİSİ
Prof.Dr.Tuncay ÖZGÜNEN

Biyolog Melek KÜÇÜKOĞLU

40366

MASTER TEZİ

ADANA-1996

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

KABUL VE ONAY SAYFASI

Ç.Ü.SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Melek KÜÇÜKOĞLU'nun MASTER tezi olarak hazırladığı "Zebrabalığı'nın (*Brachydanio rerio*) Embryolojik Gelişimi Üzerine Kadmiyum Klorür ve Çinko Klorür Gibi Çevre Kirleticilerinin Etkileri" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Gereğini arz ederiz.

26.1.1996

Başkan: Prof.Dr. Tuncay ÖZGÜNEN

Üye : Prof.Dr. Ayşe DOĞAN

Üye : Doç.Dr. Gülay LOĞOĞLU

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 28.1.1996 gün ve 6/38-17 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Gülay LOĞOĞLU

Teşekkür

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Bana yüksek lisans yapma olanağı sağlayan ve tez konumun seçilmesinde yardımcı olan değerli hocam ve tez danışmanım Prof.Dr.Tuncay ÖZGÜNEN'e ve tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen sayın Prof.Dr.Yan SHAOYI'ye, istatistiklerimde yardımlarını esirgemeyen sayın Yrd.Doç.Dr.Seçil BİNOKAY'a, emeği geçen tüm hoca ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

✧ TEŞEKKÜR	1
✧ ŞEKİL VE TABLO LİSTESİ	IV
✧ KISALTMALAR	V
✧ ÖZ	VI
✧ ABSTRACT	VII
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
1. Çevre Kirliliği ve Çevre Kirliliğinin Kontrolü İçin Teratojenisite Testleri	2
1.1 Çevre Kirliliğinin Sonuçları	2
1.2 Su Kirliliği	2
1.3 Su Kirliliğinin Kontrolünde Teratojenisite Testleri	3
2. Toksik Maddeler	5
2.1 Kadmiyum	7
2.2 Çinko	9
3. Zebrabalığı (<i>Brachydanio rerio</i>)	11
3.1 Zebrabalığı'nın Sistematiği	11
3.2 Zebrabalığı'nın Genel Özellikleri	11
3.3 Zebrabalığı'nda Üreme	12
3.3.1 Testisler	13
3.3.2 Ovaryumlar	14
4. Kemikli Balıklarda Yumurta Morfolojisi	14
4.1 Döllenme	16
5. Zebrabalığı'nın Gelişimi ve Hayat Siklusu	16
6. Zebrabalığı'nda Çevresel Ajanlarla Görülebilecek Teratojenik Etkiler	23
GEREÇ ve YÖNTEM	25
1. Zebrabalığı'nın Temini, Bakımı ve Çiftleştirme Akvaryumlarının Hazırlanması	25

2. Yumurta Alınacak Balıkların Seçilmesi, Akvaryumlara Yerleştirilmesi ve	
Yumurtaların Toplanması	25
3. Kullanılan Su ve Kimyasal Solüsyonların Hazırlanması	26
3.1 Holtfreter Solüsyonunun Hazırlanması	26
3.2 Kadmiyum Klorür ve Çinko Klorür Solüsyonlarının Hazırlanması	27
4. Yumurtaların Kadmiyum Klorür ve Çinko Klorür Solüsyonları ile	
Temas Ettirilmesi	27
5. Gözlemlerin Yapılması ve Verilerin Toplanması	28
6. İstatistik	28
BULGULAR	29
1. Sınır Belirleyici Test Sonuçları	29
1.1 Çinko Klorürle Yapılan Sınır Belirleyici Test Sonuçları	29
1.2 Kadmiyum Klorürle Yapılan Sınır Belirleyici Test Sonuçları	30
2. Ana Test Sonuçları	31
2.1 Çinko Klorürle Yapılan Ana Test Sonuçları	31
2.2 Kadmiyum Klorürle Yapılan Ana Test Sonuçları	35
2.3 Çinko Klorür ve Kadmiyum Klorürün Beraber Bulunduğu Solüsyonlarla	
Yapılan Test Sonuçları	40
TARTIŞMA ve SONUÇ	42
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	54

TABLO VE ŞEKİLLER

Tablo I.....	9
Tablo II.....	9
Tablo III.....	31
Tablo IV.....	34
Tablo V.....	35
Tablo VI.....	37
Tablo VII.....	40
Tablo VIII.....	41
Şekil 1.....	12
Şekil 2.....	15
Şekil 3.....	20-21
Şekil 4.....	32
Şekil 5.....	33
Şekil 6.....	36
Şekil 7.....	38
Şekil 8.....	39
Şekil 9.....	44
Şekil 10.....	44

KISALTMALAR

AP (AK) : Animal kutup

Cg : Kortikal granül

EIFAC : European Inland Fishery Advisory Commission

FETAX : Frog Embryo Teratogenesis Assay: Xenopus

GAG : Gulikozominoglikan

LC₅₀ : %50 letaliteye neden olan konsantrasyon

PV : Perivitellin aralık

VP (VK) : Vejetatif kutup



ÖZ

Bu çalışmada Zebrabalığı'nın blastula safhasındaki embryoları statik yenileme işlemi kullanılarak çinko klorür ve kadmiyum klorürün değişik konsantrasyonlarıyla 15 gün süreyle temas ettirilmiştir. Her iki maddenin çok yüksek konsantrasyonlarda gastrulasyonu inhibe ettiği, düşük konsantrasyonlarda ise; ödem, vertebra defekti ve hemoraji gibi anomaliler oluşturduğu gözlenmiştir. LC_{50} değeri (probit analizi kullanılarak) çinko klorür için 1.36 mg/L, kadmiyum klorür için 0.36 mg/L olarak hesaplanmıştır. Çinko klorürün kadmiyum klorürden yaklaşık iki üç kat daha yüksek konsantrasyonlarda benzer etkiler göstermesi, çinko klorürün kadmiyum klorüre göre daha az toksik olduğunu düşündürmektedir. Ancak koryondan çıkış yönünden tamamen farklı bir durum olduğu (çinko klorürün koryondan çıkış zamanı üzerine kadmiyum klorüre göre daha etkili olduğu) gözlenmiştir.

Genel olarak kadmiyumun tüm canlılarda muhtemel toksik ve karsinogenik etkilerinin çinko tarafından azaltıldığı bilinmektedir. Ancak çalışmamızda kadmiyum klorürün 0.5 mg/L konsantrasyonunda görülen toksik etkilerinin, değişik konsantrasyonlarda çinko klorürün kadmiyum klorürle beraber kullanılmasına rağmen değişmediği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Brachydanio rerio*, Embryo-larva, Toksisite, Çinko, Kadmiyum.

ABSTRACT

The Effects of Environmental Pollutants Such as Cadmium Chloride and Zinc Chloride, on the Embryological Development of the Zebrafish

In this study, Zebrafish embryos in the blastula stage were exposed to various concentrations of zinc chloride and cadmium chloride for 15 days, by applying static renewal procedure. It was observed that both of the chemicals inhibited gastrulation in very high concentrations, and led to edema, vertebra defects and hemorrhage in low concentrations. The LC_{50} values were determined to be (by using the probit analysis) 1.36 mg/L for zinc chloride, and 0.36 mg/L for cadmium chloride. Zinc chloride in nearly two or three fold higher concentrations than those of cadmium chloride caused similar effects, and this finding led to the conclusion that zinc chloride is less toxic when compared with cadmium chloride. However, zinc chloride was found to be more effective on the hatching time.

In general, zinc is known to decrease the probable toxic and carcinogenic effects of cadmium in all species. However, when various concentrations of zinc chloride were applied together with 0.5 mg/L of cadmium chloride, the toxic effects of cadmium chloride in this concentration were observed not to change in the present study.

Keywords: *Brachydanio rerio*, Embryo-larval, Toxicity, Zinc, Cadmium.

GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda günden güne artan insan nüfusu ve gelişmekte olan ülkelerle gelişmiş ülkelerde endüstrinin hızlı gelişimi nedeniyle, daha çok ve daha iyi yiyecek maddeleri eldesindeki talepler gibi çevre kirliliği nedenleri sadece acil devlet sorunu olmayıp aynı zamanda tüm dünyada teknik ve bilimsel topluluklarda acil araştırma konuları haline gelmiştir (39).

İnsanların tüketeceği ürünlerin ve yiyecek mamüllerinde kullanılan pestisitlerin güvenlik kontrollerinde, bir veya daha fazla uygun memeli türleri üzerinde teratojenisite için testlerin yapılması genel bir kural haline gelmiştir. Ancak ekonomik sıkıntılar ve diğer nedenlerden dolayı, genel çevre kirleticilerinin önemli bir kısmı için memeli teratojenisite testlerinin uygulanması zorunluluğu getirilememektedir. Bu tür testler uygulanabilse bile sonuçların gerçek çevre koşullarına uyarlanması, transport sırasındaki çevre değişiklikleri ve toksik maddelerin birbirleriyle ilişkisi teratojenisite potansiyelini değiştirmektedir. Bu nedenle genel çevre kirleticilerinin teratojenik potansiyelinin daha basit modellerde çalışılması gerekmektedir (5).

Bu amaç için Hidra, Daphnia, Planarya (36), Xenopus (11) ve kurbağa embriolarıyla (13) değişik modeller kullanılmıştır. Bazı teleost embrioları da bu amaç için kullanılmıştır (6,30).

Çalışmamızın amacı, kadmiyum klorür ve çinko klorürün teleostlardan Zebrabalığı'nın embriolojik gelişimi üzerine olan etkilerini araştırmak olup, bu çalışma çevre kirleticilerinin teratojenik potansiyelini araştırmak için bir model olarak kullanılabilir.

GENEL BİLGİLER

1. Çevre Kirliliği ve Çevre Kirliliğinin Kontrolü İçin Teratojenisite Testleri

1.1 Çevre Kirliliğinin Sonuçları

Son yıllarda günden güne artan insan nüfusu ve gelişmekte olan ülkelerde endüstrinin hızlı gelişimi nedeniyle, daha çok ve daha iyi yiyecek maddeleri eldesindeki talepler gibi çevre kirliliği nedenleri sadece acil devlet sorunu olmayıp aynı zamanda tüm dünyada özellikle fakir ve gelişmekte olan ülkelerde teknik ve bilimsel topluluklarda acil araştırma konuları haline gelmiştir (39).

Yapılan araştırmalara göre gelişmekte olan ülkeler çok daha fazla tehlikeyle yüzyüzedir. Gelişmekte olan ülkelerde her yıl 10.000.000 çocuk içme suyunun kontaminasyonundan dolayı ölüyor, çok daha fazla insan yetersiz beslenme ve açlıktan ölmektedir (39). Amerika'daki yıllık raporlara göre doğum defektleri tüm canlı doğumların % 7'sini bulmaktadır. Ayrıca defektli fetal gelişimden dolayı 1,5 milyon bebek ölümü, ölü doğum ve spontan düşük bildirilmektedir (5).

Biyolojik çeşitlilikteki büyük kayıplardan ve doğal ekosistemin ciddi şekilde tahrip edilmesinden dolayı her yıl 20.000 kadar canlı organizma türünün nesli tükenmektedir (39).

Açıkça, insan nüfusundaki artışı kontrol, çevre kirlenmesini azaltmak, insan ve diğer türler için daha iyi yiyecek maddeleri sağlamak, insanca bir yaklaşım için acil hedefler olmalıdır. Birçok ülkede bilimadamları tüm dikkatlerini bu konulara yöneltmiş durumdadır (39).

1.2 Su Kirliliği

Su insan dahil tüm canlılar için esensiyeldir. İnsan için günlük kullanımda içme, yemek pişirme, çamaşır bulaşık yıkamak için kullanılmaktadır (49).

Ne yazık ki günümüzde su kaynakları endüstrinin hızlı gelişimi ve bunların kirli atıklarının etkili bir kontrol olmaksızın atılmasından dolayı, bir çok bölgede az veya çok kontamine olmaktadır (39).

Kirlenmiş suyla bulaşan enfeksiyonlar sağlığı ve yaşamı yüksek oranda tehdit etmektedir. Dünya nüfusunun hemen hemen yarısı, özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki fakir insanlar kirli sularla bulaşan hastalıklara yakalanmaktadır. Her yıl 2 milyar kadar insan su ve gıda nedeniyle

diyareye yakalanmakta ve her yıl 4 milyon çocuğun ölümünün ana nedeni diyare olmaktadır. Suyla bulaşan parazit hastalıkları da çok fazla görülmektedir. Her yıl yaklaşık 267 milyon insan malaryaya, 30-60 milyon insan hummaya, 90 milyon insan fil hastalığına yakalanmaktadır (49).

Teknolojinin gelişmesi sonucu, endüstri ve sanayi atıkları ile kentsel atıkların bulunduğu kanalizasyon sularının boşaltıldığı nehir ve göller kirlenmekte, akuvatik ortamda yaşayan canlı organizmalar da tehdit altına girmektedir (37).

Özellikle atık sulardaki eser elementler, bu suların sulamada kullanılması ve deşarj edildiği ortamda yaşayan canlılar açısından, dolayısıyla besin zincirine girişi nedeniyle halk sağlığı yönünden önem taşımaktadır. Daha önemlisi toksik organik atıkların, metallerle birleşerek veya başka bileşiklere dönüşerek daha toksik hale geçmeleri büyük sorunlar yaratmaktadır. Akuvatik ortamda yaşayan canlı organizmalar, besin zinciri içerisinde bünyelerinde biriken ağır metalleri birbirlerine taşıyabilirler. Ortamda hiçbir şekilde yok olmayan ağır metaller, çeşitli yollarla insanlara da ulaşabilmekte ve insan sağlığını tehdit edip, bazen tehlikeli boyutlara ulaşabilmektedir. Canlılarda eksikliği çeşitli semptomatik bozukluklara yolaçan, fakat belirli sınırların üzerinde olduğunda da toksik etki yapıp organizmayı bozan bu ağır metallerden mineral olarak bilinen ve organizmada birçok biyokimyasal reaksiyonlar için fonksiyonel rol oynayan Ca, Mg, Na, K, Mn, Cu, Zn, Fe, Mo, Co ve Se ile endüstri atıkları sonucu ortama giren ve canlı organizmada kuvvetli toksik etkiye sahip Cd, Ni, Hg ve Pb gibi ağır metaller, su ortamında belirli limitlerin dışına çıktığında toksik etki yapıp organizmanın canlılığına son veren metallerdir (37).

Ağır metallerle veya diğer kimyasallarla kirlenmiş suya maruz kalma nedeniyle meydana gelen öldürücü ve zararlı etkilerini, suyla bulaşan paraziter ve bakteriyolojik hastalıkların enfeksiyon kaynağını kontrol etmek için acil tedbirler alınması gerekmektedir (39).

1.3 Su Kirliliğinin Kontrolünde Teratojenisite Testleri

Su kirliliğinin kontrolünde ilk adım su kirliliğini gözlemek için etkili yollar bulmaktır. Bu amaç için kullanılan çok sayıda etkili ve profesyonel gözlem metodları vardır. Ancak daha basit, ucuz maliyetli ve kısa süreli olanlara hala ihtiyaç vardır. Bunlar arasında biyolojik indikatör modelleri için araştırma yapmak (akut ve direk test) çok cazip görünmektedir (39).

Kimyasal olarak kirlenmiş bir su habitatında yaşayan organizmalarda en çok gözlenen ve iyi bilinen etkiler çeşitli anormallikler ve teratojenik etkilerdir. Kirleticiler canlı organizmaların yaşamlarının çok erken dönemlerinde özellikle döllemeden hemen sonraki dönemlerinde anormal gelişmelere neden olacaktır. Bu anormallikler belkide larva döneminde ve erişkin döneminde bu organizmaların ölümüne neden olacaktır (39).

Bu yüzden su kirliliğini önlemek için biyoindikatör olarak akuvatik hayvanların veya akuvatik bitkilerin kullanılması tehlikeli faktörlerle canlı organizmalara verilebilecek direk zararlı etkiler hakkında tam bir fikir vermesi bakımından çok faydalı olacaktır. Bu aşamadan sonra bu tehlikeli çevre koşullarından korunmak için bir yol bulabilmek mümkün olabilecektir (39).

Teratojenisite testi olarak in vitro sistemlerin kullanılmasına olan ilgi gelişmekte olan organizmaya in vitro sistemlerin uygulanması konusunda deneyimli olan araştırmacıları biraraya getiren in vitro teratojenisite testleri hakkında Uluslararası Konferansın toplandığı 1975 yılından beri gündemdedir. Bu konferansta in vitro teratojenitesite testlerinde aranan özellikler özetlenmiştir. Araştırmacıların bazıları teratojenisite taramalarında kullanılabilecek sistemler kurmaya başlamıştır (25,39).

Bu amaç için Hidra, Daphnia, Planarya (36), Xenopus (11) ve kurbağa embryoları (13) gibi akuvatik organizmalar kullanılmıştır. Birkaç çeşit teleost embryoları da test materyali olarak kullanılmıştır (6,30).

Memeli teratojenisite testleri karmaşık dölleme işlemi, test protokolü, eğitimli personel gereksinimi ve fiyat açısından pratik değildir (38).

Yapılan ilk çalışmalara göre akuvatik organizmaların erken gelişim evreleri, çevresel faktörler tarafından oluşturulan etkileri araştırmada indikatör olarak kullanma konusunda erginlere göre çok daha hasastır. Bu yüzden su kirliliğinin teratojenik etkilerini gözlemek için yaşayan bir indikatör modeli olarak canlı organizmaların larva veya erken embryolarını kullanmak pratik ve faydalı gibi görülmektedir (39).

Her yıl üretilip piyasaya verilen kimyasal maddelerin çok büyük sayıda olması ve bunların insan sağlığı açısından bir risk oluşturmasından ötürü FETAX ve kısa dönemli balık embryo-larva testi gibi kısa süreli in vitro teratojenisite testlerinin kurulması büyük önem kazanmıştır. Metabolik kapasiteleri olmaksızın bu gibi testlerin insanda gelişme toksisitesine sahip maddelerin başarılı şekilde taranmasında işe yararlılıkları oldukça kuşkuludur. Testlerde

gözden kaçan proteratojenik maddeler insanda metabolizma sonucu teratojenik forma dönüşüp doğum kusurlarına neden olabilir. Proteratojenik maddelerin biyotransformasyonları in vitro test sistemlerinin birçoğunda bilinen bir açık nokta ise de uygun teratojeniz tarama testlerinde fazla da büyütülmemektedir (17).

Potansiyel su kirliliğine neden olan maddelerin tehlikeli toksik etkilerine ait çeşitli bilgilere olan artmış ihtiyaç, uluslararası kabul edilebilecek "standart" bir hayvan modeli ihtiyacını gündeme getirmiştir. Zebrabalığı (*Brachydanio rerio*) bu amaç için uygun bir aday olarak görülmektedir. Bu tür kolaylıkla elde edilebilir, laboratuvarında akvaryum içinde beslenebilir ve direk toksikan olan teratojenlere ve mutajenlere geniş oranda cevap verebilir (29).

Toksikolojik araştırmalarda kısa dönemli balık embryo ve larva testi daha önce rapor edilmiştir (6). Bu amaçla *Lepomis macrochirus* (mavi solungaçlı güneş balığı), *Ictalurus punctatus* (kedi balığı), *Cyprinus caprio* (sazan), *Carassius auratus* (altın balık), *Salmo gairdneri* (gökkuşağı alabalığı) materyal olarak kullanılmıştır. Bunların çoğu oldukça büyük ve yenilebilir balıklar olup, üremelerinin kontrolü oldukça karmaşıktır. Yılda bir veya iki kez yumurtlayıp büyük önemli bir altyapı ve insan gücü gerektirmektedir (39).

2. Toksik Maddeler

Toksik maddeler, suda düşük konsantrasyonlarda bulunmaları halinde bile insan sağlığına zarar vererek hastalıklara ve hatta ölüme neden olabilirler. Eser miktarlarda bile zararlı olabilen bu maddeler arasında en önemli grubu "ağır metaller" oluşturur (44).

Sb, Ag, As, Be, Cd, Cr, Pb, Mn, Hg, Ni, Se, V, Zn gibi elementlerin bazıları periyodik tabloda ne ağır metal, hatta ne de metal grubuna dahildir. Bununla beraber çoğunluğu ağır metal olan bu toksik "iz elementlerin" tümü uygulamacılar tarafından ağır metal olarak sınıflandırılmıştır (44).

Ağır metaller zorunlu biyolojik sistemler üzerine etkili olduğu anlaşılan yaygın çevre kirleticileri haline gelmiştir. Buna rağmen ağır metallerin hangi mekanizmayla toksik etkiler meydana getirdiği kesinlik kazanmamış olup, bu konudaki genel düşünce, hidrojen sülfür ve nitrojen grupları gibi esansiyel ligantlara olan affinitelerinden dolayı ağır metallerin toksik olduğudur. Çünkü bu metallerin bazılarının ekstraksiyonu için gerekli olan biyolojik mekanizmalar yoktur ve birikimleri söz konusudur (15).

Sudaki toksik iz maddeler canlı bünyesinde birikebilir ve besin zincirine girerek her ileri beslenme kademesinde daha yüksek derişime ulaşabilirler. Bu nedenle bir su kütlesinde zararsız gibi görülebilen derişimler o suda yaşayan ve ekonomik değeri taşıyan ürünlerin bünyesinde zehirlilik düzeyi, insan tüketimini engelleyecek kadar yüksek değerlere ulaşabilir(44).

Toksik maddelerin bir kısmı doğa kökenli olup, bunlar yeraltı sularına karıştıktan sonra er veya geç yüzeysel sulara da ulaşır. Bu maddelerin yapay yollardan yüzeysel sulara karışması da mümkündür. Bu açıdan en önemli kaynaklar, tarımsal etkinlikler ve endüstri sularıdır. Çeşitli üretim süreçlerinde kullanılan toksik maddeler bu endüstrilerin atık sularıyla birlikte yüzeysel sulara deşarj edilmektedir. Genellikle bu tür kullanılmış suların arıtılması oldukça karmaşık ve pahalı yöntemleri gerekli kıldığından, yüzeysel suların bu tür maddelerden korunması için alınabilecek en etkili önlem, kaynaktan, yani üretim süreci içinde toksik maddelerin kontrolü olmaktadır. Üretim sırasında toksik maddeler yerine daha az zararlı kimyasal bileşiklerin kullanılması, toksik madde içeren suların endüstri içinde geri devredilerek kapalı sistem uygulaması kaynaktaki kontrollere verilebilecek örneklerdir (44).

Sulardaki iz halde bulunan organik ve anorganik zehirlilik unsurlarının belirlenebilmesi ve etkinliklerinin saptanabilmesi için çok duyarlı numune alma, deriştirme ve analizleme tekniklerinin gelişmesi gerekmiştir. Bu nedenle son yıllarda araştırmaların büyük bir bölümü bu konuya ayrılmakta, gelişen teknolojinin olanakları kullanılarak bu maddeler yeni yeni belirlenebilmektedir. Yine de bu maddelerin sudaki diğer bileşenlerle ve birbirleriyle ortaklaşa yarattıkları (sinerjistik) etkiler tek başlarına neden olduklarından çok farklı olduğundan, sudaki zehirlilik unsurlarının karşılıklı derişim ve etkilerinin saptanması açısından pek çok varyant araştırılmaya muhtaçtır (44).

Havada, suda veya toprakta kalıcı özellik gösteren ve ekolojik dengeyi bozan kimyasal maddeler "tehlikeli ve zararlı maddeler" olarak tanımlanmaktadır. Bu maddelerin alıcı su ortamları için tehlike yaratma durumu, yerel koşullara, maddenin miktarına ve özelliklerine bağlıdır. Herhangi bir maddenin su alıcı ortamdaki ve beslenme zincirindeki canlı yaşam için tehlikeli olup olmadığına,

- a) memeli hayvanlar için akut ve oral toksisite
- b) bakteriler için akut toksisite
- c) balıklar için akut toksisite

d) biyolojik ayrışabilirlik testlerinden sonra karar verilebilmektedir (44).

2.1 Kadmiyum (Cd)

Kadmiyum elementinin atom numarası 48 olup, relatif atom ağırlığı 112,41 'dir. Elementlerin periyodik tablosunda II B grubundadır (9).

Çinko filizlerinde bulunan kadmiyum, çinko indirgenme olayının yan ürünü olarak elde edilir. Çinko filizleri önce karışık oksitler elde etmek üzere kavrulur sonra karbonla indirgenerek çinko ve kadmiyum metalleri karışımı elde edilir. Kadmiyum ve çinko damıtmayla ayrılır (9).

Kadmiyumun doğal yollarla atmosfere katılması volkanik patlamalar, orman yangınları, fosil yakıt kullanan işletmeler ve rüzgarla gelen tozdur. Sudaki kadmiyumun kaynakları ise kontamine olmuş ziraat alanları, madenlerden çıkan sular ve kadmiyumun endüstride kullanımıdır (45). Kadmiyum, otomotiv ve metal endüstrisi atık sularında incelenmesi gereken kirlilik parametrelerindendir (41).

Kadmiyum kısa süreli uygulamalarda çok toksik değildir ve birçok tür için 96 saatlik LC_{50} değeri 1.0 mg/L kadmiyumun üzerinde görülmeye başlar. Kadmiyumun vücutta dağılımı kan ile olur ve büyük bölümü karaciğer ve böbrekte depo edilir. Plasenta kadmiyum alımına karşı etkin bir bariyer görevi görür ve yeni doğan bebeğin vücudunda hemen hemen hiç yoktur (45). Ancak yüksek konsantrasyonlarda radyoaktif kadmiyum elementi verilen gebe fare, sıçan ve hamsterlerde kadmiyumun plasentayı geçerek fötusa ulaştığı bulunmuştur (49).

Kadmiyumun teratojenik etkileri bir çok in vivo ve in vitro çalışmalarda tarif edilmiştir (34,50,52). Kadmiyumun indüklediği malformasyonlar geniş bir spektrumda nöral tüp, ekstremiteler, kraniyofasiyal ve iskelet defektlerini içeren anormallikleri ihtiva eder (46).

Yüksek dozlarda kadmiyum inhalasyonu lethal pulmoner ödeme yol açarken, yüksek dozdaki enjeksiyonlarda testislerde ve ovaryumlarda nekroza, karaciğerde ve küçük damarlarda harabiyete yol açar. Yüksek oral dozlar mide ve barsak mukozasında harabiyete yol açar (48).

Birçok laboratuvar memelisinde gebeliğin geç dönemlerinde yüksek dozlarda kadmiyum tuzları kullanılan çalışmalarda plasental harabiyet (hemoraji) ve fetal ölüm, teratojenik etki olarak gebeliğin erken dönemlerinde kadmiyum tuzları kullanıldığında; yarı dudak, yarı damak, eksensefali, hidrocefali, mikroftalmiya, displastik kuyruk gibi etkiler gözlenmiştir (48).

Genel olarak kadmiyumun tüm canlılarda muhtemel toksik ve karsinojenik etkilerinin çinko tarafından azaltıldığı bilinmektedir (16,20,34,35,53). Örneğin; sıçanlarda kadmiyumla indüklenmiş testiküler nekrozun baskılanması (20), sıçanlarda yüksek renal kadmiyum oranıyla ilgili olan arteriyal hipertansiyonun çinko bağlanmasıyla geri çevrilebilmesi (16), embr yonal karsinoma hücre proliferasyonu ve differansiyasyonunun kadmiyum klorür ile inhibe edildiği ve bu inhibisyonun ilave çinko klorür ile etkisiz hale getirildiği gösterilmiştir (34). Farelerde böbrek kortikal hücrelerinde kadmiyum ve bakırla yapılan çalışmalarda Na(+)-glükoz kotransportundaki değişiklikler incelenmiş ve kadmiyumun yüksek dozlarda Na(+)-glükoz kotransportunu bozduğu, çinkoyla yapılan ön muamelenin bu bozulma üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (7).

Bu koruyucu etkinin mekanizması açık değildir, ancak en azından iki olasılık düşünülebilir. Bunlardan biri toksik olmayan seviyelerde çinkonun artışı ile indüklenen metallothionein seviyesindeki artıştır (20). Metallothioneinler sülfürden zengin 7000 dalton ağırlığında polipeptitlerdir (21). Ayrıca ağır metal detoksifikasyonunda işe karışan metal bağlayan proteinler olduğu ileri sürülmektedir. Özellikle Hg, Cu, Zn veya Cd'un dışardan verilmesi karaciğer ve böbrekte metallothionein-I geninden transkripsiyon oranı artırır (15). Diğer mekanizma bu iki metal tarafından paylaşılan ortak bir transport mekanizması olup kadmiyum ve çinko arasında hücreye giriş bakımından bir yarışma söz konusudur. Çinko varlığı nedeniyle kadmiyumun hücre içine girişinde bir azalma görülür (20).

Kadmiyum aynı zamanda Ca^{2+} kanal blokeridir (26). Kalsiyum iyonu hücre adezyonu ve hücre iskeletinin idamesi için hayati öneme sahiptir ve hücrelerin kompakt hale gelmeleri için gereklidir. Kalsiyum ve kadmiyum iyonları arasındaki benzerlik nedeniyle kadmiyum, kalsiyumla yarışmalı bir bağlanma gösterebilir ve kalsiyum da, çinko iyonlarının kadmiyumla muamele edilmiş embryolar üzerindeki koruyucu etkisine benzer bir koruyucu etkiye sahip olabilir (52).

Kadmiyum insan yiyeceklerinde bulunan yaygın bir kontaminanttır ve ağır metal zehirlenmeleri için daimi bir risk teşkil etmektedir. Düşük yoğunluklarda bile kandan resorpsiyonu vücudun kadmiyum yüküne esas olarak katkıda bulunur. Kadmiyum bir kere absorbe edildi mi hemen hemen kaybı söz konusu değildir (21).

Gastrointestinal sistemden absorpsiyonu fizyolojik şartlardan ve özellikle yiyecek çeşitlerinden etkilenir. Kadmiyum normal olarak yiyeceklerde inorganik bir tuz olarak bulunmaz,

spesifik biyokomplekslere bağlıdır. Hububat ürünlerinde kadmiyum fitatlarla kompleks yapar, yeşil sebzelerde fitoşelatlarla bağlı olarak bulunur. Et ürünlerinde özellikle karaciğer ve böbrek, istakoz ve midyede metallothioneinlere bağlıdır (21).

2.2 Çinko (Zn)

Çinko elementinin atom numarası 30 olup, relatif atom ağırlığı 65,38'dir. Elementlerin tablosunda II B grubunda olup, tuzlarının çoğu toksik değildir (1). Çinko birçok mineralde bulunur, çinko blend ZnS , kalamın $ZnCO_4$, çinko oksit ZnO bunların en önemlileridir. Çinko filizleri önce karışık oksitler elde etmek üzere kavrulur sonra karbonla indirgenerek çinko ve kadmiyum metalleri karışımı elde edilir. Kadmiyum ve çinko damıtmayla ayrılır. Kadmiyum ve çinko sulu hidrojen iyonu ile reaksiyona girer. Bunlar oksijenle ve kükürt, fosfor ve halojenler gibi ametallerle, oda sıcaklığında veya daha yüksek sıcaklıklarda reaksiyon verirler (9).

Çinko, otomotiv, azotlu gübre, cam, çimento, metal, petrol, plastik-sentetik madde, termik enerji ve çelik endüstrisi atık sularında incelenmesi gereken kirlilik parametrelerinden birisidir (41).

Tablo I. Çeşitli ülkelerde endüstriyel atıkların kanalizasyonuna deşarjında öngörülen limit değerleri (sadece kadmiyum ve çinko için),(41).

Ülkeler Maddeler	Yunanistan	İngiltere	İtalya	İsviçre	A.B.D'de çeşitli kentler için
Zn (mg/L)	10	10	1	2	5-15
Cd (mg/L)	8	2	0,02	0,1	0,1-5

Tablo II. Atıksuların şehir atıksu altyapı tesislerine deşarjında öngörülen atıksu standartları (sadece kadmiyum ve çinko için),(41).

Maddeler	Kanalizasyon sistemleri tam arıtma ile sonuçlanan atıksu altyapı tesislerinde	Kanalizasyon sistemleri derin deniz deşarjı ile sonuçlanan atıksu altyapı tesislerinde
Zn (mg/L)	10	10
Cd (mg/L)	2	2

Çinkonun esansiyal bir gıda olduğu 1934'de gösterilmiştir (31). Çinko içme suyunda karşılaşılabileceğimiz bir elementtir (22).

Çinko istiridyede çok bol miktarda bulunur. Kepek, buğday unu, ekmek, salyangoz, ciğer, böbrek, dana, domuz ve kaz eti, lahana, yılan balığı ve yengeçte de önemli ölçüde mevcuttur (4).

Geçmiş yıllarda çinkonun insan beslenmesi ve sağlığındaki rolüne çok az dikkat edilmişti. Ancak son yıllardaki çalışmalara göre çinkonun 100'den fazla enzimin kofaktörü olduğu bulunmuştur. Örneğin; alkalin fosforaz, laktik, malik ve alkol dehidrogenaz, karbonik anhidraz (eritrositlerde), karboksipeptidaz ve retinen redüktaz. Çinko aynı zamanda hücre içi serbest radikal konsantrasyonunu azaltan süperoksit dismutazın bir tipinin komponentidir (1).

DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve tamiri ile ilgili enzimlerin çoğu çinko metalloenzimlerdir. Bunlar DNA polimeraz, terminal deoksiribonükleotidil transferaz ve timidin kinazdır. Çinkonun aynı zamanda nükleus içinde, kromozomlarda ve iç iplikçiklerinde bulunduğu gösterilmiştir (1).

Gebelikte çinko eksikliği insanda ve deney hayvanlarında konjenital malformasyon ve kromozom aberasyon insidansında artışla ilgilidir (1).

Çinko gelişme ve normal hücre proliferasyonu için gereklidir (47). Çinkonun membran üzerinde stabilize edici etkisi de vardır (43). Çinko eksikliği; gelişme bozukluğu, hipogonadizm, sekonder seks karakterlerinin gelişmesinde gecikme, iştah kaybı (52), tad ve koku alma duyularında kayıp (3,52), kollajen sentezinde yetersizlik, yara iyileşmesinde gecikme (52), özellikle T-Lenfositlerin aracılık ettiği immün cevabın bozulması (1), kemikte osteoporoz, periost reaksiyon ve spontan kırıklara neden olur (42).

Çinkonun genel metabolizmaya olan katkısı bir çok enzimlerle olan birlikteliğine ve membran stabilitesiyle immün yanıtlardaki rolüne bağlanmaktadır (14).

Çinko teratojenisitesinin işlergesi bugün için bilinmemekte ise de DNA sentezinin aşırı miktarda çinko tarafından inhibisyonu en olası açıklamadır. Çinkonun DNA polimeraz ve timidin kinaz gibi birçok enzimin kofaktörü olması nedeniyle, çinko konsantrasyonundaki hafif bir artış DNA sentezini stimüle ederken büyük eksiklik veya fazlalıklar DNA sentezinde inhibisyona neden olur. DNA sentez inhibitörlerinin çeşitli hayvanlarda teratojenik olduğu ise bunların etki yollarına bakılmaksızın kanıtlanmıştır. Çinko eksikliği memelilerde bariz şekilde teratojenik iken

Çinko fazlalığı görüldüğü kadarıyla daha az teratojeniktir. Bu olay maternal karaciğer ve plasental metallotioneinlerin etkisine bağlı olabilir. Ovipar akuvatik organizmalarda böyle bir koruma mevcut olmadığından bunlar aşıırı çinko fazlalığına daha duyarlı olacak ve anormal gelişme görülecektir (12).

3. Zebrabalığı (*Brachydanio rerio*)

3.1 Zebrabalığının Sistematığı (28)

Phylum: Chordata

Subphylum: Craniata

Class: Osteichthyes (kemikli balıklar)

Superorder: Teleostei

Order: Ostariophysoidei

Suborder: Cyprincidea

Familya: Cyprinidae

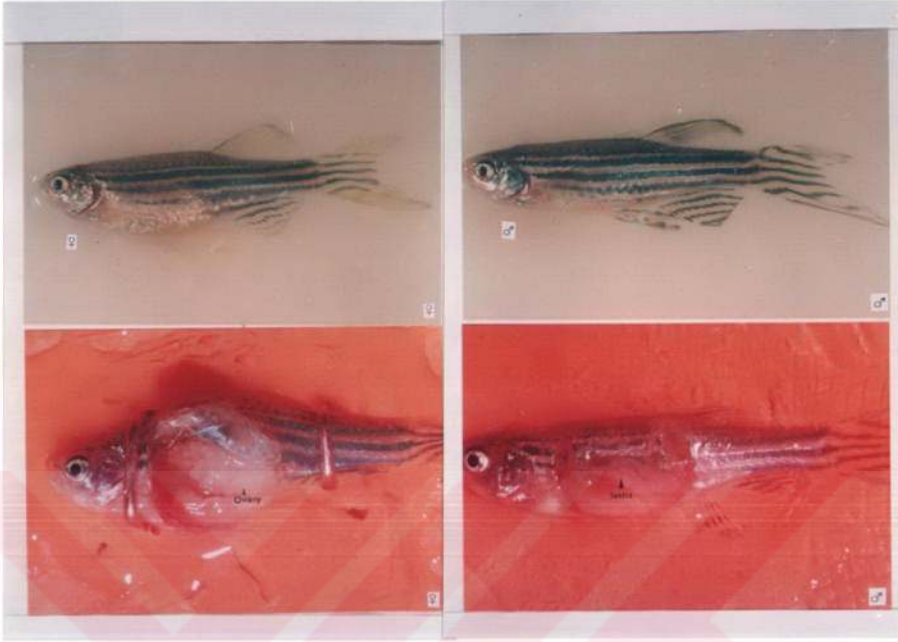
Genus: *Brachydanio*

Species: *Brachydanio rerio* (Zebrafish)

3.2 Zebrabalığı'nın Genel  zellikleri

Bu tür 1930'lerden beri yaygın olarak üzerinde çalışılan bir balıktır (29).  zerinde Zebra'nın çizgilerine benzer hatlar olduğundan Zebrabalığı denir (2). Akvaryumlarda yaygın bir şekilde s s olarak kullanılır ve Cyprinidae familyasının bir  yesi olup doğal olarak Bengal'den Hindistan'ın Coromandel sahillerine kadar bulunur (19). Hareketli bir balıktır, diğer balıklarla beraber çok iyi ve uyumlu bir şekilde yaşırlar ve sürü halinde yaşıamaktan hoşılanırlar. Boyları dişilerde 5 cm'ye kadar ulaşabilir (Şekil 1A), (2).

Erkekler ise dişilerden daha ufaktır. Erkeklerde karın düz ve bu nedenle dişiye oranla daha ince görülür. Vücut temel olarak gümüş rengindedir. Vücudu boydan boya 7-9 arasında mavi çizgilere sahiptir. Bu çizgiler kuyrukta da devam eder (Şekil 1C), (2). Erginleşmemiş erkek ve dişilerin ayırt edilmesi, belirsiz seks karakterlerinden dolayı çok zordur. Erginleşmemiş erkekler dişiye nazaran daha büyük anal yüzgeçlere sahiptirler. Dişilerin genital papillası daha belirgindir. Ayrıca karın oldukça şişkin ve tombuldur (24).



Şekil 1A, 1B, 1C, 1D: 1A. Ergin dişi Zebrafalğı, 1B. Dişi Zebrafalğı'nın ovaryumu, 1C. Ergin erkek Zebrafalğı, 1D. Erkek Zebrafalğı'nın testisleri.

3.3 Zebrafalğı'nda Üreme

Bu ovipar tür orijinal ortamından uzakta tanklar içinde kolaylıkla yetiştirilebilir (29). Yaşam koşulları bakımından 20-30-32°C arasındaki sıcaklıklarda yaşayabilirler. Bu balıklar için en ideal su ısısı 25-26°C'dir. Nötr sulardan hoşlanırlar ve 6.5-7.2 PH arasındaki sular bunlar için idealdir. Sert sularda da rahatlıkla yaşarlar. Fakat üreme bakımından problemlili olabilir. Normal çeşme suyu konmuş akvaryumlarda bol havalandırma koşullarında rahatça yaşarlar (2). Besin ve ısı yumurtlamaya hazırlanacak balıklar için önemli faktörlerdir. Bu balıklar omnivor olup çeşitli besinleri alırlar; kuru veya dondurulmuş normal balık yemi, plankton, Paramecium, beyaz solucan, sivrisinek lavrası, Tubifex, Daphnia ve Drosophila gibi. Stok tanklarında ısı 24°C civarında, yetiştirme tanklarında ise 26°C civarında olmalıdır (29).

Bu balıkların üretilmesi pek zor değildir. Oldukça fazla sayıda yumurta bırakırlar (2). İlk yumurtlama dişiler standart uzunluk olan 24.1 mm'ye ulaştıklarında gerçekleşir. Bu uzunluğa 25.3-25.7°C'de 74-75 günlük bir kültürden sonra ulaşırlar (29).

Yumurtlama zamanı fotoperiyot ile yakından ilişkilidir; 13 saat aydınlığı takiben 11 saatlik bir karanlık kafidir. Bir dişiye 4-5 erkek olacak şekilde yapılan çiftleştirmelerden 26°C'de 250-500 yumurta elde edilebilir. Yapışkan olmayan, transparant ve dibe çöken bu yumurtalar embriyolojik çalışmalar için çok uygundur. Çünkü gelişme periyodu fertilizasyondan (döllenen) hatchinge (koryondan çıkışa) kadar 26°C'de yaklaşık 96 saattir (29).

Yumurtlatmak için akvaryuma konulduklarında dikkatli olunmadığında ve önlem alınmadığında yumurtalarını yerler. Bu nedenle damızlık balıkların konulacağı akvaryumun dip kısmına 1-2 cm ebadında çakıl taşları konur veya yumurtaların geçişine izin verecek gözenekli olan tel veya tül gibi bir materyal kullanılabilir (2).

Yumurta almak için seçilen akvaryuma temiz ve klorsuz çeşme suyu doldurulur. Yarı yarıya kaynak suyu veya saf su koymak suyu çok sert olan yerler için gereklidir. Akvaryum bol aydınlatılmalıdır. Termostatlı bir ısıtıcı ile su sıcaklığı 26°C'de tutulur. Bu şekilde hazırlanan akvaryum en az üç gün dinlendirilmelidir. Dinlendirilmemiş su kullanılır ise yumurtaların % 50'sinin beyaz bir mantar tabakası ile kaplandığı ve öldüğü görülecektir (2).

Yavru alınacak olgun erkek ve dişiler birbirlerinden bir hafta kadar önce ayrılmalıdır. Bol sayıda damızlık olabilecek balık var ise karnı şişkin olan dişiler ile takriben 4-5 cm boyunda olan erkekler ayrılmalıdır. Bu şekilde ayrı bakılan dişi ve erkeklerin hazır olduğu anlaşıncı hazırlanmış olan akvaryuma alınırlar. Bu hazırlıklar iyi yapılmışsa, diğer günün sabahında balıkların yumurtlamış oldukları görülür. Yumurtlama periyotlar halinde devam eder. Kendisinden yumurta alınan bir dişi 3 hafta sonra tekrar yumurta bırakabilir. Bir dişi ilk yumurta alımında kullanılıyor ise bu yumurtalardan yavru çıkmaması mümkündür (2).

3.3.1 Testisler

Ergin erkek Zebrabalığı'nda testisler, solungaçlara yakın bölgeden anal yüzgeçlere doğru uzanan vücut duvarında bilateral olarak yerleşmiş fusiform yapıda olup bir çifttir (Şekil 1D). Her testisin arka uzunluğu boyunca uzanan birbirine paralel beş efferent kanala seminer tübüllerden gelen spermiler toplanır. Bu kanallar ventralden genital papillaya açılır (29).

3.3.2 Ovaryumlar

Ergin dişi Zebrabalığı'nın ovaryumları loplu olup bir miktar da stroma içerir (Şekil 1B). Oositler salkım şeklinde hücrelerden oluşan germinal epitelden doğar. Merkezi olarak yerleşmiş büyük hücreler oosit haline gelirken, çevresinde yer alan hücreler follikül hücrelerini oluşturur (29).

Kemikli balık yumurtalıklarında oositlerin değişik gelişme aşamalarında olduğu gözlenmiştir (29).

4. Kemikli Balıklarda Yumurta Morfolojisi

Yumurtalar dişi balığın ovaryumunda gelişir. Büyüklüğü türlere göre değişiklik gösterir. Yumurtalar arasındaki bu değişiklik vitellus miktarı, vitellusun dağılışı ve sitoplazmayla ilişkisine göre meydana gelmektedir (27).

Bazı balıklarda vitellus miktarı çok azdır (meiolesital) ve holoblastik equal bölünme (tam-eşit bölünme; Amphioxus) vardır. Ciğerli balıklar (Dipnoi) ve Mersin balıklarında vitellus daha çoktur (mesolesital), bölünme holoblastik inequaldir (tam-eşit olmayan bölünme; kurbağalar). Kemikli turna balıklarının yumurtalarında vitellus biraz daha fazladır bölünmede tam değildir, ancak diskoidal bölünmede olduğu gibi sadece blastodisk bölünmekle kalmaz, bölünme yarıkları vitellusa kadar devam eder. Kemikli balık (Teleostei) yumurtalarında vitellus çok fazladır. Bölünme tipik diskoidaldir, bölünme yarıkları blastodiski aşmaz (meroblastik diskoidal bölünme). Yavrular yumurtadan ergine benzer şekilde çıkar (27).

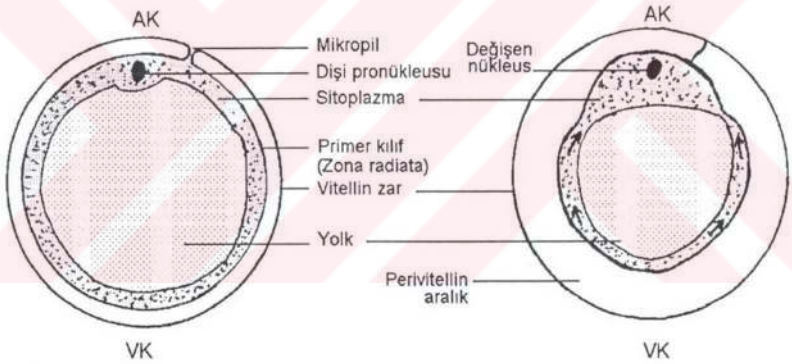
Yumurta hücresinin olgunlaşması sırasında s toplazma ve nükleus bileşiminde ve yapısında bazı değişiklikler meydana gelir. Embryonun beslenmesi için vitellus (deutoplazma) ve yağ damlalarından oluşan depo edilmiş besin materyali s toplazma tarafından salgılanır. Yağ, karbonhidrat ve proteinlerin birikmesi olgun yumurtanın büyüklüğünü tayin eder. Protein partikülleri ve yağ damlaları yakın formlar için sistematik değerlendirmede tanıtıcı faktör olarak kullanılır (27).

Kemikli balık yumurtalarının olgunlaşması sırasında sitoplazmanın az bir kısmı vitellus ve yağ damlalarını ince ve düzgün bir tabaka halinde çevirir. Yumurta pronükleusunun bulunduğu animal kutupta sitoplazma miktarı daha fazladır (blastodisk). Bu devrede vitellus ve s toplazmanın dağılımı yönünden sentrolesital yumurta tipine benzerlik gösterirler (27).

Tüm omurgalı yumurtalarında olduğu gibi balık yumurtalarının etrafı primer (oosit tarafından salgılanan), sekonder (follikül hücrelerinden salgılanan) ve tersiyer (oviducttan salgılanan) membranlarla çevrilidir. Sitoplazmanın hemen üzerinde bulunan ince plazmik membrana Zona radiata (primer kılıf) denir. Bu tabakanın sayısı ve kalınlığı balığın cinsine göre değişebilir. Teleostların çoğunda en basit şekildedir. Zona radiata'nın üzerinde folliküler hücreler tarafından salgılanan jel tabakası (sekonder örtü) vardır. Jel tabakası su alarak şişer ve yapışkan hale gelir. Yumurtanın otlara vs. tutunmasına sağlar (27).

Balık yumurtalarının çoğunun diğer bir özelliğinde, kabuğunun kalın olması nedeniyle animal kutbun yan tarafında spermin girmesine yarayan ve **mikropil** adı verilen açıklığın bulunuşudur (Şekil 2a ve 2b), (27).

Olgun yumurta ile dolu balık ovaryumuna olgunlaşmış ovaryum (ripe) adı verilir. Bazı balık türlerinde yumurtalar, yumurta bırakmaya hazır bir dişinin karnını sıkarak suretiyle kolayca çıkartılabilir. Döllenmeye hazır olmayan yumurtalar, olgunlaşmış



Şekil 2a. Döllenmeden önce kemikli balık yumurtası.

Şekil 2b. Döllenmeden sonra kemikli balık yumurtası.

olanlara oranla daha serttir. Tatlı su balıklarının yeni yumurtlanmış yumurtaları oldukça yapışkan ve yumuşaktır. Bunlar süratle su alarak sertleşirler. Yumurtanın bu durumuna su **sertleşmesi** denir. Balıkların çoğunda yumurta ve spermier doğrudan suya bırakılır, dış dölleme meydana gelir (ovipar), (27).

4.1 Dölleme

Üremeye hazır balıklarda erkek ve dişiler arasında yakın bir ilgi meydana gelir. Bu da erkeğin, dişinin yakınlarında yada üst taraflarında yüzmesiyle sağlanır. Erkek dişiye zaman zaman çarpar ona bir yüzük şekline gelerek sarılır. Bu arada spermierini suya bırakır. Spermier kamçı hareketiyle yumurtaya yaklaşır. Döllemeden önce sperm yumurta kapsülünü geçerek s toplazmaya yaklaştığı zaman yumurta stoplazması bir miktar sıvı salarak hafif büzölür. Aynı anda jel tabakasının şişmesiyle birlikte kapsülle yumurta yüzeyi arasında sıvı dolu perivitellin bölge (perivitellin aralık) meydana gelir. Perivitellin sıvı yumurtanın serbestçe hareket etmesini sağladığı gibi dış etkenlere karşı (vurma, çarpma) gelişen embrioyu korur (27).

Yumurta spermierin girişi sırasında tam olgunlaşmamıştır. Sperm girdikten sonra II. Mayoz bölünme başlar. İkinci polar cisim yüzeye atıldıktan sonra dişi pronükleusu ile erkek pronükleusu kaynaşır ve dölleme tamamlanmış olur. Spermierin girişi yumurtanın s toplazmasında da bazı değışiklere neden olur. S toplazmanın büyük bir kısmı animal kutba doğru akararak burada germinal diski (protoplazmik diski) oluşturur. Yumurtanın çevresini saran s toplazma iyice azalarak ince bir tabaka halini alır. Bu değışikliklerden sonra dölleme sırasında sentrolesital tipte olan balık yumurtası artık ileri telolesital yumurtaya dönüşür. Meroblastik (kısmi) diskoidal bölünme meydana gelir (27).

5. Zebrabalığı'nın Gelişimi ve Hayat Siklusu

Roosen-Runge Zebrabalığı'nın erken gelişim devrelerini resmettiler. Bu periyotlar iki kez sinema filmi yapıldı. Biri Lewis ve Roosen-Runge tarafından ışık mikroskobuyla, diğeri Hisaoka, Ott ve Marchese tarafından faz-kontrast mikroskobu kullanılarak yapıldı (19).

Eksperimantal embr-yolojideki çalışmalar için balık embriolarının kullanılmasının faydası başlıca Luther, Pasteels, Solberg, Waterman, Oppenheimer ve Rugh gibi araştırmacılar tarafından gösterildi (19).

Zebrabalığı embriyosunun gelişim dönemlerinin başlıca göze çarpan karakteristikleri ($26 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de) özetle şöyledir (Şekil 3A, 3B).

1. Döllenenmiş Yumurta

2. Henüz döllenmiş bir yumurta: Döllenenmeden hemen sonra koryon mükemmel bir küre şekline gelir (19). Döllenmeyle oluşan perivitellin aralık vitellin membran (koryon) ile Zona radiata'yı birbirinden ayırır. Koryonun kalınlığı yaklaşık $10\ \mu\text{m}$ 'dir. Koryon birbirinden 1.3-3.0 μm uzaklıklarla yerleşmiş $1.5\ \mu\text{m}$ çapında sirküler porlara sahiptir. Bu koryonik yüzey su ve elektrolitlerin perivitellin aralığa penetrasyonunu sağlar (29). Yumurta hücresinin kendisi biraz elipsoidal yapıdadır. Yumurtanın koryonla birlikte çapı 0.92-0.98 mm'dir. Yolk küresinin ekvatoryal çapı 0.55-0.60 mm'dir (19).

3. Bir hücreli blastodisk: Koryonun şeffaflığı nedeniyle stoplazmadan blastodisk teşekkülünü gözlemek mümkündür. Döllenenmeden yaklaşık 5 dak. sonra, animal kutup yumurta kütesinin yassılaşmasıyla ayırt edilir. Blastodisk sonradan yaklaşık 25 dak. içinde yassılaşır, granüler stoplazma net bir şekilde homojen, koni şekilli bir kütle haline gelir. Bu şekliyle yumurta artık tipik bir telolestaldır. İlk altı bölünme düzlemi oldukça düzenlidir (19).

4. İki hücreli blastodisk: Döllenenmeden sonraki 35. dakika içinde, blastodisk ortasından (median) dikey (vertikal) bir şekilde ilk yarıklanmaya uğrar ve biraz globüler yapıda iki eşit blastomer oluşur (19).

5. Dört hücreli blastodisk: Döllenenmeden sonra yaklaşık 43 dak. sonra ikinci yarıklanma birinci bölünmenin planına dik açılarla gerçekleşir. Her bir globüler blastomer orijinal blastodiskin dörtte birini temsil eder (19).

6. Sekiz hücreli blastodisk: Üçüncü yarıklanma düzlemi çift olup döllenmeden sonraki 71. dakikada olur. İlk bölünme düzlemine paralel ikincisine diktir. Meydana gelen 8 blastomer genellikle dört hücrenin iki sıra oluşturacak şekilde dizilmesiyle düzenlenir (19).

7. Onaltı hücreli blastodisk: Dördüncü yarıklanma döllenmeden yaklaşık 90 dak. sonra tamamlanır. İkinci bölünme düzlemine paralel olan birinci ve üçüncü bölünme düzlemine dikey bir bölünmedir (19).

8. Otuziki hücreli blastodisk: Beşinci yarıklanma birinci bölünme düzlemine paralel olan dikey bir bölünmedir. Buraya kadar blastomerler birbirine eşit ve tek sıralıdır (19).

9. Atmışdört hücreli blastodisk

10. Yüzyirmi sekiz hücreli blastodisk

11. Geç yarıklanma (late cleavage): Altıncı yarıklanma hızla beşinciye takip eder ve tek tabakalı olan blastomerleri iki tabaka halinde ayıracak şekilde meydana gelir (ilk horizontal bölünmedir). Altıncı yarıklanmayı daha düzensiz olan iki yarıklanma takip eder. Blastomer sayısı katlanarak artar. Bu evredeki blastomerleri saymak imkansızdır, ancak seri kesitleri alınarak sayılır. Yolk bölünmelere katılmaz (Teleost yumurtalarının çoğunda durum böyledir), (19).

Horizontal bölünmeler sonunda blastula iki tabakaya ayrılır. Altına **primer periblast**, ikinciye **blastoderm**, aradaki boşluğa **primer blastosöl** denir (27).

12. Erken yüksek blastula (Early high blastula): Döllenmeden sonraki ikinci saatin hemen sonunda çok hücreli blastoderm görülür (animal kutupta gevşek olarak organize olmuş hücrelerin tepesinde yükselen kısım), (19).

13. Geç yüksek blastula (Late high blastula): Döllenmeden sonraki yaklaşık 2.5 saatte blastoderm hücreleri daha kompakt bir şekilde düzenlenir (19).

14. Düz blastula (Flat blastula): Döllenmeden 3.5 saat sonra tamamlanır, blastoderm önemli derecede düzleşir ve yüzeyi pürüzsüz bir hale gelir (19).

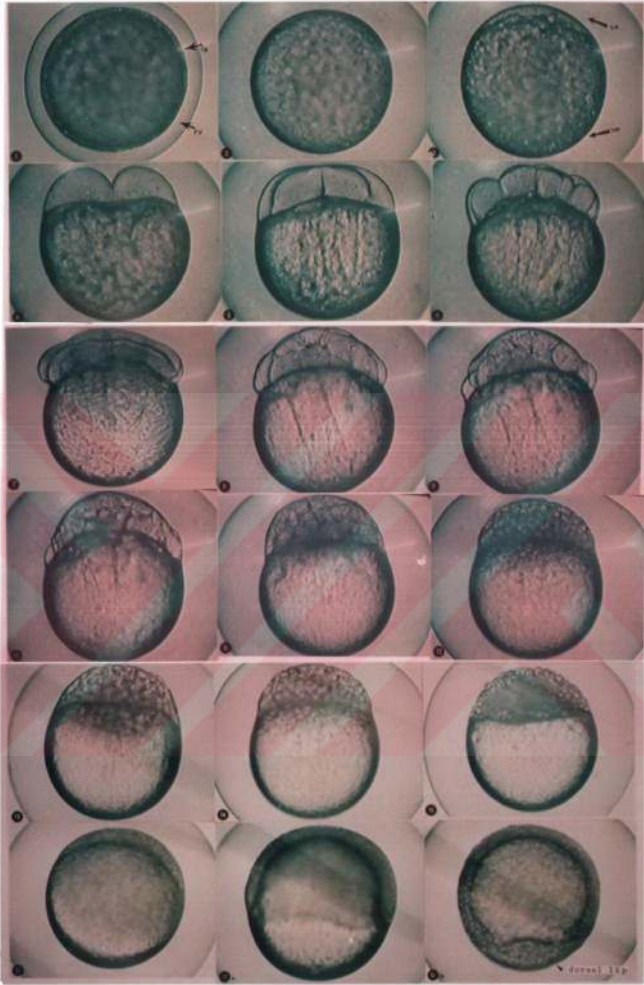
15. Çok geç blastula (Very late blastula) veya gastrulasyon öncesi dönem: Döllenmeden dört saat sonra blastodermin dorsal kenarı yolk yüzeyine komşu olan kısmın içine (periblasta) karışır. Bu aşamanın sonunda yumurta küresel formdadır. Blastomerler artık çok küçüktür (19).

16. Gastrulasyonun başlangıç dönemi

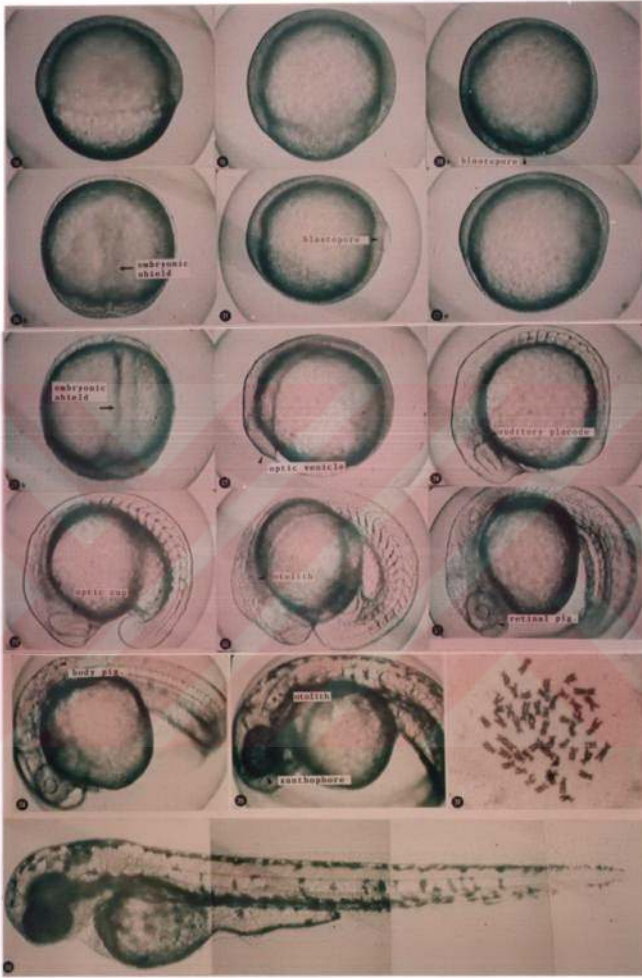
17. Erken gastrula (Early gastrula): Blastodermin yolk küresinin üçte birini kapadığı dönemdir. Döllenmeden yaklaşık 5 saat sonra başlar. Blastoderm daha düz bir hale gelir. Yolk kütesinin üzerini örtecek şekilde çok hızlı bir şekilde bölünmeler meydana gelir. Germ halkasının kenarı blastoporun dorsal dudağının lokalizasyonunu belirleyen hücresel bir involüsyon başlar (19).

18. Gastrulasyonun orta dönemi: Blastodermin yolk kütlesinin 1/2'lik kısmını kapadığı dönemdir. Döllenmeden sonraki altıncı saatten sonra blastoderm yolk kütlesinin 1/2'lik kısmına kadar gelişir ve dorsal dudaktan gelişen embryonik örtü iyice uzar (19).

19. Geç gastrula dönemi: Blastodermin yolk kütlesinin 3/4'lük kısmını kapadığı dönemdir. Döllenmeden sonraki yedinci saatten sonra epiboli ile yolk kütlesinin 3/4'lük kısmı kapatılır. Bu dönemde geniş bir yolk tıkaçı mevcuttur. Embryonik örtü belirgin bir omurgaya kondanır olur (19).



Şekil 3a. Zebrafalığı'nın Embryonik Gelişim Safhaları. 1. Döllenmemiş yumurta, Cg: Kortikal granüller, PV: Perivitellin aralık; 2. Döllenmiş yumurta; 3. Bir hücreli blastodisk, AP: Animal kutup, VP: Vejetatif kutup; 4. İki hücreli blastodisk; 5. Dört hücreli blastodisk; 6. Sekiz hücreli blastodisk; 7. Onaltı hücreli blastodisk; 8. Otuziki hücreli blastodisk; 9. Altmışdört hücreli blastodisk; 10. Yüzyirmisekiz hücreli blastodisk; 11. Geç yarıklanma; 12. Erken yüksek blastula; 13. Geç yüksek blastula; 14. Düz blastula; 15. Gastrulasyon öncesi; 16. Gastrulasyon başlangıcı; 17a. Erken gastrula; 17b. Erken gastrulanın tepeden görünüşü.



Şekil 3b. 18. Gastrula; 19. Geç gastrula; 20. Blastopor kapanmadan önce; 21. Blastoporun kapanması I; 22. Blastoporun kapanması II; 23. Optik vesiküller; 24. İşitme plağı; 25. Optik çukur; 26. Otolit formasyonu; 27. Retinal pigmentasyon; 28. Body pigmentasyonu; 29. Ksantofor gelişimi-prehatching (çıkış öncesi); 30. Hatching (çıkış); 31. Metafaz kromozomları (2N:50).

20. Blastoporusun kapanmasından önceki dönem

21. Blastoporusun kapanması I dönem (2 somit): Döllenmeden on saat sonra yolk kütesinin tamamı hızla gelişen germ halkası tarafından (dorsal dudağı hariç) kapatılır. Embryonun eksenini hemen hemen yolk kütesinin etrafını saran yarı şeffaf bir kabartma çizgi (sırt) olarak fark edilebilir. İki mezodermal somit differansiye olur (19).

22. Blastoporusun kapanması II dönem

23. Optik vesiküller (5 somit): Blastopor dudaklarının birleşmesinden kısa bir süre sonra prosencephalonun arka-yan duvarlarının evaginasyonu ile optik vesiküller gelişmeye başlar. Döllenmeden yaklaşık 14-16 saat sonra optik vesiküller net bir şekilde ortaya çıkar (19).

24. İşitme plağı dönemi (Auditory placode, 15 somit): 20 saatlik embryo artık tipik balık şekliyle tanınabilir ve işitme plakları gelişmiştir. Yolk kütesinin posteriyör kısmında kısmi bir darlık başlar (19).

25. Optik çukur dönemi (Optic cup stage, 20 somit): Döllenmeden yaklaşık 24 saat sonra optik vesikül invaginasyona uğrayarak optik çukur formuna dönüşür. Lens gelişir. Notokord işitme vesikülünden kuyruk sonuna kadar uzanır. Embryonik gövdenin özellikle posteriyöründe bir uzunluk artışı olur ve kuyruk yolk kütle sinden ayrılır. Müsküler hareketler bu aşamada başlar (19).

26. Otolit formasyonu dönemi (Otolith formation stage, 30 somit): Döllenmeden sonraki 27. saatte otolitler görülür ve kuyruk epeyce uzar ve hemen hemen başa değer. Kalp atışı başlar, 1-2 saat içinde sirkülasyon gözlenebilir. Yolk kütesi anterior elipsoidal ve posteriyör silindirik iki kısımdan oluşur (19).

27. Retinal pigmentasyon dönemi (32 somit): Döllenmeden sonraki 37. saatte gözün retinal tabakası içindeki melanin gözün görünür hale geçmesine neden olur. Beyin ventrikülleri net bir şekilde görülür ve baş yolk kütesine bağlandığı kısımdan ayrılır. Median dorsal yüzgeç ve kaudal yüzgeç belirir. Pektoral yüzgeçlerin seğirmeler şeklindeki hareketleri görülebilir. Sirkülasyon özellikle yolk kütesi üzerinde açıkça görülebilir (19).

28. Vücut pigmentasyonu (melanofor) dönemi (33 somit): Retinada melanin oluşumundan kısa bir süre sonra oldukça geniş yıldız şeklinde melanoforlar baş bölgesinin üzerinde ve yolk kütesinin yüzeyinde karın çevresinde görülmeye başlar. Sonradan 49. saatte

melanoforlar tümü kuyruk ve yüzgeçler boyunca yayılır ve Zebrabalığı'na has karakteristik çizgilerle düzenlenmeye başlar. Rombencefalon uzar ve ventriküller açıkça görülür. Olfaktory (koku) plakaları anterior ve medial olarak gelişir (optik çukurlara anterior ve medial olarak). Barsak, hava kesesi ve karaciğer görülür (19).

29. Ksantofor gelişimi (34 somit): Embryolar artık prehatching denilen ve koryondan çıkmaya hazır oldukları döneme ulaşırlar (döllenmeden 3-4 gün sonra). Ksantoforlar bu dönem sırasında görülür. Baş bölgesinde başlayan yaygın bir sarı renklenmenin sonucu olarak ksantofor oluşur ve bütün embryonun kaudal kısmına doğru yayılır. Somit sayısı erişkindeki karakteristik sayıdadır. Anteriörde 15 somit, posteriörde 19 somit bulunur. Çenelerde kırdak oluşumu başlar (19).

Embryonik ve ekstra embryonik sirkülasyon kuvvetlidir ve eritrositler kan damarlarında taşınırken gözlenebilir. Kalp atışları oldukça düzenlidir, ortalama dakikada 191 kez (26°C'de) atar. Gövdenin ve kuyruğun şiddetli kontraksiyonları embryonun koryon içindeki pozisyonunun sık sık değişmesine neden olur (19).

30. Koryondan çıkma (Hatching): Kuyruğun koryona yaptığı vuruş darbeleriyle koryon herhangi bir noktadan yırtılır. Aynı şartlar altındaki yumurtalrın çoğunun koryondan çıkma zamanları oldukça çeşitlidir, fakat normal olarak 26°C'de yaklaşık dördüncü gündedir. Yakın zamanda koryondan çıkan larvanın yolk kütleşi oldukça küçülmüştür. Melanofor pigmentasyonu daha yoğundur ve melanofor yıldızları, Zebrabalığı'nın karakteristik çizgileri şeklinde düzenlenir. Optik çukur yoğun bir şekilde pigmentlenir ve gözlerin irisinde sarımtırak hafif bir renk gözlenir. Karaciğer gibi iç organlar, barsaklar ve hava kesesi yarı transparant olan vücut duvarından ayırt edilebilir (19).

Larvalar koryondan çıktıktan sonraki 2-3 günde beslenmeye ihtiyaç duymazlar. Üçüncü günden sonra yumurta sarısı ile beslenirler. Üç-dört haftalıktan sonra Artemia salina larvalarıyla beslenmeye başlanır. Akvaryumda bitki bulunur ise yapraklarda oluşacak yosunları da yiyerek süratle büyürler (2).

6. Zebrabalığı'nda Çevresel Ajanlarla Görülebilecek Teratojenik Etkiler

Gelişimin erken evrelerinde çevresel ajanlarla muamele edilen Zebrabalığı'nın embryoları genellikle anomali gösterir. Kullanılan ajanın konsantrasyonundaki oran, muamele süresi ve

birikim bu anormalliklerin ortaya çıkışında kritik parametrelerdir (29).

Zebrabalığı'nda gözlenen anormaliler genellikle ödemi ve dolaşım bozukluklarını, merkezi sinir sisteminin ve duyu organlarının organizasyonunda bozuklukları, notokord ve adale malformasyonlarını, epidermal aberasyonları içerir (29).

Beyin, periton ve perikardiyal boşluklardaki ödem, dokuların aşırı şişmesi ve büyümesiyle ortaya çıkar. Ödeme genellikle vasküler sirkülasyondaki düzensizlikler ve durgunluk eşlik eder. Kalp tüpü genişleyebilir ve atipik fleksür gösterebilir, kontraktıl özellikleri zayıflayabilir, kalp atımı zayıflar veya tamamen kaybolur (29).

Merkezi sinir sistemi gross düzensizlik gösterebilir. Omurilik ve beyinde sıklıkla düzensiz boşluklar genişir ve bu boşluklar gevşek hücre topluluklarıyla doludur. Gri ve beyaz cevher arasındaki bariz sınır çizgisi genellikle kaybolur. Duyu organları etkilenir, özellikle gözlerde teratojenik faktörlere hassasiyet görülür; normal bilateral konumlarından aşırı orta hata doğru kayma meydana gelebilir. Auditory (işitme) ve olfaktory (koku) yapılarında hassasiyet kaybı görülür (29).

Gövde ve kuyruk anomalileri en sık rastlananlardır. Kuyrukta kısalma ve sıklıkla sağa veya sola tek veya daha çok kırık görülebilir. Pigmentasyonda değişiklik meydana gelebilir (29).

GEREÇ VE YÖNTEM

1. Zebrabalığı'nın Temini, Bakımı ve Çiftleştirme Akvaryumlarının Hazırlanması

Damızlık Zebrabalıkları Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi'nden ve akvaryumculardan temin edildi.

Balıklara 40x60x100 cm (yükseklik, en, boy) ebadında stok akvaryumlarında dişi ve erkekler birbirlerinden ayrı olarak bakıldı. Akvaryumlar sürekli olarak filtreli bir hava pompasıyla havalandırıldı ve temizlendi. Akvaryum ısısı termostatl ısıtıcılarla 24°C civarında tutuldu. Yemleme (pul tetramin) günde 2-3 kez yapıldı. Haftada en az bir kez canlı yem (Tubifex ve Daphnia) verildi.

Çiftleştirme akvaryumu olarak 24x28x40 cm (yükseklik, en, boy) ebadında 4-6 adet slikonla yapılmış cam akvaryum kullanıldı. Bu akvaryumlara 3-4 gün dinlendirilmiş çeşme suyu kondu ve hava taşları ile havalandırma sağlandı. Her akvaryuma balıkların yumurtalarını yemelerini önlemek amacıyla, 2 mm aralığı olan naylon tülden yapılmış kafesler kondu. Bu tül kafesler geniş, ancak akvaryum içine rahatlıkla adapte olabilecek şekilde hazırlandı. Tül kafeslerin tabanı ile akvaryum tabanı arasına yumurtaları kolaylıkla toplamak amacıyla cam veya paslanmaz metal kaplar kondu. Bu şekilde hazırlanan akvaryumların bulunduğu odaya 13 saat aydınlık 11 saat karanlık olacak şekilde otomatik ışıklandırma sağlandı. Işıklandırma amacıyla floresans lambalar kullanıldı.

2. Yumurta Alınacak Balıkların Seçilmesi, Akvaryumlara Yerleştirilmesi ve Yumurtaların Toplanması

Yumurta toplanması amaçlanan günden bir hafta kadar önce dişi ve erkek balıklar birbirlerinden ayrı olarak önceden hazırlanmış olan akvaryumlara kondu. Bir hafta boyunca çoğunlukla canlı yemle beslenen balıklar, 13 saat aydınlık, 11 saat karanlık fotoperiyoda adapte edildi. Çünkü yumurtlama zamanı fotoperiyotla ilgili olup, 13 saat aydınlığı takiben 11 saat karanlık uygulaması ile memnun edici sonuçlar alınmıştır (29). Bir hafta sonra 1 dişi ve 4-5 erkek aynı akvaryum içine tül kafes içinde kondu. Ertesi sabah ışıkların yanmasıyla beraber yumurtlama tetiklendi ve bir süre sonra tül kafesler altındaki kaplar dikkatli bir şekilde

akvaryumdan çıkarıldı. Yumurtaları nekrotik olanlardan ayırmak için bir ön eleme yapıldı. Bu ön elemeyi geçen yumurtalar daha sonra tekrar bir elemeye alınarak test için sadece normal olarak gelişen embriyolar seçildi (36). Yumurtalar stereo mikroskop altında, ucu alevden geçirilerek yuvarlatılmış (koryonun zedelenmesini önlemek amacıyla) pastör pipeti kullanılarak seçildi. Temiz ve dinlendirilmiş (3-4 gün) çeşme suyu ile bir kaç kez yıkanan yumurtalar, içinde Holtfreter solüsyonu bulunan test petrilere aktarıldı. Bütün testlerde asgari örnek büyüklüğü 30 canlı yumurta olarak alındı. Test grupları aynı dışıdan alınan döllenmiş yumurta sayısına göre hazırlandı. Kontrol grubu için de yine aynı dışının döllenmiş yumurtaları kullanıldı.

3. Kullanılan Su ve Kimyasal Solüsyonların Hazırlanması

Akuvatik toksisite testlerindeki değişkenler; deneyi yapan kişiler, kullanılan aletler ve bunların kalibrasyonu, çevre vb.'dir. Abiyotik faktörler; alkalinite, sertlik, PH, eriyik halde ve süspansiyon haldeki maddeler, erimiş gazlar ve ısı, biyolojik faktörler ise; deney hayvanının türü, suyu, gelişim evresi, beslenme ve önceki muameleler çoğu kimyasal maddenin toksisitesini etkileyebilir (10).

Standart özellikleri nedeniyle çalışmamızda Standart Amphibi Holtfreter Solüsyonu kullanıldı. Bu solüsyon balıklardaki nükleer transplantasyon çalışmalarında medyum olarak da kullanılan bir solüsyondur (40). Bölgemiz (Akdeniz Bölgesi) çeşme suyu çok sert olup (235-250 mg/L CaCO_3) yaptığımız testlerin değişik bölgelerdeki sularla tekrarlanması durumunda su sertliğindeki değişiklikler nedeniyle sonuçlarında değişmesi doğal olacak ve daha önceki çalışmalarda sonuçlarla karşılaştırılamayacaktı. Sert sularda yaşayan tatlı su balıkları kadmiyuma yumuşak sularda yaşayanlara göre daha fazla dirençlidirler (32). Çinkonun toksisitesi üzerinde de suyun özellikle sertliğinin büyük önemi vardır. Bu nedenle EIFAC, tatlısu balıklarının kullanıldığı testlerde su sertliğini bir kriter olarak belirtmiştir. Buna göre su sertliği 100 mg/L CaCO_3 'a ayarlanmalıdır (10). Çalışmamızda kullanılan Holtfreter solüsyonunun sertliği 100 mg/L CaCO_3 civarındadır. Sertlik ölçümleri için EDTA titrimetrik yöntemi kullanıldı (8).

3.1 Holtfreter Solüsyonunun Hazırlanması

Bu solüsyon 100 ml bidistile suya aşağıdaki kimyasalların ilavesiyle hazırlanır.

NaCl	(Merk K 19106500)	0.35 gr
KCl	(Merk TA 520735)	0.005 gr
CaCl ₂	(Merk A 28487)	0.01 gr
NaHCO ₃ *	(Merk K 20953123)	0.02 gr

* Bu solüsyon hazırlanırken ilk üç kimyasal suya konur iyice karıştırılır, daha sonra NaHCO₃ ilavesiyle solüsyonun PH'sı 7 civarına ayarlanır (40). Stok solüsyon hazırlanarak bundan seyreltilebilir.

3.2 Kadmiyum Klorür ve Çinko Klorür Solüsyonlarının Hazırlanması

Her iki kimyasalın da (ZnCl₂ Merk K 20742913, CdCl₂ Sigma C 2544) bidistile su ile stok solüsyonları hazırlandı ve atomik absorpsiyon spektrofotometresiyle (Perkin-Elmer model 2380) doğruluğu kontrol edildi. Bunlardan seyreltme ile istenilen konsantrasyonlarda temas solüsyonları hazırlandı. Buharlaşımadan kaynaklanabilecek konsantrasyon değişikliklerini önlemek için stok solüsyonları 5°C'de muhafaza edildi ve kapakları sıkıca kapatılıp parafilm ile sarıldı. Tüm testler aynı stok solüsyonlar kullanılarak yapıldı.

4. Yumurtaların Kadmiyum Klorür ve Çinko Klorür Solüsyonları ile Temas Ettirilmesi

Bütün testler statik koşullarda ve havalandırması olmayan çözeltilerde yapıldı. Test maddelerinin etkin doz düzeylerini ve ana testte kullanılacak konsantrasyonlarını belirlemek için önce bir sınır belirleyici test yapıldı ve ana testte sınır belirleyici testle belirlenmiş aralıklar içinde kalan 5-6 farklı konsantrasyon kullanıldı. Bütün testler 26°C±1'de (soğutmalı inkübatörde WTB binder marka) yapıldı. İnkübatör içine 13 saat aydınlık 11 saat karanlık olacak şekilde aydınlatma sağlandı. Her konsantrasyon için 5 farklı test grubu kullanıldı.

Zebrabalığı'nın larvaları çıkıştan sonra 2-3 gün kadar besin keselerini absorbe etmediklerinden, beslenmeye başlamadıkları bu dönemde embryo olarak kabul edilirler (10). Test maddeleriyle temasa blastula safhasında başlandı ve toplam 15 gün devam edildi. Testlerin 8.günüden itibaren larvalar yumurta sarısı ile beslendi. Böylece anomali gösteren larvaların hayatlarını idame yeteneğinde olup olmadıklarını görmek mümkün olabildi. Yumurta sarısı hazırlanırken dikkat edilmesi gereken noktalar; kullanılan yumurta sarısı taze olmalı, katı

pişirilmiş yumurtaya,kabuğu açılıp içinde steril distile su bulunan bir enjektörle girilip birkaç defa piston ileri geri hareket ettirilip, enjektöre yumurta sarısı çekilmelidir. Bu şekilde hazırlanan birkaç enjektör üzerine biraz daha steril su çekildikten sonra derin dondurucuda saklanmalıdır. Besleme yapılacağı zaman derin dondurucudan çıkarılmalı ve 15-20 dakika beklendikten sonra eriyen yumurta sarısı ve su karışımından her petriye birer damla damlatılmalıdır. Yaklaşık 5-6 saat sonra solüsyonlar değiştirilmelidir.

Blastula safhasındaki embryolar içinde değişik konsantrasyonlarda test maddesi bulunan geniş yüzey alanlı cam petrilere (8-10 cm çaplı) kondu. Değişik konsantrasyonlar için Holtfreter solüsyonu kullanılarak seyreltme yapıldı. Her 24 saat aralıklarla test ve kontrol gruplarının solüsyonları yenilendi. Solüsyon yenileme işleminde petrideki solüsyonun embryoları kurumaktan koruyacak kadarı bırakılıp geri kalanı uzaklaştırıldı. Kontrol grubu için yalnız Holtfreter solüsyonu kullanılmış olup test gruplarında olduğu gibi her 24 saatte solüsyon yenilendi.

5. Gözlemlerin Yapılması ve Verilerin Toplanması

Kontrol grupları ve test gruplarındaki tüm embryolar 24 saat aralıklarla stereo mikroskop (Kyowa) altında makroskobik olarak incelendi. Ölü ve anormal embryolar gelişme evresi, pigmentasyon, motilite ve çıkış konusundaki gözlemlerle beraber kaydedildi. Embryoların ölü olup olmadığına stereo mikroskopta 4.5x10 büyütmede kalp atışlarına bakılarak karar verildi. Kontrol gruplarındaki normal gelişme gösteren embryoların gelişme evreleri, video-kamera (Sharp Pal-Mesecam System) bağlantılı stereo mikroskop ile 4.5x10 büyütmede videoya kaydedildi. Monitör (Commodore 10845) ekranından çekilen resimlerle normal gelişim evreleri özetlendi (Şekil 3a-3b). Test maddeleriyle temas edip anormal gelişme gösteren ve ölen embryoların en tipik örneklerinin fotoğraf makinası bağlantılı ışık mikroskobu (Olympus BH-2) kullanılarak 2.5x4 büyütmede resimleri çekildi.

6. İstatistik

LC_{50} değerlerinin probit analizi ile hesaplanması için SPSS Release 4.1 programı, farklı konsantrasyonlardaki ölüm yüzdelerinin kontrol grubu ve birbirleriyle karşılaştırılması için CSS istatistik programı ile Khi-Kare Testi kullanılmıştır.

BULGULAR

1. Sınır Belirleyici Test Sonuçları

1.1 Çinko Klorürle Yapılan Sınır Belirleyici Test Sonuçları

Sınır belirleyici testler yüksekten düşüğe değişik konsantrasyonlarda yapılmış olup, çinko klorür için bu konsantrasyonlar; 200-160-80-40-20-10-5.0-1.0-0.5-0.1-0.05 mg/L'di. Bu konsantrasyonlar için testlerde kullanılan solüsyonun sertliği 100 mg/L CaCO_3 ve 10 mg/L CaCO_3 'a ayarlanarak testler iki kez yapılmıştır. En yüksek konsantrasyon olan 200 mg/L çinko klorürde (solüsyon sertliği 100 mg/L CaCO_3 'da) embriyoların ilk saatler içinde PV'da bir miktar opak partikül oluşturdıkları ve genel olarak normal embriyolojik gelişimlerini tamamladıkları (Şekil 5E), ancak 72.saatten sonra hızla korion içinde öldükleri gözlenmiştir. Yine 200 mg/L çinko klorür konsantrasyonunda solüsyon sertliği 10 mg/L CaCO_3 'da yapılan testlerde ilk saatlerde blastomerler arasından sızan yoğun bir sıvının (Şekil 9) ardından blastoderm üzerindeki örtü tabakasının bütünlüğünü kaybettiği ve blastomerlerin bazılarının serbest hale geçtiği gözlenmiştir (Şekil 10). Bir süre sonra blastomerlerin opaklaşıp öldüğü ve yolk kesesinin bütünlüğünü katbettiği gözlenmiştir. Serbest hale geçen blastomerlerde veya diğer blastomerlerde segmentasyon görülmemiştir. Düşük konsantrasyonlarda ve yüksek solüsyon sertliklerinde blastomerler arasından sızan yoğun sıvının miktarının daha az olduğu ve ilerleyen saatlerde bu sıvının kümeler oluşturup opak partiküllere dönüştüğü gözlenmiştir. PV'da gözlenen opak partiküller blastula ve gastrula safhasından çıkışa (hatching) kadarki safhalarda gözlenmiş olup, düşük konsantrasyonlara doğru miktarı azalıp kaybolurken embriyoların canlı kalma süresinde de artma gözlenmiştir. Solüsyon sertliği 10 mg/L CaCO_3 olan testlerde embriyoların çinko klorüre çok daha hassas olduğu gözlenmiştir. 200 mg/L ZnCl_2 konsantrasyonunda 100 mg/L CaCO_3 'ta ilk 48 saat içinde canlılık çok yüksekken, 10 mg/L CaCO_3 'ta ilk saatler içinde blastomerler arasından yoğun bir sıvının sızmasının ardından yolk kesesinin bütünlüğünü kaybettiği ve embriyoların tamamının gastrula safhasına varmadan öldüğü gözlenmiştir.

Ayrıca 96 saatten sonra canlı kalan embriyolarda çıkışın geciktiği, yüksek konsantrasyonlarda çıkışın tamamen baskılandığı ve embriyoların koryon içinde öldüğü gözlenmiştir. Çıkıştan sonra veya koryon içinde ölen embryo ve larvalarda gözlenen anomaliler;

vertebra defekti, ödem ve hafif hemoraji şeklindeydi. Ödemin çıkıştan önce başladığı ve çıkışın geciktiği bazı embryolarda aşırı ödemle koryonun yırtıldığı gözlenmiştir. Anomali gösteren embryo ve larvalar kontrol grubundan farklı olarak yüzme bozukluğunda gösterdiği gözlenmiştir. Bu tip embryo ve larvaların genel olarak petrinin dibinde hareketsiz yattığı, ara sıra anormal bir şekilde hareket ettiği gözlenmiştir.

1.2 Kadmiyum Klorürle Yapılan Sınır Belirleyici Test Sonuçları

Sınır belirleyici testler çinko klorürde olduğu gibi yüksekte düşüğe değişik konsantrasyonlarda yapılmış olup, kadmiyum klorür için bu konsantrasyonlar; 100-80-40-20-10-5-1-0.5-0.3-0.1-0.05 mg/L'di. Solüsyon sertliği 100 mg/L CaCO_3 ve 10 mg/L CaCO_3 'a ayarlanarak testler iki kez tekrar edilmiştir. Çok yüksek konsantrasyonlarda (100 mg/L kadmiyum klorür) solüsyon sertliği 10 mg/L CaCO_3 'ta embryoların çoğunluğunun ilk saatler içinde öldüğü gözlenmiştir. Bu embryolarda da çinko klorürde PV'da gözlenen opak partiküller gözlenmiştir. Aynı şekilde başlangıçta blastomerler arasından yoğun bir sıvının sızdığı (Şekil 9) ve daha sonra blastomerlerin serbest hale geçtiği (Şekil 10) ve yoğun olan bu sıvının daha sonra kümeler oluşturarak opak partiküllere dönüştüğü gözlenmiştir. Opak partiküller blastula ve gastrula safhasındaki embryolarda daha çok blastoderm çevresinde ve animal yarı kürede yoğunlaştıkları gözlenmiştir. Bu opak partiküllere rağmen normal embriyolojik gelişimini tamamlamış bir embryo şekil 8G'de gösterilmiştir. Düşük konsantrasyonlara doğru çinko klorürde olduğu gibi PV'da gözlenen opak partiküller azalırken embryoların canlı kalma süresinde de artış gözlenmiştir. Yine çinko klorürde olduğu gibi yüksek konsantrasyonlarda 96. saatten sonra canlı kalan embryolarda çıkışın geciktiği ve koryon içinde ölümün meydana geldiği gözlenmiştir. Çıkıştan sonra veya koryon içinde ölen embryo ve larvalarda gözlenen anomaliler; vertebra defekti, ödem ve hemorajik alanlardı. Anomali gösteren embryo ve larvalarda yüzme bozukluğu gözlenmiştir.

Solüsyon sertliği 10 mg/L CaCO_3 olan testlerde embryoların çinko klorürde olduğu gibi kadmiyum klorüre çok daha hassas olduğu gözlenmiştir. Bu sertlikte 100 mg/L kadmiyum klorürle yapılan testlerde embryoların ilk saatler içinde öldüğü, solüsyon sentriliğinin 100 mg/L CaCO_3 olduğu aynı kadmiyum klorür konsantrasyonunda yapılan testlerde ise canlılığın 24 saat kadar devam ettiği gözlenmiştir.

2. Ana Test Sonuçları

2.1 Çinko Klorürle Yapılan Ana Test Sonuçları

Çinko klorürle beş ayrı konsantrasyonda Zebrafalığı'nın blastula safhasındaki embriyoları kullanılarak yapılan 15 günlük testlerin doz-yanıt verileri Tablo III'de verilmiştir.

Tablo III. Çinko klorür kullanılarak Zebrafalığı embriyoları ile 15 günlük embryo-larva testinden elde edilen doz-yanıt verileri.

Test No	Çinko klorür Konsant. (mg/L)	Embryo Sayısı	Finalde Canlı %	Finalde Ölüm %	Anomali %	Anomali Tipleri
1	Kontrol	30	96.6 (29)	3.3 (1)	-	-
	0.1	30	100.0 (30)	-	-	-
	0.5	30	96.6 (29)	3.3 (1)	3.3 (1)	Ödem
	1.0*	30	40.0 (12)	60.0 (18)	43.3 (13)	Ödem, vertebra defekti.
	5.0*	30	13.3 (4)	86.6 (26)	76.6 (23)	Ödem, vertebra defekti.
	10.0*	30	-	100.0 (30)	100.0 (30)	Ödem, vertebra defekti.
2	Kontrol	30	100.0 (30)	-	-	-
	0.1	30	100.0 (30)	-	-	Ödem
	0.5	30	93.3 (28)	6.6 (2)	6.6 (2)	Ödem, vertebra defekti.
	1.0*	30	43.3 (13)	56.6 (17)	36.6 (11)	Ödem, vertebra defekti.
	5.0*	30	10.0 (3)	90.0 (27)	63.3 (19)	Ödem, vertebra defekti.
	10.0*	30	-	100.0 (30)	100.0 (30)	
3	Kontrol	30	100.0 (30)	-	-	-
	0.1	30	100.0 (30)	-	3.3 (1)	Hafif vertebra defekti
	0.5	30	100.0 (30)	-	-	-
	1.0*	30	56.6 (17)	43.3 (13)	40.0 (12)	Ödem, vertebra defekti.
	5.0*	30	6.6 (2)	93.3 (28)	76.6 (23)	Ödem, vertebra defekti.
	10.0*	30	-	100.0 (30)	100.0 (30)	Ödem, vertebra defekti.
4	Kontrol	30	96.6 (29)	3.3 (1)	3.3 (1)	Vertebra defekti
	0.1	30	100.0 (30)	-	-	-
	0.5	30	100.0 (30)	-	-	-
	1.0*	30	60.0 (18)	40.0 (12)	36.6 (11)	Ödem, vertebra defekti.
	5.0*	30	13.3 (4)	86.6 (26)	76.6 (23)	Ödem, vertebra defekti.
	10.0*	30	-	100.0 (30)	100.0 (30)	Ödem, vertebra defekti.
5	Kontrol	30	100.0 (30)	-	-	-
	0.1	30	96.6 (29)	3.3 (1)	-	-
	0.5	30	93.3 (28)	6.6 (2)	6.6 (2)	Ödem
	1.0*	30	53.3 (16)	46.6 (14)	40.0 (13)	Ödem, vertebra defekti.
	5.0*	30	10.0 (3)	90.0 (27)	83.3 (25)	Ödem, vertebra defekti.
	10.0*	30	-	100.0 (30)	100.0 (30)	Ödem, vertebra defekti.

(*) $p < 0.01$, kontrol grubu ile 1.0-5.0-10.0 mg/L çinko klorür konsantrasyonları arasında finalde ölüm yüzdesi yönünden anlamlı fark bulunmuştur (Parantez içindeki sayılar finalde canlı, finalde ölüm ve anomali sayılarını göstermektedir).



ÇİNKO KLORÜR KONSANTRASYONU (mg/L)

Sekil 4. Beş farklı konsantrasyonda çinko klorürle yapılan testlerde finalde ölüm yüzdelерinin karşılaştırılması.

Kontrol grubu ile 0.1-0.5 mg/L çinko klorür konsantrasyonlarında yapılan test sonuçları finalde ölüm yüzdesi yönünden karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). Buna karşılık finalde ölüm yüzdesi yönünden kontrol grubu ile 1.0 mg/L çinko klorür konsantrasyonu karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($\chi^2 = 14.38$, $p < 0.01$). Ayrıca kontrol grubu ile 5.0-10.0 mg/L çinko klorür konsantrasyonlarındaki finalde ölüm yüzdesi karşılaştırıldığında da aralarında anlamlı farklar olduğu bulunmuştur (sırası ile $\chi^2 = 16.00$, $p < 0.01$; $\chi^2 = 14.81$, $p < 0.01$).

Gözlenen anomaliler; ödem ve vertebra defekti olup, bazı embryo ve larvalar bu anomalilerin her ikisini birden gösterdiği gibi bazıları yalnız ödemli veya vertebra defektliydi (Şekil 5). Çok ender de olsa hafif hemorajisi olan embryolarda gözlenmiştir. Ancak hemoraji çok yüksek konsantrasyonlarda gözlenmiş olup çok bariz değildi. Çinko klorür koryondan çıkışı geciktirdiği için bazı embryoların vertebra defekli olup olmadıklarını görmek mümkün olmadı.



Şekil 5. Çinko klorürle temas eden embryolarda görülen anomaliler; A-C-D-F. Vertebra defekli ve ödemli embryolar, B. Vertebra defekli embryo, E. PV'da opak partiküller.

Kuyruk bölgesindeki anomaliler ve ödem koryon içindeyken gözlenebildiği halde; kyphosis, lordoscoliosis ve scoliosis gibi vertebra defektleri embryo veya larva koryon içindeyken görülemedi. Çünkü 1.0 mg/L çinko klorür ve daha yüksek konsantrasyonlarda koryondan çıkış geciktiği gibi bazen tamamen baskılanmış ve koryon içi ölüm meydana gelmiştir. Tablo III'deki finalde ölüm yüzdeleri ve anomali yüzdeleri sütunları incelendiğinde 1 nolu testteki yüzdelerin aynı olmadığı görülmüştür. Örneğin; 1.0 mg/L çinko klorür konsantrasyonunda finalde ölüm yüzdesi 60.0, anomali yüzdesi 43.3'tür. Bu fark makroskobik olarak hiçbir anomali göstermeyen embryo ve larvaların ölümünden kaynaklanmaktadır. Benzer sonuçlar Tablo VI'da da görülebilir.

Her test için probit analizi ile bulunan ve % 95 güvenlik sınırları içinde kalan LC_{50} değerleri Tablo IV'de verilmiştir. Ortalama LC_{50} değeri 1.36 mg/L çinko klorür (tek başına çinko iyonu için 0.65 mg/L) olarak bulunmuştur.

Tablo IV. Çinko klorür için % 95 güvenlik sınırları içinde kalan LC_{50} değerleri.

Test No	LC_{50} Değerleri	% 95 Güvenlik Sınırları
1	1.275	0.791-2.076
2	1.213	0.751-1.975
3	1.447	0.894-2.362
4	1.639	1.010-2.679
5	1.254	0.777-2.044
Ortalama	1.363	0.844-2.227

Çinko klorürün koryondan çıkış zamanı üzerine de etkili olduğu bulunmuş olup; kontrol grubu embriyoların günlere göre çıkış sayılarına bakıldığında, kontrol grubundaki embriyoların tamamının en geç 6.güne kadar çıkışlarını tamamladıkları, ancak 1 mg/L çinko klorür konsantrasyondaki embriyoların çıkışının 12.güne kadar uzadığı ve ayrıca embriyoların tamamının koryondan çıkmadığı gözlenmiştir (Tablo V).

Tablo V. Kadmiyum klorür ve çinko klorür için 1.0 mg/L konsantrasyonda günlere göre koryondan çıkış sayısı (n=30).

Test No	Madde Konsant. (mg/L)	Günler												
		3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.
1	Kontrol	1	25	28	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.0 CdCl ₂	-	-	21	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.0 ZnCl ₂	-	-	-	-	2	6	9	11	12*	-	-	-	-
2	Kontrol	-	28	29	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.0 CdCl ₂	-	1	14	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.0 ZnCl ₂	-	1	2	-	5	-	-	6	-	13*	-	-	-
3	Kontrol	-	27	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.0 CdCl ₂	-	15	10	27	30	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.0 ZnCl ₂	-	-	-	-	-	2	8	11	14	17*	-	-	-
4	Kontrol	-	24	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.0 CdCl ₂	-	2	15	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.0 ZnCl ₂	-	-	-	3	-	4	-	11	14	18*	-	-	-
5	Kontrol	1	27	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.0 CdCl ₂	-	6	14	27	28	29	-	-	-	-	-	-	-
	1.0 ZnCl ₂	-	-	-	4	11	13	-	16*	-	-	-	-	-

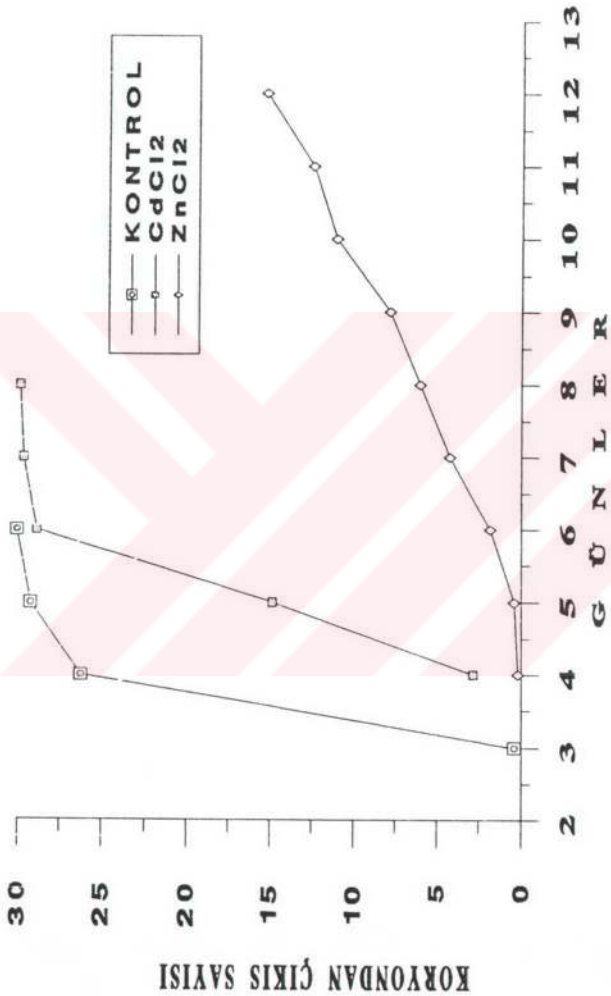
(*) Bu sayılardan sonraki embryolar koryondan hiç çıkamamışlardır.

2.2 Kadmiyum Klorürle Yapılan Ana Test Sonuçları

Kadmiyum klorürle altı ayrı konsantrasyonda Zebrabalgı'nın blastula safhasındaki embryoları kullanılarak yapılan 15 günlük testlerin doz-yanıt verileri Tablo VI'de verilmiştir.

Kontrol grubu ile 0.05 mg/L kadmiyum klorür konsantrasyonda yapılan test sonuçları finalde ölüm yüzdesi yönünden karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$).

Kontrol grubu ile 0.1 mg/L kadmiyum klorür konsantrasyonda yapılan test sonuçları yine finalde ölüm yüzdesi yönünden karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark olduğu bulunmuştur ($\chi^2 = 12.90$, $p < 0.05$). Aynı şekilde kontrol grubu ile 0.3-0.5-1.0-5.0 mg/L kadmiyum klorür konsantrasyonlarındaki finalde ölüm yüzdesi karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farklar olduğu bulunmuştur (sırasıyla $\chi^2 = 16.45$, $p < 0.01$; $\chi^2 = 19.72$, $p < 0.001$; $\chi^2 = 20.48$, $p < 0.001$).



Sekil 6. Kadmium klorür ve çinko klorür için 1.0 mg/L konsantrasyonda günler göre koryondan çıkış sayılarının kontrol ile karşılaştırılması.

Tablo VI. Kadmiyum klorür kullanılarak Zehrabalığı embryoları ile 15 günlük embryo-larva testinden elde edilen doz-yanıt verileri.

Test No	Kadmiyum Klorür Konsant. (mg/L)	Embryo Sayısı	Finalde Canlı %	Finalde Ölüm %	Anomali %	Anomali tipleri
1	Kontrol	30	100.0 (30)	-	-	-
	0.05	30	100.0 (30)	-	-	-
	0.1*	30	90.0 (27)	10.0 (3)	10.0 (3)	Vertebra defekti.
	0.3**	30	46.6 (14)	53.3 (16)	50.0 (15)	Ödem, vertebra defekti, hemoraji.
	0.5**	30	13.3 (4)	86.6 (26)	86.6 (26)	Ödem, vertebra defekti, hemoraji.
	1.0**	30	3.3 (1)	96.6 (29)	96.6 (29)	Ödem, vertebra defekti, hemoraji, kraniyofasiyal defekt.
	5.0**	30	-	100.0 (30)	100.0 (30)	Ödem, vertebra defekti, hemoraji, kraniyofasiyal defekt.
2	Kontrol	30	100.0 (30)	-	-	-
	0.05	30	100.0 (30)	-	-	-
	0.1*	30	93.3 (28)	6.6 (2)	6.6 (2)	Vertebra defekti.
	0.3**	30	30.0 (9)	70.0 (21)	73.3 (22)	Ödem, vertebra defekti, hemoraji.
	0.5**	30	16.6 (5)	83.3 (25)	83.3 (25)	Ödem, vertebra defekti, hemoraji, kraniyofasiyal defekt.
	1.0**	30	3.3 (1)	96.6 (29)	93.3 (28)	Ödem, vertebra defekti, hemoraji, kraniyofasiyal defekt.
	5.0**	30	-	100.0 (30)	100.0 (30)	Ödem, vertebra defekti, hemoraji, kraniyofasiyal defekt.
3	Kontrol	30	100.0 (30)	-	-	-
	0.05	30	100.0 (30)	-	-	-
	0.1*	30	93.3 (28)	6.6 (2)	6.6 (2)	Vertebra defekti.
	0.3**	30	36.6 (11)	63.3 (19)	53.3 (16)	Ödem, vertebra defekti, hemoraji.
	0.5**	30	10.0 (3)	90.0 (27)	90.0 (27)	Ödem, vertebra defekti, hemoraji, kraniyofasiyal defekt.
	1.0**	30	3.3 (1)	96.6 (29)	96.6 (29)	Ödem, vertebra defekti, hemoraji, kraniyofasiyal defekt.
	5.0**	30	-	100.0 (30)	100.0 (30)	Ödem, vertebra defekti, hemoraji, kraniyofasiyal defekt.
4	Kontrol	30	100.0 (30)	-	-	-
	0.05	30	100.0 (30)	-	-	-
	0.1*	30	90.0 (27)	10.0 (3)	6.6 (2)	Vertebra defekti.
	0.3**	30	53.3 (16)	46.6 (14)	36.6 (11)	Ödem, vertebra defekti, hemoraji.
	0.5**	30	16.6 (5)	83.3 (25)	70.0 (21)	Ödem, vertebra defekti, hemoraji, kraniyofasiyal defekt.
	1.0**	30	6.6 (2)	93.3 (28)	90.0 (27)	Ödem, vertebra defekti, hemoraji, kraniyofasiyal defekt.
	5.0**	30	-	100.0 (30)	100.0 (30)	Ödem, vertebra defekti, hemoraji, kraniyofasiyal defekt.
5	Kontrol	30	100.0 (30)	-	-	-
	0.05	30	96.6 (29)	3.3 (1)	3.3 (1)	Kraniyofasiyal defekt.
	0.1*	30	93.3 (28)	6.6 (2)	3.3 (1)	Vertebra defekti.
	0.3**	30	33.3 (10)	66.6 (20)	56.6 (17)	Ödem, vertebra defekti, hemoraji.
	0.5**	30	16.6 (5)	83.3 (25)	86.6 (26)	Ödem, vertebra defekti, hemoraji, kraniyofasiyal defekt.
	1.0**	30	10.0 (3)	90.0 (27)	96.6 (29)	Ödem, vertebra defekti, hemoraji, kraniyofasiyal defekt.
	5.0**	30	-	100.0 (30)	100.0 (30)	Ödem, vertebra defekti, hemoraji, kraniyofasiyal defekt.

(*) $p < 0.05$ kontrol grubu ile 0.1 mg/L'de, (**) $p < 0.01$ ise 0.3-0.5-1.0-5.0 mg/L kadmiyum klorür konsantrasyonları arasında finalde ölüm yüzdesi yönünden anlamlı fark bulunmuştur (Parantez içindeki sayılar finalde canlı, finalde ölüm ve anomali sayılarını göstermektedir).



Sekil 7. Altı farklı konsantrasyonda kadmium klorür ile yapılan testlerde finalde ölüm yüzdelerinin karşılaştırılması.

Gözlenen anomaliler; ödem, vertebra defekti, hemoraji ve nadiren kraniofasial defekt olup, bazı embryo ve larvalar bu anomalilerin bir kaçını birarada gösterdiği gibi bazıları yalnız ödemli veya vertebra defektliydi (Şekil 8). Ödem çeşitli şekillerde olup, genellikle perikardiyal ve peritoneal ödem tarzında olduğu, kafa ve göz çevresinde de meydana geldiği gözlenmiştir. Vertebra defektleri de çeşitli şekillerdeydi (kyphosis, lordoscoliosis, scoliosis gibi). Hemoraji daha çok baş ve gövde bölgesinde gözlenmiştir (Şekil 8D-8H).



Şekil 8. Kadmiyum klorürle temas eden embryolarda görülen anomaliler; A. Aşırı ödemli embryo, B-C. Ödem ve vertebra defektli embryolar, D. Hemoraji, ödem ve vertebra defektli embryo, E. Aşırı ödemle koryonu yırtan bir embryo, F. Vertebra defektli embryo, G. PV'da opak partiküller, H. Hemorajik alan.

Her test için probit analizi ile bulunan ve % 95 güvenlik sınırları arasında kalan LC_{50} değerleri Tablo VI'da verilmiştir. Ortalama LC_{50} değeri 0.36 mg/L kadmiyum klorür (tek başına kadmiyum iyonu için 0.22 mg/L) olarak bulunmuştur.

Tablo VII. Kadmiyum klorür için % 95 güvenlik sınırları içinde kalan LC₅₀ değerleri.

Test No	LC ₅₀ Değerleri	% 95 Güvenlik Sınırları
1	0.360	0.181-0.552
2	0.339	0.161-0.528
3	0.338	0.160-0.527
4	0.395	0.215-0.591
5	0.362	0.183-0.554
Ortalama	0.358	0.180-0.550

Kadmiyum klorüründe çinko klorür gibi koryondan çıkış zamanı üzerine etkili olduğu buldu. Kontrol grubu embriyoları ile 1.0 mg/L kadmiyum klorür konsantrasyonundaki embriyolar günlere göre koryondan çıkış yönünden karşılaştırıldığında, 1.0 mg/L kadmiyum klorür konsantrasyonundaki embriyoların % 99'unun koryondan çıktığı ve geç 8.güne kadar çıkışların tamamlandığı gözlenmiştir (Şekil 6). Ayrıca 1.0 mg/L çinko klorür konsantrasyonundaki embriyoların koryondan çıkış zamanının 1.0 mg/L kadmiyum klorür konsantrasyonundaki embriyolardan çok daha geç olduğu Şekil 6. ve Tablo V'de görülmektedir.

2.3 Çinko Klorür ve Kadmiyum Klorürün Beraber Bulunduğu Solüsyonlarla Yapılan Test Sonuçları

Çinko klorür ve kadmiyum klorürün üç değişik konsantrasyon kombinasyonu ile yapılan test sonuçları Tablo VIII'de verilmiştir.

Kadmiyum klorürün 0.5 mg/L konsantrasyonunda meydana gelen ölümler üzerinde çinko klorürün koruyucu yönde bir etkisinin olup olmadığını görmek amacıyla yapılan testlerde, çinko klorürün üç farklı konsantrasyonu kullanılmıştır. Kadmiyum klorürün tek başına bulunduğu 0.5 mg/L konsantrasyonundaki solüsyonlarla yapılan test sonuçlarına göre ortaya çıkan ölüm yüzdesi, çinko klorür ve kadmiyum klorürün beraber bulunduğu solüsyonlarla yapılan test sonuçlarına göre ortaya çıkan ölüm yüzdeleriyle karşılaştırıldı. Her üç farklı konsantrasyon kombinasyonu ile 0.5 mg/L kadmiyum klorür konsantrasyonundaki embriyolarda gözlenen ölüm yüzdeleri bakımından anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.05$).

Tablo VIII. Kadmiyum klorür ve çinko klorürün beraber bulunduğu solüsyonlarla Zehrabalığı embryoları kullanılarak yapılan 15 günlük embryo-larva testinden elde edilen doz-yanıt verileri.

Test No	CdCl ₂ +ZnCl ₂ Konsant. (mg/L)	Embryo Sayısı	Finalde Canlı %	Anomali %
1	Kontrol	30	100.0 (30)	-
	0.5+1.0	30	3.3 (1)	96.6 (29)
	0.5+0.5	30	13.3 (4)	86.6 (26)
	0.5+0.1	30	10.0 (3)	90.0 (27)
	0.5	30	13.3 (4)	86.6 (26)
2	Kontrol	30	100.0 (30)	-
	0.5+1.0	30	6.6 (2)	93.3 (28)
	0.5+0.5	30	13.3 (4)	86.6 (26)
	0.5+0.1	30	16.6 (5)	83.3 (25)
	0.5	30	10.0 (3)	90.0 (27)
3	Kontrol	30	96.6 (29)	3.3 (1)
	0.5+1.0	30	3.3 (1)	96.6 (29)
	0.5+0.5	30	10.0 (3)	90.0 (27)
	0.5+0.1	30	6.6 (2)	93.3 (28)
	0.5	30	3.3 (1)	96.6 (29)
4	Kontrol	30	100.0 (30)	-
	0.5+1.0	30	10.0 (3)	90.0 (27)
	0.5+0.5	30	10.0 (3)	90.0 (27)
	0.5+0.1	30	6.6 (2)	93.3 (28)
	0.5	30	6.6 (2)	93.3 (28)
5	Kontrol	30	96.6 (29)	3.3 (1)
	0.5+1.0	30	-	100.0 (30)
	0.5+0.5	30	10.0 (3)	90.0 (27)
	0.5+0.1	30	6.6 (2)	93.3 (28)
	0.5	30	13.3 (4)	86.6 (26)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada göz önüne alınan hususlar toksikan olarak kullanılan çinko klorür ve kadmiyum klorür için LC_{50} değerlerinin ve heriki maddenin Zebrabalığı'nın embriyolojik gelişimi üzerinde oluşturabileceği anomalilerin belirlenmesidir. Burada dikkat edilen ana noktalar; (a) testin azami süresi olup koryondan çıkışın heriki maddenin varlığında uzaması nedeniyle 15 gün olarak saptanmıştır; (b) kontrol grubu ile test gruplarının sürvisi üzerine; (c) koryondan çıkış süresi üzerine heriki maddenin etkisidir.

Bu test sisteminde uygulanan standart işlem, test maddelerinin etkin doz düzeylerini saptamak için önce bir sınır belirleyici test yapılması ve bunu sınır belirleyici test ile belirlenmiş aralık içinde kalan 5-6 farklı konsantrasyondan oluşan ana testin izlemesidir.

Çinko klorür ve kadmiyum klorürle yapılan sınır belirleyici testlerde çok yüksek konsantrasyonlarda PV'da gözlenen opak partiküller literatür bilgileriyle uyumludur (10). Opak partiküller oluşmadan önce blastomerler arasından sızan yoğun bir sıvının (Şekil 9) ardından blastomerlerin blastoderm üzerinde serbest hale geçmesi (Şekil 10) ve faz-kontrast mikroskobu ile yapılan incelemelerde bu sıvının sızmasından sonra blastomerlerin bütünlüğünde ve büyüklüğünde bir değişikliğin olmaması bize bu yoğun sıvının ekstraselüler matriksi olabileceğini düşündürdü. Bu yoğun sıvının miktarının çok fazla olduğu durumlarda serbest hale geçen blastomerlerin opaklaşarak öldüğü ve gastrulasyonun tamamen baskılandığı gözlenmiştir.

Hücre yüzeyi kompleks bir yapıya sahiptir ve hücre dışı ajanlara karşı özgül reseptörler taşır. Bu tür reseptörlerin mevcudiyetini gösteren bir durumu hücrelerarasında işbirliği kurulmasında görülmektedir. Bir embryonun çeşitli organlarının hücreleri birbirinden ayrıldıktan sonra (ortamdaki Ca^{2+} miktarı azaltılırsa hücreler birbirinden ayrılırlar) çeşitli organlara ait hücreleri karıştırırsak, birbiri ile temasa geldiklerinde aynı organa ait hücreler birbirini tanırlar ve her organa ait hücreler ayrı kümeler teşkil ederler (33).

Hücreler arası ulaşım bölgesinin teşekkülü ve geçirgenliği bazı faktörlere bağlıdır. Bu faktörler şunlardır;

1. Kalsiyum iyonlarının intraselüler ve ekstraselüler konsantrasyonu. Normal olarak hücre içinde Ca^{2+} konsantrasyonu hücre dışı sıvıdakiye kıyasla çok düşüktür. Hücre içine kalsiyum iyonları enjekte edilirse veya hücre dışındaki kalsiyum iyonları konsantrasyonu düşürülürse hücrelerarası ulaşım bölgelerinin permeabilitesi kaybolur.

2. Hücreleri birbirine bağlayan faktörler;

a. Hücre yüzeyinde glikoprotein tabiatında bir maddenin mevcut olması.

b. Hücre dışında belirli bir konsantrasyonda Ca^{2+} ve Mg^{2+} bulunmasıdır.

Hücrelerarası ulaşım bölgeleri, hücre büyümesi ve differansiyasyonunu kontrol eden maddelerin hücreden hücreye geçmesini sağlayan bir yoldur. Eksperimental embriyolojinin yıllardır ima ettiği bir hakikat vardır ki bu, embryoda farklılaşma için moleküllerin hücreden hücreye diffüzyonunu sağlayan sıkı bir bağlantının mevcut olması gerektiği idi (33).

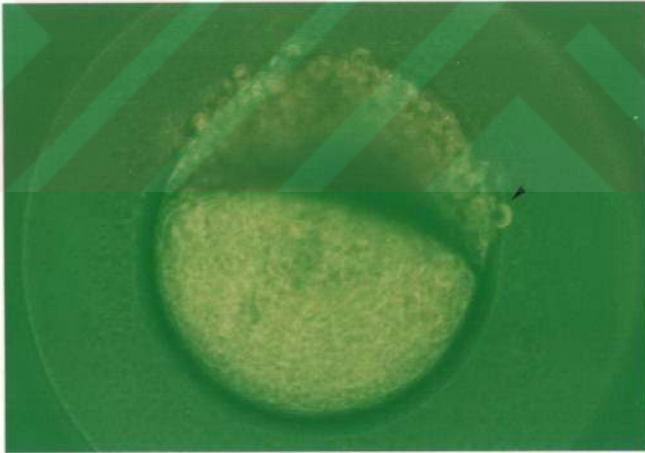
Ayrıca kadmiyumun Ca^{2+} kanal blokeri olması (26), kalsiyum iyonunda hücre adezyonu ve hücre iskeletinin idemesi için hayati öneme sahip olması (52) gibi bilgiler, yüksek konsantrasyonlardaki kadmiyum klorürle muamele edilen blastula safhasındaki embryolarda gözlediğimiz durumun, ekstraselüler ortamdaki Ca^{2+} 'la yarışacak kadmiyum iyonlarına bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Aynı durumun çinko klorürün yüksek konsantrasyonlarında da gözlenmesi, kadmiyum, kalsiyum ve çinko iyonları arasındaki benzerlik nedeniyle olabilir. Bu konunun aydınlatılmasında elektron mikroskobu ile yapılacak incelemeler daha faydalı olabilir.

Ancak kadmiyum klorürle yapılan testlerde bu durumun gözleendiği konsantrasyonun çinko klorür konsantrasyonundan iki üç kat daha düşük olması kadmiyum klorürün çinko klorürden daha toksik olduğunu düşündürmektedir.

Çinko klorürle yapılan test sonuçlarına göre; çinko klorür daha çok koryondan çıkış zamanı üzerine etkili olup; aynı konsantrasyonda kadmiyum klorürle yapılan test sonuçları karşılaştırıldığında (Tablo V), çinko klorürün koryondan çıkış zamanı üzerine kadmiyum klorürden daha etkili olduğu bulunmuştur. Çinko klorürle ilgili olan bu bulgu literatür bilgisi ile uyumludur (10).



Şekil 9. Çok yüksek konsantrasyonlardaki kadmiyum klorür ve çinko klorürle temas eden blastula safhasındaki Zebra balığı embryolarında blastomerler arasından sızan yoğun sıvı (3.3x10, mavi filtre, faz-kontrast mikroskop).



Şekil 10. Çok yüksek konsantrasyonlardaki kadmiyum klorür ve çinko klorürle temas eden blastula safhasındaki Zebra balığı embryolarında blastomerlerin blastoderminden ayrılmaya başlaması (3.3x10, sarı filtre, faz-kontrast mikroskop).

Koryondan çıkış zamanı üzerine çinkonun geciktirici yöndeki bu etkisinin, koryondan çıkış sonrası çıplak kalacak embryonun maddeyle temasını geciktirmeye ve onu korumaya yönelik veya toksikan tarafından indüklenen muhtemel osmoregülatör bir karışıklığa karşı embryonun perivitellin sıvı ve koryon tarafından korunmasına yönelik bir mekanizmadan kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (10). Çinkonun 100'den fazla enzimin kofaktörü olması, DNA replikasyonu, transkripsiyonu ile ilgili enzimlerin çoğunun çinko metalloenzimler olması (1) ve çinkonun teratojenisitesinin işlergesindeki en olası açıklamalardan birinin DNA sentezinin aşırı miktardaki çinko varlığında veya çinko eksikliğinde inhibisyona uğraması (12), bize çinkonun embryonun koryondan çıkabilmesi için gerekli olan hatching (çıkış) enziminin (29) sentezinde veya çalışmasında bir inhibisyona neden olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca vertebra defektli ve ödemli olan embryolarda müsküler aktivitedeki azalmanın da gözönünde tutulması gerekir. Çünkü koryondan çıkışta kuyruğun koryona yapacağı vuruş darbeleride gereklidir.

Kadmiyum klorürle yapılan test sonuçlarına göre; koryondan çıkış zamanı üzerine kadmiyum klorür çinko klorür kadar olmasada yine geciktirici bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Kadmiyum klorürün koryondan çıkışı geciktirmesi yine çinko klorürdekine benzer nedenlere bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Çinko klorür ve kadmiyum klorürle yapılan testlerde embryolarda gözlenen anomaliler; kadmiyum klorürde gözlenen hemorajik alanların fazlalığı dışında aynıydı. Ortak anomaliler, ödem ve vertebra defektli olup, ödemli embryo ve larvalarda genellikle vasküler sirkülasyonda düzensizlik ve durgunluk gözlenmiştir.

Kadmiyum klorürle yapılan testlerde gözlenen hemorajik alanların küçük kan damarlarında meydana gelen endotelial harabiyete bağlı olabileceği düşünülmektedir. Çünkü laboratuvar memelileriyle yapılan in vitro testlerde yüksek konsantrasyonlarda kadmiyum injeksiyonundan kısa bir süre sonra periferik sinir sisteminin ve testislerin küçük kan damarlarında endotelial harabiyetlerin meydana geldiği gözlenmiştir. Ayrıca tek bir kadmiyum injeksiyonuyla puberte öncesindeki sıçanlarda ovaryumlarda ve testislerde hemorajiler ve nekrozlar meydana getirilmiştir. Küçük damarlarda meydana gelen bu harabiyet sonucu kapiller permeabilitede bir artış ve buna bağlı sıvıların ve kan plazma maddelerinin vasküler kaşışına bağlı ödem, iskemi ve artan kapiller kan akımına bağlı

olarakta testiküler hücre nekrozu görülmüştür. Ayrıca gebe farelerde kadmiyum verilmesinden sonra plasental kanama ve fetal ölümlerin meydana geldiği gözlenmiştir (48).

Dana aortik düz kas hücre kültüründe GAG değişiklikleri konusunda yapılan araştırmalar; kadmiyumun sitotoksik etkisine bir cevap olarak vasküler düz kas hücrelerinde GAG sentezinin arttığını ancak bunların sülfatlanmasının azaldığını göstermiştir. Bu çalışma kadmiyum, bismut, kobalt, bakır, kurşun, mangenez, nikel ve çinko ile yapılmış olup yalnız kadmiyumun bu etkiyi gösterdiği bulunmuştur. Benzer değişiklikler insan aortik düz kas hücrelerinde de görülmüştür. Kadmiyumun neden olduğu vasküler dokudaki harabiyete karşı bir defansif yanıt olarak gelişen bu olay, kadmiyumun metalle indüklenen aterosklerosisin bir komponenti olabileceğini göstermektedir (23). Testlerimizde gözlenen hemorajik alanların, belkide ateroskleroz gelişen embryolardaki kapillerlerin fragilitesindeki artışa bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Çinko klorür ve kadmiyum klorürle yapılan testlerde gözlenen ortak bir anomalide ödemdir. Bu bulguda literatür bilgisiyle uyumludur (6,12). Laboratuvar memelileri kullanılarak kadmiyumla yapılan çalışmalarda; kadmiyumun uzun sürede öncelikle böbrekler ve aynı zamanda karaciğer üzerinde, kan yapımında, immün sistemde, iskelet ve kardiyovasküler sistem üzerinde etkilere neden olduğu bulunmuştur (48).

Kedi ve sıçanlara yüksek oral dozlarda kadmiyumun bir kaç ay boyunca verilmesinden sonra renal lezyonlar olduğu ilk kez Prodan ve Wilson tarafından bildirilmiştir. Prodan bu lezyonların proksimal tübül epitelinde değişik derecelerde deskuamasyon şeklinde olduğunu bildirmiştir. Kronik kadmiyum zehirlenmesinde kritik bir organ olan böbrekte meydana gelen renal tübüler bozukluk nedeniyle genellikle proteinlerin, glükozun ve amino asitlerin reabsorpsiyonu bozulur. Buna bağlı olarak proteinüri, glükozüri ve aminoasitüri geliştiği gözlenmiştir (48). İdrarla protein kaybı plazma proteinlerinin karaciğer tarafından sentezlenme hızını aşabilir. Sonuçta gelişen hipoproteinemi onkotik basıncı düşürür ve dokularda ödem sıvısı birikirken plazma hacmi azalır (18).

Kadmiyum klorürle yapılan testlerimizde gözlenen ödemin nedeninin embryoların böbreklerinde meydana gelen benzer bir harabiyete bağlı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca kadmiyumun karaciğerde harabiyet yapması, kan basıncında değişikliklere neden olmasının da bu ödeme katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Hayvanlarda kadmiyumun hipertansiyona yol açtığına dair çok kesin veriler olmamakla beraber, kadmiyuma maruz kalmış işçilerden elde edilen sonuçlar vardır. Kadmiyuma maruz bırakılan bazı hayvanlarda kan basıncında artış ve miyokard üzerinde bazı etkiler gözlenmiştir. İçme suyunda 5.0 mg/L kadmiyum olan sıçanlarda miyokardda elektrokardiyografik ve biyokimyasal değişiklikler, miyokard fonksiyonlarında bozulma gözlenmiştir. Bu etkilerin, miyokardın yüksek enerjili fosfat stoğunun azalmasına bağlı olarak miyokardiyal kontraktilitenin azalmasıyla ilgili olabileceği görüşü hakimdir (48).

Her iki maddenin varlığında gözlenen anomalilerden biride vertebra defektiydi. Bu bulgularda literatür bilgisiyle uyumludur. Bu tür zararlara yol açacak muhtemel mekanizmalardan birinin kollajen sentezindeki inhibisyona bağlı olarak erken vertebral gelişme evresinde skleretomların defektli gelişmesinin sonucu olabileceği ileri sürülmektedir (5).

Embryonik tavuk femuru kullanılarak kadmiyum ve çinkoyla yapılan bir kültür sisteminde, aşırı miktardaki çinkonun kalsifikasyon üzerinde inhibitör etkiye sahip olmasına rağmen, kadmiyumun neden olduğu matriks formasyonundaki azalmayı da önlediği gösterilmiştir. Çinko ve kadmiyumun tavuk femur kültüründe indüklediği değişikliklerin osteomalacia, kemik mineralizasyonunda azalma, matriks formasyonunun suprese olması veya olmaması gibi değişikliklerden ibaret olduğu gösterilmiştir (23).

Muhtemel oluşum nedenleriyle açıklamaya çalıştığımız bu tür anomalileri gösteren embryo ve larvaların tamamına yakını ölmüştür. Ayrıca çok az sayıda da olsa makroskobik olarak hiçbir anomali göstermeyen embryo ve larvalarında öldüğü görülmüştür. Yine çok hafif anomalisi olan bazı embryo ve larvalarında canlılığını sürdürdüğü görülmüştür.

Testlerimizi 15 gün süreyle yapmamızın nedeni yüksek konsantrasyonlarda geciken çıkışı beklemek, çıkışı geciken embryoların akıbetini ve ayrıca çıkış yapmış ancak anomalisi olan embryo ve larvaların beslenebilme yeteneğinde olup olmadıklarını görmektir.

Anomali gösteren embryo ve larvalarda meydana gelen ölümlerin muhtemel sebebinin (en azından 15 günlük zaman zarfında) larvaların yüzme yeteneklerinin bozukluğuna ve kaybına, ayrıca olfaktory yapılarında hassasiyet kaybına bağlı olarak beslenememeleri olabileceği düşünülmüştür. Çünkü larvalar hareketsiz olmalarına, ekstra ödemli veya ağır vertebra defektli olmalarına rağmen yolk keseleri tükeninceye kadar canlılığını

sürdürmüşlerdir. Yine çıkışı tamamen baskılanan koryon içindeki embryo ve larvalarda da kalp atışları yolk keselerinin tükendiği 13-14 ve 15.günlere doğru durmaya başlamıştır.

Çinko klorür için bulduğumuz LC_{50} değeri ortalama olarak 1.36 mg/L'dir (tek başına çinko iyonu için 0.65 mg/L); kadmiyum klorür için LC_{50} ise, 0.36 mg/L'dir (tek başına kadmiyum iyonu için 0.22 mg/L). Bu değerler kadmiyum klorürün çinko klorürden çok daha toksik olduğunu göstermektedir. Alabalık embryolarıyla statik yenileme sistemi ile yapılan çalışmalarda kadmiyum için LC_{50} değeri 0.14 mg/L, çinko için ise, 1.12 mg/L olarak bulunmuştur (alabalık embryolarının koryondan çıkış süresi 24 gün olup bu testler çıkıştan sonra 4 gün daha sürdürülerek yapılmıştır), (5). *Fathead minnow*'la yapılan 8 günlük testlerde çinko için LC_{50} değeri ortalama olarak 0.04 mg/L olarak bulunmuştur (6). Yine aynı balıkla yapılan 6 günlük testlerde çinko için LC_{50} değeri 3.6 mg/L, kurbağa embryosu için 4 günlük testte LC_{50} değeri 34.5 mg/L olarak bulunmuştur (12).

Bu değerler test koşullarının, test süresinin ve kullanılan organizmanın türünün bulunacak LC_{50} değerleri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda 8.günden itibaren yumurta sarısı ile besleme yapılmıştır. Bu işlem kullandığımız testi kullanışsız kılmaktadır. Ancak testi yapacak kişilerin bu konuda yapacağı birkaç ön çalışma bu işlemin bazı noktalara dikkat edildiği takdirde tehlikeli olmadığını gösterecektir (dikkat edilecek noktalar materyal ve metodda anlatılmıştır).

KAYNAKLAR

1. Ahmad Y, Hamid AM: Zinc: A Trace Element, Potential of Which in Human Health and Disease has been Little Realised. Trace'89 (Eds Yüreğir G, Donma O, Kayrın L). Çukurova Üniversitesi Balcalı/Adana, Turkey, 1991, p:565-569.
2. Alpaz A: Akvaryum Tekniği ve Balıkları. Acargil Matbaası, İzmir, 1984, s:285-286.
3. Atlı M, Kunç Ş: Zn, Cu and Mg Determination in Body Fluids. Trace'89 (Eds Yüreğir G, Donma O, Kayrın L). Çukurova Üniversitesi Balcalı/Adana, Turkey, 1991, p:439-445.
4. Baskan Sağlıklı Yaşam, Ailenin Tıp Ansiklopedisi, Baskan Yayınları A.Ş., İstanbul, 1986, cilt:6, s:2085.
5. Birge WJ, Black JA, Westerman AG, Ramey BA: Fish and Amphibian Embryos-A Model Sytem for Evaluating Teratogenicity. **Fundam Appl Toxicol** 1983 3:237-242.
6. Birge WJ, Black JA, Westerman AG: Short-Term Fish and Amphibian Embryo-Larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. **Environ T Toxicol Chem** 1985 4:807-821.
7. Blumental S, Lewand D, Sochanik A, Krezoski S, Petering DH: Inhibition of Na(+)-glucose Cotransport in Kidney Cortical Cells by Cadmium and Copper: Protection by Zinc. **Toxicol-Appl-Pharmacol** 1994 Dec, 129(2):177-87.
8. Boztepe H: Anorganik Kimya. Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat-Kimya Bölümü Ders Kitabı, seri no:35, Adana, 1987, s:199-201.
9. Bruce HM: Üniversite Kimyası. Üçüncü Baskı. Çev: Şenvar C, Edgüer E. Hacettepe Vakıfları Meteksan Baskı İşletmesi, Ankara, 1978, s:277-278.
10. Dave G, Damgaard B, Grande M, Martelin JE, Rosander B, Viktor T: Ring Test of an Embryo-Larval Toxicity Test with Zebrafish Using Chromium and Zinc as Toxicants. **Environ Toxicol Chem** 1987 6:61-71.
11. Davis K, Schultz TW, Dumont J: Toxic and Teratojenik Effects of Selected Aromatic Amines on Embryos of the Amphibian *Xenopus leavis*. **Arch Environ Contam Toxicol** 1981 10:371-391.

12. Dawson DA, Stebler EF, Bruks SL, Bantle JA: Evaluation of the Developmental Toxicity of Metal- Contaminated Sediments Using Short-Term *Fathead minnow* and Frog Embryo-Larval Assay. **Environ Toxicol Chem** 1988 7:27-34.
13. Dial NA: Methylmercury: Teratogenic and Lethal Effects in Embryos. **Teratology** 1976 13:327-334.
14. Dreosti JE, Record JR, Manual SJ: Zinc Deficiency and the Developing Embryo. **Biol Trace Element Res** 1985 7:103-120.
15. Durham DM, Palmiter RD: Transcriptional Regulation of the Mouse Metallothionein-I Gene by Heavy Metals. **The Journal of Biological Chemistry** 1981 10:5712-5716.
16. Ferm VH, Carpenter SJ: Teratogenic Effect of Cadmium and its Inhibition by Zinc. **Nature** 1967 216:1123.
17. Fort DJ, Dawson DA, Bantle JA: Development of a Metabolic Activation System for the Frog Embryo Teratogenesis Assay: *Xenopus* (FETAX). **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis** 1988 8:251-263.
18. Ganong FW: Tıbbi Fizyoloji. Eds, Ayşe Doğan. p:674-675.
19. Hisoaka KK, Battle HI: Normal Developmental Stages of Zebrafish (*Brachydanio rerio*). **J Morph** 1958 102:311-328.
20. Huang PC, Smith B, Bohdan P, Corrigan A: Effect of Zinc on Cadmium Influx and Toxicity in Cultured CHO Cells. **Biological Trace Element Research** 1980 2:211-220.
21. Jackl GA, Kollmer WE, Reidel G: Influence of Diet on the Speciation of Cadmium in the Faeces of Rats. Trace'89 (Eds Yüreğir G, Donma O, Kayrın L). Çukurova University Balcalı/Adana, Turkey, 1991, p:303-308.
22. Janicki K: Drinking Water and Human Health. Trace'89 (Eds Yüreğir G, Donma O, Kayrın L). Çukurova University Balcalı/ Adana, Turkey, 1991, p:21-33.
23. Kaji T, Ohkawara S, Inada M, Yamamoto C, Sakamoto M, Kozuka H: Alteration of Glycosaminoglycans Induced by Cadmium in Cultured Vaskular Smooth Muscle Cells. **Arch Toxicol** 1994, 68(9):560-565.
24. Karp G, Berllil NJ: Development. Mc Graw-Hill Company United States of America 1976 4:92-130, 11:245-246.

25. Kimmel GL, Smith K, Kochar DM, Pratt RM: Overview of Teratogenicity Testing: Aspects of Validation and Application to Screening. *Teratogenesis Carcinog Mutagen* 1982 2:221-229.
26. Kline D, Jaffe LA, Kado RT: A Calcium-Activated Sodium Conductance Contributes to the Fertilization Potential in the Egg of the Nemertean Worm *Cerebratulus lacteus*. *Developmental Biology* 1986 117:184-193.
27. Kolonkaya D: Embryoloji. Hacettepe Üniversitesi Ders Notları. 1986, s:62-65.
28. Kuru M: Omurgalı Hayvanlar (Chordata) Sistematığı. Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları Ders Kitapları Dizisi:7. H.Ü Fen Fakültesi Basımevi, Beytepe/Ankara, 1978, s:46-66.
29. Laale HW: The Biology and Use of Zebrafish, *Brachydanio rerio* in Fisheries Research. *J Fish Biol* 1977 10:121-173.
30. McKim JM: Evaluation of Tests with Early Life Stages of Fish for Predicting Long-Term Toxicity. *J Fish Res Board Can* 1977 34:1148-1154.
31. Mert N, Antaplı M, Üren A, Tanrıverdi M: Plasma Zinc Copper and Manganese Levels of Infertile Flocks in the Marmara Region in Turkey. Trace'89 (Eds Yüreğir G, Donma O, Kayrın L). Çukurova University Balcalı/Adana, Turkey, 1991, p:593-596.
32. Michibata H: Effect of Water Hardness on the Toxicity of Cadmium to the Egg of the Teleost *Oryzias latipes*. *Bull Environm Contam Toxicol* 1981 27:187-192.
33. Noyan A: Fizyoloji. İkinci Baskı, Anadolu Üniversitesi Yayınları N:7, Ankara, 1980 s:27-28.
34. Piersma AH, Roelen B, Roest P, Haakmat-Hoesenne AS, Van Achterberg TAE, Mummery CL: Cadmium-Induced Inhibition of Proliferation and Differentiation of Embryonal Carcinoma Cells and Mechanistic Aspects of Protection by Zinc. *Teratology* 1993 48:335-341.
35. Record IR, Dreosti IE, Manuel SJ, Buckley RA: Interaction of Cadmium Chloride During the Fertilization Process and Its Effects on Pregnancy Outcome. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982 69:326-332.

36. Sabourin TD, Faulk RT, Goss LB: The Efficacy of Three Nonmammalian Test System in the Identification of Chemical Teratogens. *J Appl Toxicol* 1995 5:227-233.
37. SarıeYYüpoğlu M, Say H: Elazığ Şehir Kanalizasyonunun Keban Baraj Gölü'ne Döküldüğü Bölgeden Yakalanan *Barbus capito pectoralis*'de Ağır Metal Birikimleri Araştırması. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Sempozyumu, İzmir, Türkiye, 12-14 Kasım, 1991, s:121-130.
38. Schuler R, Hardin BD, Niemeier R: Drosophila as a Tool for the Rapid Assessment of Chemicals for Teratogenicity. *Teratogenesis Carcinog Mutagen* 1982 2:293-301.
39. Shaoyi Y: A Research Proposal of Making Living Models for Monitoring Environmental Pollution and Cultivating Genetic Improved Animals by Using Biotechnology. A Plan for 1995-1997. Dept. of Physiology. Faculty of Medicine, Çukurova University, Adana, Turkey, 1995, p:1-5.
40. Shaoyi Y: The Interactions Between Cell Nucleus and Cytoplasm as Revealed by Nuclear Transplantation in Fish. Institute of Developmental Biology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing, China, Unpublished book, p:24.
41. Şengül F: Endüstriyel Atıksuları Özellikleri ve Arıtılması. MMF/ÇEV-89 Ey 172, Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi, İzmir, 1989, s:5-39.
42. Taneli B, Kültürsay N, Başer A, Hakerlerler H: Zinc, Copper and Iron Alterations in Children with Rickets. Trace 89 (Eds Yüreğir G, Donma O, Kayrın L). Çukurova Üniversitesi Balcalı/Adana, Turkey, 1991, p:565-569.
43. Tekşen F, Şaylı BS: Zinc and Copper Levels in Reproductive and Non-Reproductive Tissues of Male Rats at Various Stages of Life. Trace'89 (Eds Yüreğir G, Donma O, Kayrın L). Çukurova University Balcalı/Adana, Turkey, 1991, p:533-537.
44. Uslu O, Türkman A: Su Kirliliği ve Kontrolü. T.C Başbakanlık Çevre Genel Müdürlüğü Yayınları Eğitim Dizisi 1, İzmir, 1987, s:97-100.
45. Varlık B, Uysal H: *Mytilus galloprovincialis lamarck*'ın Farklı Gelişim Safhalarında Bazı Ağır-Metallerin (Cd, Pd) Toksik Etkilerinin Araştırılması. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Sempozyumu, İzmir, Türkiye, 12-14 Kasım, 1991, p:496-502.

46. Warner CW, Sadler TW, Tulis SA, Smith MK: Zinc Amelioration of Cadmium-Induced Teratogenesis In Vitro. *Teratology* 1984 30:47-53.
47. Wasowicz W, Gromadzinska J, Skalodowska M, Popadiuk S, Kantorski J: Selenium and Zinc Concentrations in Erythrocytes of Children with Wilms' Tumour. *Trace'89* (Eds Yüreğir G, Donma O, Kayrın L). Çukurova University Balcalı/Adana, Turkey, 1991, p:179-181.
48. WHO. Cadmium. 1992, p:19.
49. WHO. Our Planet Our World. 1992, p:19.
50. William WS: Cadmium-Induced Fetal Growth Retardation in the Mouse . *Archives of Environmental Health*, 1978, p:36-42.
51. Yaşar B, Karahüseyinoğlu E, İhtiyar E, Paşaoğlu E, Batum S, Yüce K, Çetin C, Polat L, Kiper H: The Late Serum Zinc Levels in the Truncal Vagotomized Patients for Peptic Ulcer. *Trace'89* (Eds Yüreğir G, Donma O, Kayrın L). Çukurova Üniversty Balcalı/ Adana, Turkey, 1991, p:555-558.
52. Yu HS, Chan STH: Cadmium Toxicity on Mouse Pre-Implantation Zygotes In Vitro: Interaction of Cadmium with Manganese, Zinc and Calcium ions. *Toxicology* 1988 48:261-272.

ÖZGEÇMİŞ

7 Ocak 1964 tarihinde Tarsus'ta doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana'da tamamladım. 1982 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimime başladım. 6.6.1986 tarihinde eğitimimi tamamladım. 1993 yılında Ç.Ü.Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladım. Aynı Anabilim Dalında biyolog olarak çalışmaktayım.

Evli ve bir çocuk annesiyim.



**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

