

40371

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

**DIŞ ORTAMDA YER ALAN ÇEŞİTLİ
KİMYASAL KİRLİLİKLERİN EMBRİYO GELİŞİMİ
ÜZERİNE ETKİSİNİ DEĞERLENDİRMEDE
FETAX TESTİNİN DEĞERİ**

TEZ YÖNETİCİSİ
Prof.Dr.Tuncay ÖZGÜNEN

Arş.Gör.Ayper BOĞA

MASTER TEZİ

ADANA-1996


KABUL VE ONAY SAYFASI

C.Ü.SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Ayper BOGA'nın MASTER tezi olarak hazırladığı "Dış Ortamda Yer Alan Çeşitli Kimyasal Kirliliklerin Embriyo Gelişimi Üzerine Etkisini Değerlendirmede FETAX Testinin Değeri" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.
Gereğini arz ederim.

26-1-1996


Başkan: Prof. Dr. Tunca ÖZGÜNEN

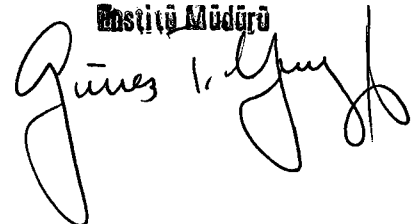

Üye : Prof. Dr. Ayşe DOĞAN


Üye : Doc. Dr. Bulay LOGOGLU

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
..31.1.96.... gün ve ...4/10... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Güneş YÖREĞİR
Enstitü Müdürü



Teşekkür

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

İÇİNDEKİLER

* TEŞEKKÜR.....	I
* TABLO VE ŞEKİLLER.....	V
* KISALTMALAR.....	VII
* ÖZ.....	VIII
* ABSTRACT.....	IX
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	2
1. Xenopus'un Doğal Ortamında Keşfi.....	2
2. Xenopus Görünümü.....	3
3. Xenopus Anatomisinin Özgün ve Faklı Özellikleri.....	4
4. Xenopus Fizyolojisi.....	6
5. Xenopus Üremesi.....	7
5.1. Doğada Xenopus laevis'in Üremesi.....	7
5.2. Laboratuvarda Üremenin İndüksiyonu.....	8
5.3. Bakım Yöntemleri.....	9
5.3.1 Sıcaklık.....	10
5.3.2 Kültür Vasatı.....	10
5.3.3 Besleme.....	11
5.3.4 Yaşanılan Mekan ve Oksijen.....	12
5.3.5 Işık.....	13
5.3.6 Xenopus' da Görülen Enfeksiyon Tipleri.....	13
6. Hormonlar, Gonadlar ve Cinsel Davranışlar.....	14
6.1 Dişiler.....	14
6.2 Erkekler.....	14
6.3 Gametogenez, Fertilizasyon ve Embriyonik Gelişimin Başlaması.....	14
6.3.1 Spermatogenez.....	15
6.3.2 Oogenez.....	16
6.3.3 Fertilizasyon.....	19
7. Toksisite.....	21
7.1 Akut Etki.....	22
7.2 Kronik Etki.....	22
7.3 Geç Etki.....	22

7.4 Ames Testi.....	23
7.5 Tam Embriyo Kültürü Testi.....	23
7.6 Drosophila Testi.....	25
7.7 Planarya Testi.....	25
7.8 Hydra, Dugesia (Planarya) Testi.....	26
7.9 Xenopus Testi.....	27
8. Lityum'un bulunuşu ve Kullanılısı.....	28
GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
1. Bakım ve Besleme.....	30
2. Hayvanların İndüklenmesi.....	31
3. Deney Grupları ve Değerlendirilen Parametreler.....	31
3.1 Sıcaklık.....	31
3.2 Besleme.....	31
3.3 Havalandırma.....	31
3.4 Randomize Alınan Yumurtalarda Döllenme Oranı.....	31
3.5 Mekan Faktörü.....	31
3.6 Aynı İndüklemede Saat Başı Toplana Yumurta Grupları Arasındaki Evre Farkları.....	32
3.7 Lityum' un Xenopus Embriyosuna Etkisi.....	32
3.7.1 Pilot Çalışma 1.....	32
3.7.2 Pilot Çalışma 2.....	32
3.7.3 Pilot Çalışma 3.....	32
3.7.4 FETAX Testi.....	33
4. Verilerin Toplanması.....	34
5. Veri Analizi.....	34
BULGULAR.....	35
1. Sıcaklık ile İlgili Değerler.....	35
2. Besleme ile İlgili Değerler.....	36
3. Havalandırma ile ilgili Değerler.....	37
4. Randomize Alınan Yumurtalarda Döllenme Oranı ile İlgili Değerler.....	39
5. Mekan Faktörüne ait Değerler.....	41
6. Aynı İndüklemede Saat Başı Toplana Yumurtalarda Evre Gelişimine Ait Değerler.....	42

7. Pilot Çalışma 1'e ait Değerler.....	44
8. Pilot Çalışma 2'ye ait Değerler.....	45
9. Pilot Çalışma 3'e ait Değerler.....	50
10. Lityumla Yapılan FETAX Testine Ait Değerler.....	53
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	66
1. Xenopus'un Kullanım Alanları.....	66
2. Sıcaklık.....	67
3- Beslenme.....	68
4. Havalandırma.....	68
5. Mekan Faktörü.....	68
6. Randomize Alınan Yumurta Gruplarında Dölllenme Oranı.....	69
7. İndükleme ile Elde Edilip Saat Baş Toplanan Yumurtalarda Evre Farkları.....	69
8. Toksisite.....	70
9. FETAX Testi	70
10. Lityumun Etkileri.....	75
KAYNAKLAR.....	79
ÖZGEÇMİŞ.....	83

TABLO VE ŞEKİLLER

Tablo I.....	35
Tablo II.....	38
Tablo III.....	40
Tablo IV.....	42
Tablo V.....	44
Tablo VI.....	45
Tablo VII.....	47
Tablo VIII.....	47
Tablo IX.....	50
Tablo X.....	51
Tablo XI.....	52
Tablo XII.....	53
Tablo XIII.....	53
Tablo XIV.....	54
Tablo XV.....	54
Tablo XVI.....	57
Tablo XVII.....	59
Şekil I.....	5
Şekil II.....	5
Şekil III.....	17
Şekil IV.....	18
Şekil V.....	19
Şekil VI.....	36
Şekil VII.....	37
Şekil VIII.....	39
Şekil IX.....	40
Şekil X.....	41
Şekil XI.....	43
Şekil XII.....	47
Şekil XIII.....	48
Şekil XIV.....	48
Şekil XV.....	49
Şekil XVI.....	49

Şekil XVII.....	59
Şekil XVIII.....	59
Sekil XIX.....	60
Sekil XX.....	60
Sekil XXI.....	61
Sekil XXII.....	61
Sekil XXIII.....	62
Sekil XXIV.....	62
Sekil XXV.....	63
Sekil XXVI.....	63
Sekil XXVII.....	64
Sekil XVIII.....	64
Sekil XXIX.....	65
Sekil XXX.....	66



KISALTMALAR

I.U : International Units

LH : Luteinizan Hormon

hCG : Human Koryonik Gonadotropin

FSH : Follikül Stimulan Hormon

LC50 : 96 saat sonunda % 50 letaliteye neden olan yoğunluk

EC50 : 96 saat sonunda % 50 malformasyona neden olan yoğunluk

TI : Teratojenisite İndeksi

LiCl : Lityum Klorür

MBT: Midblastula Transition

FETAX : Frog Embryos Teratogenesis Assay: Xenopus (Kurbağa Embriyosu

Teratogenez Deneyi: Xenopus



ÖZ

Xenopus laevis türü kurbağalar son yıllarda gitikçe daha fazla kullanılmaktadır. Laboratuvarımıza 1993 yılında ilk kez getirilen Xenopus cinsi kurbağalarda yaptığımız ilk çalışmalar, bu hayvanların laboratuvar koşullarına uyumunu sağlamak üzere çeşitli parametrelerin incelenmesi şeklinde olmuştur. Bu verileri elde ettikten sonra, asıl amacımız olan FETAX testini gerçekleştirebilmek için çalışmalar yapılmıştır.

Xenopus'un Laboratuvar koşullarına uyumunu sağlamak üzere sıra ile sıcaklık, beslenme, havalandırma, mekan faktörü, randomize alınan yumurtalarda döllenişlik oranı ve aynı indüklemeye saat başı toplanan yumurtalarda evre farklılıkları incelenmiştir. FETAX testini gerçekleştirmek için kimyasal olarak lityum tuzu seçilmiş ve çeşitli pilot çalışmalar yapılmıştır.

Son olarak da FETAX testi yapılmaya çalışılmıştır.

Bakım ve besleme parametrelerinin incelenmesinde larvaların 24-26° C sıcaklıkta ,her gün beslenerek,sularından hava geçirilerek,geniş kaplarda barındırılarak yaşama ve gelişmede iyi sonuç alınabileceği; ayrıca alınan sonuçlar en iyi gelişen yumurtanın 5. saatten sonra alınabildiğini düşündürmüştür. Bu son bulgumuzu destekleyecek bir kaynak bulunamamıştır.

Lityum tuzu ile yapılan pilot çalışmalarda evreye , doza ve muamele süresine bağlı anomaliler gözlenmiş; evre 1'den evre 9' a kadarki muamelelerde anteriozasyon, evre 9'dan sonraki muamelelerde posteriozasyon gözlenmiştir.

Lityum ile yapılmaya çalışılan FETAX testinde Lityumun Teratojenisite İndeksi 2.5 olarak bulunmuştur. Bu değer Lityumun orta şiddette bir teratojen olduğu sonucunu vermiştir. Fakat görülen çok şiddetli anomaliler Lityumun aslında şiddetli bir teratojen olduğunu düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Xenopus, FETAX, Lityum, besleme,üretme

ABSTRACT

Over the past twenty years, amphibian species have become popular model animal systems. They are vertebrates and can be maintained easily and inexpensively in laboratory. Among amphibians *Xenopus* has become one of the amphibian species most widely used in biomedical research.

First of our studies was about to care and feeding of *Xenopus* in laboratory. Our second aim in these studies was to assay to FETAX. We made pilot studies about of FETAX.

We studied about of temperature, feeding, aeration, housing, at randomized taken eggs percent ratio of fertilization and at same induction differences of developmental stages of *Xenopus laevis* per hour collected eggs.

It was chosen of Lithium Chloride as chemical agent for FETAX.

In conclusion we have seen that the larvae housed about 24-26°C temperature fed once a day, constantly aerated and should have enough space for the growing juvenil per individual.

Most of sufficient development of embryos were find that at per hour collected eggs at fifth hours. But we have not found any literature about of this conclusion.

In pilot studies we seen that different anomalies depend on stage of development, time of treating, consantration of the chemical.

The effect of Lithium on the larval body pattern could be detected from reduction of posterior structures (anteriozation) to reduction of anterior structures (posteriozation), the time of midblastula transition (MBT), could be detected just after the 12 th cleavage.

At FETAX at ninety six hour LC50 value for LiCl were 0.002 g/L, and 96 hour EC50 value of LiCl were 0.0088 g/L. The Teratogenicity Index were found about 2.5. This results shown Lithium Chlorid is a moderate teratogen.

Keywords: *Xenopus*, FETAX, Lithium, Feeding, İnsemination

GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan sağlığı ilk çağlardan beri gerek doğal gerekse yapay faktörlerle tehdit edilmektedir. Bu tehdit teknolojinin ilerlemesi ile paralel gitmektedir.

Modern teknolojinin sağladığı refah seviyesinin sürdürülebilmesi için bu maddeleri yoketme yerine tehdit edici dozunun saptanması ilkesi kabul edilmiştir.

Araştırmacılar maddelerin kirlilik etkilerini saptayabilmek için çeşitli test sistemleri geliştirmişlerdir. Bu etkilerden teratojen ve mutajen etkinin gelecek kuşakları etkilemesi araştırmacıları embriyo teratogenesis üzerine yoğunlaştırmıştır.

Çalışmamızın amacı Li tuzunu kullanarak laboratuvarımızda FETAX (Frog Embryos Teratogenesis Assay: Xenopus) testini kurmaktır.



GENEL BİLGİLER

1. Xenopus Doğal Ortamında Keşfi

Bu gün Xenopus denen Afrika su kurbağası genusuna Daudin (1803) tarafından keşfinden bu güne dek çeşitli adlar verilmiştir. Daudin derisinin yumuşak olması ve kara kurbağasına benzemesinden ötürü bu hayvana "Le Crapaud Lisse" ve latince Bufo laevis adını takmış ve (laevis Latince yumuşak demektir) Güney Amerika'da yaşayan ve Surinam kara kurbağası adlı su kurbağalarının bir cinsi olan pipaya benzerliğini not etmiştir. Xenopus anatomisinde daha sonra yapılan araştırmalar gerçekte bunun Pipidae ailesine mensup olduğunu göstermiştir. Sonuçta Xenopus genellikle Güney Afrika pençeli kara kurbağası adı verilirse de bunun kara veya su kurbağası olup olmadığı halen tartışmalıdır (31).

Xenopus ilk kez Cuvier (1829) tarafından ayrıntılı şekilde tanımlanmış olup; bu araştırmacı, hayvana pençelerinin kalkana benzemesinden ötürü Dactylethra (kalkan parmak) adını vermiştir. Bu isim 1890'lara kadar korunmuştur.

Bu hayvana Xenopus adı (garip ayak anlamına gelir) ilk kez Boie tarafından yazılan bir makaleye, bir dip not olarak (1827) Wagler tarafından konmuş, kullanıma ise bu hayvanı ilk kez doğal ortamında inceleyen Leslie tarafından (1890) sokulmuştur. Leslie Port Elizabeth'e yerleşen sömürgecilerin verdiği adla Plathanda'nın bu bölgedeki ırmak ve göletlerde bol miktarda bol miktarda bulunduğunu ve hayvanın balık ,böcek larvası ve hatta bazen kendi iribaşlarını da yediğini bildirmiştir. Ayrıca yazar hayvanın burun deliklerinde suda yaşayıp hava ile soluyan hayvanlara özgü bir yapı olan iç kapakçıklar olduğunu gözlemiştir . Leslie hayvanın erkeğinin tıkrıtı şeklinde vıraklamasının, havanın akciğerden ağız boşluğuna geçişi esnasında, glottisin orta kulağa ait östaki tüpünün kenarlarına sürtünmesinden doğduğunu düşünmüştür(31).

Xenopus'da yumurta dökme ve iribaş oluşumu ilk kez (1894) Beddard tarafından tanımlanmış olup bu gözlemler, Cap Town'dan Londra hayvanat bahçesine ithal edilen 6 örnekten sağlanmıştır.

Daha sonra Bles (1905) Cap'ta Xenopus laevis resmi adı ile bilinen hayvanın çiftleşme ve embryo ile larvalarının gelişmesine ait ilk eseri yazmıştır. Bu hayvana Güney Afrikada bu günde verilen popüler isim Plathander, Plathan veya kısaca Platie'dir (31).

Xenopus'un sistematik pozisyonu şöyledir:

Super clasis:Tetrapoda

Clasis:Amphibia

Sub clasis:Apsidospondyli

Ordo:Opisthocoela

Familya:Pipidae

Sub familya:Xenopodinae

Genus:Xenopus

Species: Xenopus laevis

Bu genusun coğrafi dağılımı sahranın güneyinde tüm Afrika olup 6 türü ve 7 alt türü vardır (31).

2. Xenopus Görünümü

Diğer kurbağa türleri ile oranlanırsa Xenopus dorsoventral olarak yassı olup, gövdesi başına göre çok geniştir. Arka bacaklar çok uzun olup, araları zarla bağlı uzun parmaklar taşıyan bu uzun ayaklar kara kurbağalarında olduğu gibi gövdenin altında bükülme yerine vücudun kenarlarından dışarı taşmıştır (31).

Çok daha kısa olan ön ayaklarda lateral bir açılım göstermektedir. Bu yassı biçim ve postür hayvanı karada yürüme yerine suda yüzmeye müsait hale getirir ve gerçektende Xenopus diğer su ve kara kurbağalarına oranla tamamen suda yaşayan bir hayvandır (31).

Hayvanın derisi yumuşak ve sümüksü olup , küflü bir kokuya sahip ise de muhtemelen diğer amfibiler hariç başka canlılar için toksik etki göstermez.

Xenopusun kafası gövdesi gibi yassı olup gözler karada yaşayan diğer kurbağalara oranla daha küçük ve daha az belirgindir.

Sırt yeşilimsi gri olup hayvanın koyu ve açık renk zemine konması halinde; bu renk daha koyu veya daha açık bir hale gelebilir. Ventral yüz Xenopus laevis' de sarımtırak beyaz ise de diğer türlerde çok daha canlı renklerde olabilir. Erkek ve dişilerin renkleri birbirine benzemekle beraber; dişi erkekten büyüktür ve kloakında papillalar bulunur (31).

Xenopus, iç anatomisi yönündende alışılmadık birçok özellik arzeder. Bu alışılmadık özelliklerden bir kısmı primitif olarak kabul edilirken, bazıları suda yaşam için özelleşmiş

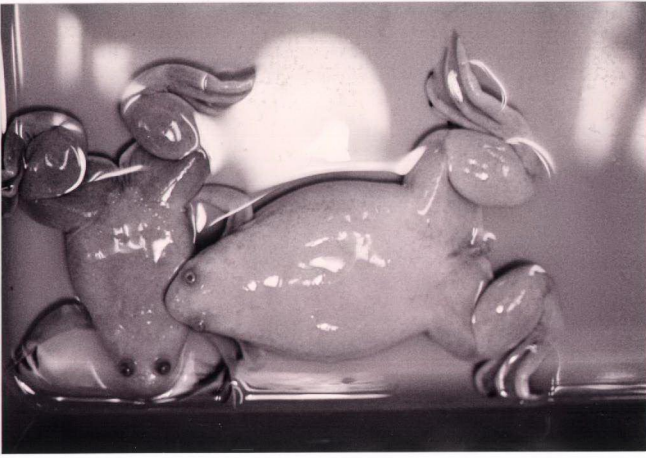
olarak kabul edilmekte, bazı özellikler ise bunların ürodellerle olan ilişkisini gösterir olarak değerlendirilmektedir. Sonuç olarak bütün bu nedenlerden ötürü Xenopus eskiden beri komparatif anatomistler için bir bilgi kaynağıdır (31).

2.3 Xenopus Anatomisinin Özgün ve Farklı Özellikleri

Gerek ergin ve gerek larva Xenopus anatomisine ait ilk ayrıntılı inceleme Dreyer (1913, 1914) tarafından yapılmıştır. Bu yazar hayvanda bazı özelliklerin primitif olduğunu, bazı özelliklerin ise bu hayvanın anuranlar yerine ürodellerle akraba olduğunu gösterdiğini bildirmiştir. Ancak daha sonraki bir tarihte (1931) Noble Xenopus'da Pipidae'nin birçok karakteristiğini tanımlamış ve bu tarihten itibaren Xenopus Anuran suborder Opisthococela'da yer alan bu aileye mensup olarak kabul edilmiştir. Noble, Xenopusu üç generadan (Xenopus, Hymenochirus, Pseudohymenochirus) en ilkel olarak kabul etmiştir (31).

Xenopusun gözleri Rananinkinden daha küçük ve daha az fırlak olup, görme alanı ön yerine yukarıya doğru yöneliktir. Bu durum yaşamının büyük bölümünü havuzda geçiren ve gerek avcı ve gerek avın kendisine yukardan yaklaşma olasılığı daha büyük olan bir canlı için önemli avantaj sağlar (31).

Xenopus korneası aynı zamanda ileri derecede konveks olup kafa düzeyinin üzerine taşmakta ve bu durum görme alanını mükemmelleştirmek için özgünleşmeyi temsil etmektedir. Öte yandan işitme organı ele alınacak olursa; Xenopusda Rana gibi karada yaşayan formlardaki gibi dıştan görünür bir kulak zarı bulunmaz. Kulak zarı hava yolu ile gelen ince sesleri almak için özgünleşmiş bir organ olması ve yaşamını tümüyle suda geçiren omurgalılarda bulunmaması nedeni ile primitif bir karakteristik olarak kabul



Şekil 1. Albino Xenopus dişi ve erkeği



Şekil 2. Yabani Xenopus dişi ve erkeği

edilebilir. Bununla beraber Xenopusta gözlerin arkasındaki deri kaldırılacak olursa, otik kapsül dış duvarı üzerinde kıkırdaktan yapılmış yassı bir disk bulunur. Ranada böyle bir disk bulunmaz. Bu kıkırdak disk, Xenopusta su ile taşınan vibrasyonları daha iyi analiz etmeye yarar. Bu vibrasyonlar yan hat organları tarafındanda algılanmakta olup, bu organ diğer anuranlardan farklı olarak Xenopusta başkalaşım esnasında kaybolmamakta ve erişkin yaşam boyuncada kalmaktadır .

Gerçektende Xenopusta dışardan gözle görülebilen hem dorsal hemde ventral komponentleri bulunan gelişmiş bir yan hat sistemi bulunur (31).

Witschi (1955) vibrasyonların deteksiyonu için Xenopusda gelişmiş bir başka özgünleşmenin bulunduğunu saptamış olup, bu bronşial kolumelladır. Bu sistem vibrasyonları iç kulağın yuvarlak penceresinden o taraftaki akciğere aktarır. Bu sistemin işlevlerinden bir tanesinin çevrede oluşan basınç değişikliklerini akciğerlere aktarmak ve böylece akciğerlerdeki hava hacminin regülasyonunu stimüle ederek hayvanın suda battığı derinliğe kendisini uydurabilmesine olanak sağlamak olarak düşünülmektedir (31).

Xenopusda görülen bir diğer adaptif bulgu, bunların akciğerlerinin vücut büyüklüğüne oranının diğer anuranlardaki orandan çok daha büyük olmasıdır. Örneğin bu oran Ranadaki oranın yaklaşık 4 katıdır. Kaldı ki akciğerler Xenopusta çok erken evrede larva yumurtadan çıkar çıkmaz gelişmeye başlamaktadır. Bu en erken işleve başlama olayının özellikle larvanın dalacağı su derinliğini düzenlemesine yardım ettiğine inanılmaktadır. Bu konuda bir başka olasılık; Xenopus'un gerek larva ve gerek ergin dönemde solunum için diğer amfibilere oranla akciğerlere çok daha fazla bağımlı olmasıdır. Deri ve solungaçlara giden kanın göreceli olarak daha az miktarda olması ve bu organların Xenopusta çok etkili bir solunum organı olmadıklarını telkin etmektedir (31).

4. Xenopus Fizyolojisi

1930 ve 1940'larda Xenopus fizyolojisi konusunda yapılan araştırmaların çoğu üreme fizyolojisi alanındadır (31).

Xenopus laevis'in gelişimine ait normal tablonun yaşama geçirilmesi iki nedene bağlıdır:

Xenopus laevis, bunun gebelik testleri ve diğer hormonal reaksiyonlar için çok kullanışlı olduğunun farkedilmesinden bu yana laboratuvarında sık kullanılan bir deney hayvanı olma

özelliğini kazanmıştır. Akuvatik bir form olan bu hayvan esaret koşullarında rahatça bakılabilmesi ve hormonal uyarı ile kolayca üretilebilmesi nedeniyle daha sonra mükemmel bir laboratuvar hayvanı olma özelliğide kazanmıştır. Yumurtalar oldukça tatmin edici şekilde gelişmekte ve larvalar başkalaşıma kadar rahatça bakılabilirken, bundan sonraki dönemde büyük bir güçlkle karşılaşmamaktadır. Sonuç olarak *Xenopus laevis* dünyadaki birçok biyoloji, tıp ve veteriner enstitülerinde geniş çapta kullanılmaktadır (31).

5. *Xenopus*un Üremesi

5.1 Doğada *Xenopus laevis*'in Üremesi

Berk (1938) Güney Afrika Cap bölgesinde *X.laevis*in üreme mevsimini Temmuzdan Eylülle kadar olarak bildirmiş olup; bu dönem üreme mevsiminin kışın geç döneminden başlayıp baharın erken dönemine kadar uzadığını bildiren Hey'in tanımına (1949) uymaktadır. Bu nisbeten kısa dönemde dahi her dişi normalde 2-3 kez yumurta bırakır. Daha kuzey enlemlere çıkıldığında havanın daha sıcak olmasına karşın *Xenopus*'un üremesi daha geç döneme kalır. Örneğin Transvaal'de Kalk (1960) üremenin yağmur mevsiminin başlaması ile başladığını ve Eylül'den Ocağa kadar sürdüğünü bildirmektedir. Bu durum üremeyi kontrol eden çevresel faktörün sıcaklık yerine nem olduğunu telkin eder (31).

Waring, Landgrebe ve Neil'e göre (1941) *Xenopus* dişileri yumurtalıklarındaki tüm yumurtaları asla tek bir döllenme periyodunda dökmemekte, ancak çiftleşmeden sonra yumurtalıklar yavaş yavaş gerilemektedir.

Gitlin (1942) oviduktların ağırlığında ovaryumlara paralel mevsimsel değişiklik gösterdiğini ve bu organlarda görülen değişikliklerin hipofiz hormonları tarafından yönetildiğini saptamıştır (31).

Erkek *Xenopus*staki belirgin mevsimsel değişiklikler sekonder cinsiyet karakteristiklerinde görülür. Üreme mevsiminde ergin bir erkekte kolayca görülen bir özellik çiftleşme sırasında dişinin sıkıca kavranmasına yardım etmek üzere parmak, avuç ve ön kolların iç yüzeyinde siyah ve yapışkan kılların belirmesidir. Bu kılların görülmesi testiste sperm üretildiğinin bir işaretidir. Parmaklarında bu kararma görülmeyen erkeklere LH zerkesilmesi nadiren sperm salınmasına neden olur (31).

Çiftleşme mevsiminin en yoğun günlerinde birgün önceki öğleden sonra (yani su yüzey

sıcaklığının en yüksek noktaya ulaştığı anda) su yüzey sıcaklığı 21° C üzerine çıkacak olursa; ertesi gün bol miktarda yumurtlama görülür (31) . *Xenopus laevis*'in yumurta sayısı 15000'dir. Fakat bunların hepsi döllenmez. Yumurtalar 1.5 mm. çapta olup jel kılıfla beraber 3mm. kadardır (28). Yumurtalar tek tek jel kapsüllere sarılı olup diğer kurbağalarda görünen tarzda tüm yumurtaları kaplayan jel kütle ve şeridi bulunmaz (31).

5.2 Laboratuvar Üremenin İndüksiyonu

Laboratuvar koşullarında, *Xenopus* gonadal gelişme ve üreme aktivitesindeki mevsimsel patern genellikle bozulmakla beraber Weisman ve Coates (1944), dişileri aylarca mükemmel bir üreme düzeyinde tutabildiklerini yayınlamışlardır. İlk kez Alexander ve Bellerby (1935), beslenme ve diğer koşullara riayet edilmediği takdirde ovaryumunda zararlı bir regresyona neden olan "esaret etkisinden" bahsetmişlerdir. Landgrebe (1939) bu konuda hayvanların aşırı kalabalıktan korunması gereğine işaret etmiştir. Günümüzde çok daha büyük önem taşıyan bir diğer faktör şehir suyuna ekseriya aşırı miktarda klor katılması olup, yaşanan ortama katılan yeşil alglerin *Xenopusta* üremeyi kamçılamaındaki olası bir neden (Bles 1905, Hey 1949, Savage 1965), bu alglerin muhtemelen kloru uzaklaştırmasıdır. Laboratuvar da letarji dışında hiç bir semptom göstermeyen ve nedeni bulunamayan *Xenopus* ölümlerinden bazıları sudaki yüksek klor miktarına bağlı olabilir. Açıkça görüleceği gibi suyun iyice havalandırılması ve hayvana bol miktarda gıda sağlanması çok büyük önem taşımaktadır (31).

*Xenopus laevis*te yumurtlama gonadotropik hormon (örn. İnsan gonadotropik gebelik idrar ekstresi zerkiyle indüklenebilir. Zerkler kalça derisi ile kalça ve sırt lenf torbaları arasındaki septum delinerek dorsal lenf torbasının içine yapılır (Ochse, 1948). Erkeklerle yumurtaya ihtiyaç duyulan tarihten iki gün önce azami 300 I.U (0.5 ml. arı su içinde) hCG zerk edilir. Ertesi gün öğleden sonra siyah renkli "nuptial pad" geliştiren erkeklere bir kez daha azami 600 I.U (1 ml. arı suda) hCG zerki yapılır. Gereksinilen doz hayvandan hayvana değişmekte olup hayvan başına 400-600 I.U önerenlerin yanısıra, çok daha düşük dozlarda sonuç alındığını bildiren yazarlar da vardır (28).

Bu hayvanlar geniş ve üstü kapaklı bir kaba konur, ışıktan korunur ve ovipozisyon için kaba ince dallar yerleştirilir. Dökülen yumurtaları hayvanların yemelerini önlemek için kabın tabanına kenarları aşağı kıvrılmış metal bir ağ da yerleştirilebilir (28).

Yumurtlama, sıcaklığın gece boyunca yapay olarak yavaş yavaş yükseltilip kritik sıcaklığın aşırılması sonucu, sabah erken saatlerde görülürse de su sıcaklığının kritik düzeyin altında tutulması ile daha sonraya da ertelenebilir. Erkek dişiyi pelvik bölgesinden sarmalayarak yumurta dökünceye kadar amplexusta kalır. Erkeğin ön kol ve parmaklarında dişiyi kavrayıp sıkıca tutmasına izin veren koyu renkli ve yapışkan kıllar bulunmakta olup, hayvan belli aralıklarla sperm çıkarır ve bu spermeler yumurtalar dışarı atılır atılmaz ulaşmak için ileri doğru hareket etmek zorundadır. 24 saate kadar sürebilen yumurtlama periyodunda normalde 500- 1000 yumurta dökülür (31).

Yumurtlamayı takiben erişkinler kaptan dışarı alınır, atıklar temizlenir ve suyun sıcaklığı 20-25°C düzeyinde tutulur. Larvaların bakımı esnasında kaptaki suyun litresinde üçten fazla larva bulunmamasına dikkat etmek gerekir. Larvalar kendi ciğerleri ile solumaya başlayıncaya kadar (bu durum su yüzeyinde kabarcıkların görülmesi ile anlaşılır) kaptaki suyun sürekli havalandırılması zorunludur. Besin olarak bitki tozu kullanılıyorsa, en azından larvaların ağla toplamaya son derece duyarlı ve kırılgan oldukları ilk hafta boyunca suyun değiştirilmesine gerek yoktur. Suyun bakır ve klor iyonlarından tamamen arındırılmış olmasına özellikle dikkat etmek gerekir. Klor gazı kullanılacak suyun günlerce açık havada bırakılması ile uzaklaştırılabilir (28).

Larvalar döllenmeden sonraki 3 gün içinde yumurtadan çıkar (hatching) ve ortamda gıda bol ve aşırı kalabalık yoksa 2 ayda başkalaşıma ulaşırlar (31).

5.3 Bakım Yöntemleri

Amfibi embriolarının erken evrelerinde bol miktarda yolk bulunmakta olup bu yolk gelişmenin önemli bir dönemi boyunca hayvana gerekli tüm besinleri içerirler. Anura (kuyruksuz kurbağa) larvaları yumurtadan çıktıktan sonra embriyonik barsak ile kalça ektodermi arasında yer alan bu yolku kullanarak günlerce hayatta kalırlar. Gelişmenin erken evrelerinde hayvanların yaşamasını belirleyen tek ve en önemli etmen sıcaklık, ikincisi ise kültür ortamıdır . Bunları beslenme, yaşanılan mekan, oksijen ve ışık faktörleri izler (28).

5.3.1 Sıcaklık : Çeşitli formların sıcaklık tahammül sınırları yaklaşık 24°C ise de, bu sınır bazı formlarda daha yüksek bazılarında ise düşüktür. Tüm amfibi larvaları için maksimum sınırlar 0-40°C olup, optimum sınır 12-25° C'dir. Laboratuvarların büyük çoğunluğunda oda

ısı 23-25°C de tutulmakta olup bu sıcaklık anurlar için tatmin edicidir (33).

5.3.2 Kültür Vasatı : Bütün amfibiler yumurtalarını suya bırakırlar. Bunların içinde yaşadığı havuz suları çiftleşmeleri için idal ortamı oluşturur. Ancak bu havuz suyunu temin daima kolay bir işlem olmadığından; bu suların kimyasal analizinden alınan bilgilere dayanarak bazı kimyasal karışımlar üretilmiştir. Genel olarak gözlenen bulgulardan bir tanesi hafifçe hipotonik vasatların tercih edilmekte olduğu ve hatta gelişmenin saf su içinde dahi belli bir limite kadar devam edebildiğidir. Büyük kentlerde kullanılan musluk suları ileri derecede klorlu olduğundan embriyolar için toksik olabilmekte ve bazı hallerde borulardan gelen kurşun, bakır ve demir gibi metal iyonları embriyoyu öldürmektedir. Kum ve kömür filtrelerden geçirilip içine bol miktarda bitki yerleştirildikten sonra günlerce bekletilmiş musluk suları genellikle oldukça tatminkardır. Kum ve kömür artıkları ve suda erimiş gazları alırken canlı bitkiler (Elodea, Valecinera, Sagitta, Nitella, vs.) suyun oksijen içeriğini artırmaya yardımcı olurlar (33).

Akvaryumdaki embriyoların normal gelişimi için Na, Ca, ve K iyonlarının yaklaşık 50:1:1 oranında bulunmasının zorunlu olduğu anlaşılmıştır. Bu iyonların her biri yarıklanma ve gelişme süreçlerinde özel görevler icra etmekte ve bu oran korunacak olursa yoğunluklarda meydana gelecek oldukça önemli değişikliklere canlılar tahammül edebilmektedirler. Tamamen ampirik olarak bazı formüller geliştirilmiş olup bu formüllerin herbiri belli bir canlı için uygunluk gösterir (33).

1. Standart Holftreter Çözeltisi

Bu çözeltinin en tatmin edici yapay ortam olduğu kanıtlanmıştır. Total tuz yoğunluğu %0.385 olup erişkin dokuları için hipotonik olan bu ortam, Anuranın erken embriyonik evreleri için izotoniktir. Bu çözeltinin stok olarak 3 veya 4 güçte (x3 veya x4) hazırlanması tavsiye edilir.

Normal yoğunlukları şunlardır:

NaCl.....0.35gr.

KCl.....0.005gr.

CaCl₂.....0.01gr.

NaHCO₃.....0.02gr.

Saf Su.....100.0ml.(30)

2. Amfibi Ringer Çözeltisi

Bu standart çözelti embriyo ile embriyonik dokular için hipertonic ise de, amfibilerin erişkin dokuları için yeterlidir.

NaCl.....0.66gr.

KCl.....0.015gr.

CaCl₂.....0.015gr.

NaHCO₃,.....0.03gr. (PH.yı 7.8'de tutmaya yarar.)

Saf Su.....100.0ml (30).

3. Orjinal Kurbağa Ringeri

NaCl.....0.65gr.

KCl.....0.015gr.

CaCl₂.....0.012gr.

NaHCO₃0.02gr.

NaH₂ PO₄0.001gr.

Glukoz.....0.20gr.

Saf su.....100.0ml (33).

4. Pınar Suyu: Bu suların Anuran Embriyolarının gelişimi için çok uygun olduğu kanıtlanmışsa da Türkiye'de temin edilmeleri güçtür (33).

5.3.3 Beslenme: İribaş ağzı açıldıktan sonra da günlerce beslenmeye gerek duymayabilir. Bunun nedeni tüm amfibi larvalarında bol miktarda yolk halinde yedek gıda bulunması ve bu yolkun dokular tarafından doğrudan sindirilip emilebilmesidir (33).

Anuranlarda 25. evreye kadar beslenmeye gerek yoktur. Anuran larvalarının büyük çoğunluğu vejeteryan olup en uygun besin hafifçe kaynatılmış ıspanak ve maruldur. Bu yeşillikler insektisid olarak kullanılan arsenik, kurşun, vs.den kurtulmaları için iyice yıkanmalıdır. Kaynatmanın amacı sadece bitkisel dokuları yumuşatmaktır. Başlangıçta karşılaşılan en büyük tehlike larvaların aşırı beslenmesidir (33).

Fekal ve bakteriyel artıkları asgariye indirmek için tankların hergün temizlenmesi zorunludur. Xenopus larvaları için pişirilmiş, kurutulmuş ve ince toz haline getirilmiş sığır ciğeri, yeşillik ve alglere sağlanacak en mükemmel takviyedir. Karaciğer sosisi birçok anuranlarda başarı ile kullanılmıştır. Kullanılan diğer besinler arasında toz haline getirilmiş yumurta sarısı, kurutulup toz haline getirilmiş tam unla karıştırılmış bakto-beef ekstresi,

kıyılmış çiğ karaciğer, algler ve protozoanlar vardır. Marulla beslemenin ıspanakla beslemeye oranla daha az anormalliklere neden olduğu fakat gelişiminde biraz yavaş olduğu gözlenmiştir (33).

Post metamorfik evrede metamorfoz sonrası sindirim kanalının histolojisinde radikal bir değişikliğe uğradığından, gerek duyulan gıdaların türünde tüm amfibilerde radikal bir değişim gösterir. Burada gıdanın sadece miktarı değil, çeşitliliği artar ve vitamin verilmesi zorunlu hale gelir. Bu evrede Anurular canlı, hareketli gıda istemeye başlar. 2.5cm'lik parçalara ayrılmış toprak solucanları, sinekler, et kurtları, karıncalar, örümcekler, hamam böcekleri, tırtıllar, çekirgeler v.b. hareketli oldukları sürece kurbağalar tarafından yenirler. Bira mayası ve balık yağına daldırılmış balık etleri ve memeli karaciğer etleri yeni metamorfozdan çıkmış kurbağalar için mükemmel besinlerdir.

Xenopus bu konuda ufak bir ayrıcalık göstermekte olup Karaciğer şartları ile beslenebilecek ve gıdayı aldıktan sonra suya tekrar dalıp günlerce hareketsiz kalacak, ara sıra yüze çıkıp hava alacaklardır (33).

5.3.4 Yaşanılan Mekan ve Oksijen: Mekan gelişim hızını belirlemede çok önemli bir rol oynamaktadır. Genel olarak larvalar diğer tüm faktörler sabit tutulduğunda kalabalık olmayan topluluklarda daha hızlı gelişmektedir. Bu nedenle çanaklarda 1 yumurtaya 2ml. vasat düşecek şekilde düzenleme yapılması ve 25 yumurta (50 ml. vasatta) dan daha çok hayvan tutulmamalıdır (33).

Kaplarda kullanılacak suyun miktarı ise yaşamsal önem taşımaz. Öte yandan tankların yüzey alanları önemli olup 15x30x60 cm'lik bir tanka 200 iribaş su derinliği ancak 2.5 cm. olacak şekilde yerleştirilebilir. Bu tankta görülebilecek buharlaşmayı giderebilmek için haftada bir kez tanka saf su eklenir, ancak hiç bir şekilde iribaşlar derin sulara bırakılmamalıdır (33).

Amfibi embriyolarının tolere ettiği oksijen basıncı sınırları oldukça geniş ise de bu hayvanlar anaerobik koşullara aşırı duyarlıdırlar. Yapay havalandırmaya gerek yoksa da vasata sürekli oksijen ilave etmeleri yönünden tanka Elodea, Nitella v.s türü bazı akuvatik bitkilerin yerleştirilmesi yararlı olur (33).

tanklar Kırmızı Bacak ensidansını artırmaktadır (33).

Tedavisi bilinmeyen ve çok yüksek mortalite gösteren bir diğer enfeksiyon **Saprolegnia**'dır. Hastalığın semptomları vücudun şişmesi ve su dolu bir manzara arz etmesidir. Enfekte hayvanlar derhal imha edilmeli ve tanklar permanganatla sterilize edilmelidir. Pratik uygulamalarda kurbağa tanklarına birkaç tane bakır para atılarak buradan suya geçen bakır iyonlarının bu enfeksiyonları önlemesi sağlanır. Bu miktar bakır iyonu erginler için toksik değildir (bakır, kurşun, çinko, cıva ve bronzun çok küçük miktarları embriyolar için toksiktir) (33).

Semenderler bir mantar olan **Monilia bathracus** tarafından bazen çok ciddi biçimde enfekte edilmekte olup, bu mantar hayvanın dudaklarına saldırmakta ve açık yaralar yapmaktadır. Bu ajana kara ve su kurbağaları başışığıdır. Olay bulaşıcı ise de erken dönemde dudakların %2'lik Merkuro kromla boyanması hastalığın kontrol altına alınmasına izin verebilir (33).

Parazitler sıklıkla canlı yemlerle ortama bulaştırılır. Bunların arasında kurtlar, sinekler ve keneler bulunur. Bununla beraber bu enfekte hayvanlar normalde amfibilerin çoğu için gıda görevi yaptığından hemen hiç bir tehlikeye neden olmazlar. Gıda olarak Tübifeks (kırmızı kurt) kullanılıyorsa bu hayvanların kanalizasyonda yaşamaları ve aşırı bakteri taşımalarından ötürü günlerce soğuk akar su altında tutulması tavsiye edilir (33).

Ödem embriyonik böbreğin yapamamasına bağlı olup, bu tablo böbreklerin henüz gelişmediği evrede de görülebilmektedir. Genç larvalar çoğunlukla ödemli bir görünüm

arzedilerse de bu şişkinlik sindirim kanalında gazların birikmesine ve hayvana şişkin manzara vermesine bağlıdır. Yaygın ödem bazen hayvanın hafifçe hipotonik bir aktarılması ile ortadan kaldırılabilir. Ödem lokalize ise birikmiş sıvının akıtılması için bölgenin bir iğne ile delinmesi yeterli olabilir (33).

6. Hormonların Gonadlar ve Cinsel Davranışlar Üzerine Etkisi

6.1 Dişiler

Ovaryumun normal döngüsel gelişme ve regrasyonu diğer omurgalılar gibi östrojenik hormonlar tarafından düzenlenir. Bu hormonlar hipofizer gonadotropinlerin etkisi altında ovaryum dokusu tarafından salgılanır. Xenopus ovaryum ekstrelerinde östrojenik iki hormon olan östradiol ve östronun bulunduğu saptanmıştır (Gallien ve Foulgoc 1960). Bu hormonlar başkalaşımdan bir ay sonra ovaryumlarda bulunur. Ve 1971'de Nicholls bu hormonların ana sentez yerinin folikül hücreleri olduğunu bulmuşlardır (31).

Gerek ovaryumların gelişmesi ve gerek ovaryumdan hormon salınmasının sürdürülmesi hipofiz bezi tarafından sağlanan stimülasyona bağımlıdır. Yani Xenopusta hipofizektomi ovaryumların gerilemesine neden olurken (Bellerby ve Hogben 1938), koyun gibi son derece farklı bir kaynak (Gitlin,1942) dahil çeşitli kaynaklardan sağlanan hipofiz ekstrelerin, bu hayvanlara zerki hem ovaryumun gelişmesini ve hemde ovumların maturasyonunu stimüle eder (31).

6.2 Erkekler

Erkek Xenopus gonadotropin zerkiye hızla yanıt vermekte olup, hem ikincil cinsiyet karakteristikleri hemde spermiyogenez bu zerkten etkilenir. Robbins, Parker, Bianco(1947) gerek koyun ön hipofizinden, gerek insan koryonundan elde edilen gonadotropinlerin kurbağaların dorsal lenf torbasına zerkiyle sadece 1.5-2 saat sonra kloakadan sperm atılmasına neden olduğunu görmüşlerdir (31).

6.3 Gametogenez, Fertilizasyon ve Embriyonik Gelişimin Başlaması

Xenopusta primitif germ hücrelerinden gerek ovumun (oogenez) gerek spermatozoanın (spermatogenez) gelişmesi öncelikle mayotik bölünmenin gerçekleşmesini gerektirir ve ancak bu yolla kromozom sayısı yarıya indirilir (31).

6.3.1 Spermatogenez: Dışarı atılan sperm motil olmadığından kolayca görülemediği için, *Xenopus* spermelerini olgunlaştıkları zaman incelemek pek kolay değildir. *Xenopus*ta bir kısım spermelerin hareketsiz olmasının nedeni, bunlarda diğer amfibilerden farklı olarak seminal veziküllerin bulunmaması olabilir. Bilindiği gibi seminal veziküller testisi terkeden sperm depoları olarak işlev görürler. Sonuç olarak *Xenopus*'ta sperm mesanede birikecek ve burada idrardaki toksik materyale maruz kalacaktır (31).

Firket 1963'te koryonik gonadotropin zerk ederek testiste erken evreleri incelemiştir. Firket tıpkı memelilerde olduğu gibi iki tip spermatogoninin birbirinden ayırt edilebildiğini gözlemiş olup, bunlardan soluk renkli hücreler spermatosit giderken, koyu renkli hücreler periferik stem hücreler olarak kalmaktadır (31).

*Xenopus*ta spermatogenezin ultra strüktürel incelenmesi Kalt(1972) tarafından gerçekleştirilmiş olup, bu yazarlar öncelikle her iki cinstede primordial germ hücrelerinin büyük ve lobüler bir çekirdeğe sahip olduğunu görmüşlerdir. Bu görünüm 1971'de Al-Mukhtar ve Webb tarafından oogonia için yayınlanmıştır. Yani *Xenopus*ta spermatogonia primer germ hücrelerinden türemekte olup, Reed ve Stanley'in mitokondrilere ait kesif, granüler materyali hem germ hücreleri ve hem de spermatogoniada görmesi bu görüşü desteklemiştir. Bu yazarlar bu materyalin daha sonra sperm başındaki iri kromatid kütle yapıya inandıklarını (31).

Reed ve Stanley E. Mikrofotografılar ile spermatidlerin memeli testisindeki sertoli hücresine benzeyen ve folikül hücresine benzeyen ve folikül hücresi adı verilen besleyici hücreler içinde gruplar halinde geliştiğini görmüşlerdir (31).

Spermatid boyunun uzamasına uzun eksen boyunca yerleşmiş stoplazma içindeki mikrotübülün genişlemesi yardımcı etmektedir. Gelişmekte olan flajel taban bölümünde siliyer bir kök benzeri çatıya sahiptir. Gene aynı yazarlar *Xenopus*ta sperm başının diğer amfibilerden farklı olarak spiral biçimde olduğunu bulmuşlardır. *Xenopus* sperm motilitesi diğer amfibilerle karşılaştırılmamış ise de spiral kafa muhtemelen buna daha hızlı bir yüzme yeteneği sağlar. *Xenopus*'ta erkeğin pelvik amplexus pozisyonu, sperm yumurtaya ulaşabilmek için daha uzun bir mesafeyi aşmasını zorunlu kılmaktadır. *Xenopus*ta sperm yumurtaya gidişinin deri mukus katmanı tarafından kolaylaştırıldığı ileri sürülmüşse de bu olay deneysel olarak incelenmemiştir (31).

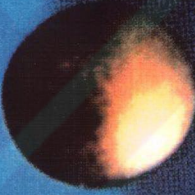
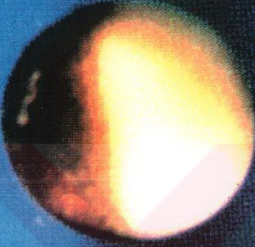
6.3.2 Oogenez: Gelişmekte olan oosit aşırı büyük oluşu ve stoplazmada yolk ve diğer maddeleri depolaması nedeni ile spermatositte çok daha ayrıntılı olarak incelenmiştir. İlk kez Balinsky ve Devis(1963) tarafından gerçekleştirilen oogenezin ultrastrüktürel incelenmesinde yazarlar; 150 mikron çapa kadar olan oositlerde (**Evre A**, Grant 1953) herhangi bir yol veya pigment bulunmadığını görmüş, yolk plateletlerinin ilk kez 300 mikron çaplı oositte (**Evre B**) ve hücrenin periferinde belirmediğini fark etmiştir. Oositler 325-450 mikron çapa ulaştığında (**Evre C**) yolk, periferden merkeze doğru ilerleyen bir şekilde yavaş yavaş belirmektedir. Pigment granülleri **Evre D**'de (475-750 mikron çap) ve oositler yolkla dolduğu zaman belirmeye başlar. Matur oositler (**Evre E**) 850-1000 mikron çaplı olup yüzeyde pigmentli bir kortikal granül katmanı halinde görülür(31).

Çekirdeğe komşu bölgede yer alan ve bulucusuna izafeten **Balbani cismi** denilen bir yer, yolk sentezinin merkezi olarak kabul edilmekte ise de tam olarak oluşmuş plateletler ilk kez periferde belirirler.

Balinsky ve Davis (1963) mitokondrilerin uçlarında yer alıp bariz şekilde mitokondrial aktivite sonucu oluşan, konsantrik zarımsı katmanlardan oluşmuş sferik cisimcikler görmüşlerdir. Bu zarımsı cisimcikler daha sonra yolk plateletlerin prekürsörleri olarak tanımlanmıştır.

Xenopus oositlerinin Balbani bölgesinde yer alan veziküllerden bazıları, Balinsky ve Davis'e göre granüler cisimcikleri yapmaktadır ve bunlar iki tip olup ince granüllü olan tip, daha sonra periferik yolku, kaba granüllü tip daha sonra pigmenti oluşturur (31).

Kurbağa yumurtası vitellus miktarı bakımından mesolesital, dağılışı yönünden hafif telolesital

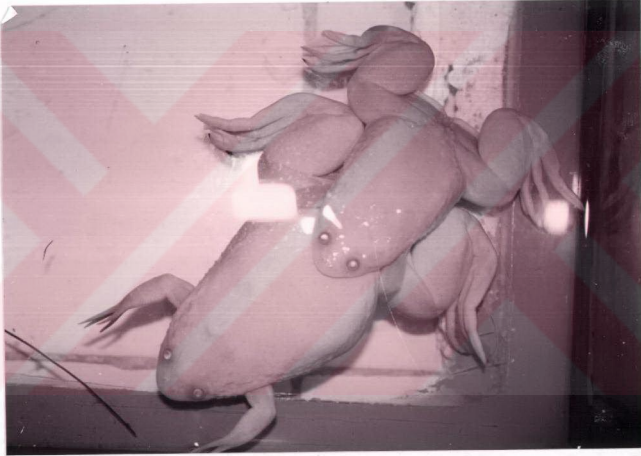


Şekil. 3 Oosit Evreleri



Şekil 3. Yumurtada A, B; C; D; E Fazları.

tiptedir. Vitellus vejetal kutupta toplanmıştır. Yumurta da dış görünüş yönünden çok koyu kısımlar animal, açık görünen ise vejetatif kutuptur. Yumurtadan çıktıktan sonra ilk dönemde embriyo hala tamamen serbest değildir. Bir süre kaldıktan sonra serbest hale gelir. Bu devredeki embriyoya iribaş (Tadpol) denir. İribaş devresi kurbağa türlerine göre birkaç aydan 2 seneye kadar sürebilir. Metamorfoz iribaşın ergin kurbağaya dönüşüm evresidir. Bu devrede çeşitli organ sistemleri daha fazla değişikliğe uğrar (26).



Şekil.4 Ampleksus halinde bir çift albino Xenopus

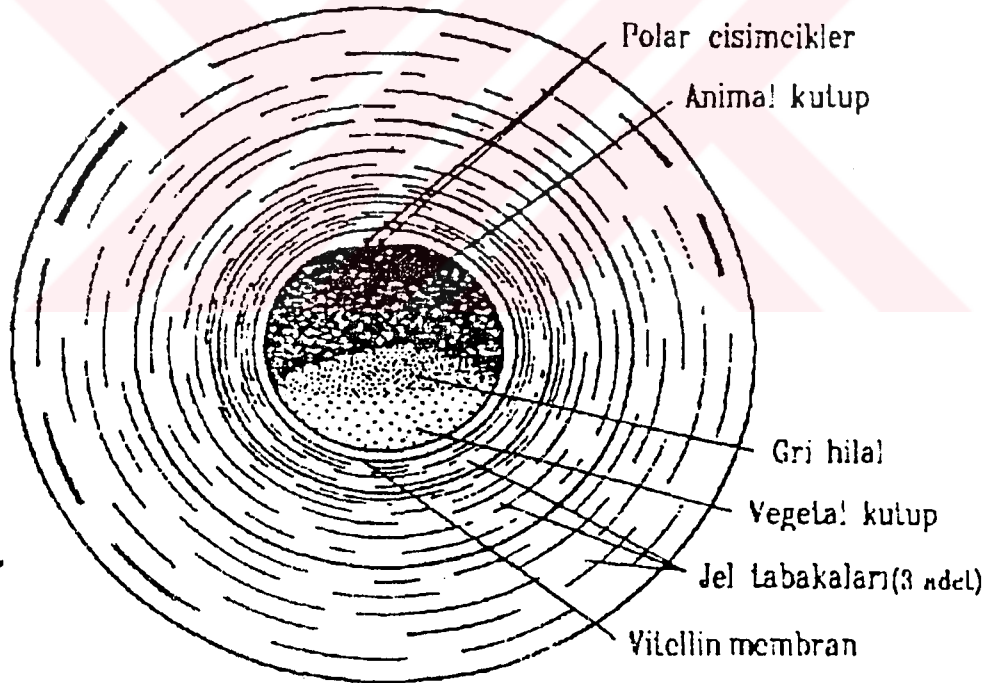
6.3.3 Fertilizasyon: Oositin yumurtaya dönüşmesinden önce 1. mayozu tamamlanması ve ovaryumda folikülden salınması zorunludur (31).

Bunlarda döllenme hipofiz bezinden salınan gonadotropik hormon miktarının artışı ile olur. Döllenmeye hazır dişinin kloakası kızarır, erkekte ön kol ve parmaklar kararır. Dişinin yumurtlaması için erkeğin yardımına ihtiyacı vardır. Erkek kurbağa, dişiyi sıkıca sarar ve onu yumurtlamaya zorlar. Dişi yumurtasını suya bırakınca, erkekte aynı anda spermalarını yumurta üzerine boşaltır ve sperm yumurtadan içeri girer (26).

Birinci mayoz tamamlandıktan sonra salınan oositte daha ileri olaylar spermin yumurtaya girişyle başlatılır . Diğer anuranlarda olduğu gibi Xenopusta da sekonder oosit yumurtlanmakta ve fertilizasyon eksternal olarak gerçekleşmektedir (31).

Spermatozoanın girişine yanıt olarak sekonder oosit tekrar mayotik bölünmeye uğrayıp, daha küçük ve sadece haploid kromozom seti içeren ikinci kutup cismini atmakta ve kendisi haploid pronükleus içeren bir yumurta halini almaktadır (31).

Yumurtanın etrafı yumurta membranına bitişik, kendisi tarafından salgılanan jel membranla çevrilidir. Yumurta hafif telolesitaldir ve vitellus vegetatif yarı kürede toplanır (26).



Şekil V. Yumurta zarları animal, vegetal bölge kutup hücreleri.

Spermanın yumurtaya teması ile sperm yapısında değişiklikler olur. Akrozom membranı, sperm plazmolemması (hücre zarı) ile birleşir, membranın parçalanması ile akrozom içeriği yumurtaya doğru fibril yada tüp şeklinde uzanır. Buna akrozomal filament denir. Sperm lizinleri bu filament vasıtası ile yumurtaya iletilir, böylece yumurta etrafında sekonder membranlar eritilir. Akrozomal filamentlerin yumurtaya temas ettiği yerde döllenme konisi oluşur. Sperm yumurta içerisine alınır. Sperm yumurtaya girince sperm pronükleusunda 180°'lik bir rotasyon görülür. Sonuçta sperm pronükleusu, yumurta pronükleusu ile birleşecekleri yere gelir. Sperm bölgesine girerken, sürüklediği pigment granüllerinden izlediği yol belli olur. Buna penetrasyon yolu denir (26).

Bir sperm yumurtaya girdikten sonra giriş yeri diğer spermilerin girmesini önlemek amacı ile derhal kapanır. Ayrıca spermanın girişinden sonra yumurtada oluşan fiziksel ve kimyasal reaksiyonlarda, spermilerin girişini engelleyen etkenlerdendir. Saydığımız tüm engellere karşı yumurtaya girmeyi başarabilen birden fazla sperm olursa, bunlar yumurtayı bölünmeye zorlar, kendileri de kısa süre sonra dejenere olur. Daha çok yaşlı yumurtalarda görülen polispermi olayı bölünme mekanizmasında karışıklıklara yol açtığından yumurtanın sitolizisine ve sonunda ölümüne neden olurlar (26).

Spermanın yumurtaya girişi sırasında önemli ve süratli iki olay olur:

1) Yumurtanın üzerini saran jel maddesinin süratle şişmesidir. Jel gelişmesinin ilk beş dakikasında kabarıklığın %30'unu, 15 dakikada %75'ini tamamlar. Bundan sonra gelişme yavaşlar ve sonuçta kalınlığı yumurta çapının 2-3 misli olur.

2) Spermin girişiyle yumurtada ani su kaybı olur . Su kaybı sonucu yumurta yüzeyi ve bu yüzeyi çevreleyen vitellin membran arasında perivitellin boşluk oluşur, burası perivitellin sıvı ile dolar (28). Bu sıvı oosit evresinden beri yumurta korteksinde bulunan kortikal granül içeriklerini boşaltmaları sonucu olur (38). Ve döllenmiş yumurtanın kolayca dönmesini sağlar. Olgun yumurtanın belli bir vitellus stoplazma oranı vardır (Vitellus çoğaldıkça bölünme hızı yavaşlar: Balfour kanunu) (26). Bu olay spermin yumurtaya sonraki 2.5-3.5 dakikada gerçekleşir. Daha sonra 10. dakikada yumurtanın animal hemisferinin yüzeyi üzerinde bal beteğine benzeyen mikrovilluslar belirir. Bunlarda izleyen yarım saat içinde ortadan kalkar (31).

Yerçekimi etkisiyle perivitellin sıvı içerisinde yumurta koyu pigmentli animal kutup üstte, vitellus dolu açık renk vegetatif kutup alta gelecek şekilde döner. Dönme işlemi laboratuvar

koşullarında bir saat sürer. Sperm yumurtaya animal kutuptan girer ve hemen yumurta pronükleusuna ulaşmaya çalışır. Spermin girişiyle aktive olan dişi pronükleusu ikinci mayoz bölünmesini tamamladıktan her iki pronükleusun birleşmesiyle döllenme olur (26). Ve eş zamanlı olarak yumurta korteksi öyle bir yer değiştirmeye uğrarkı; spermanın girdiği noktanın diametrik olarak karşısına gelen noktasına düşen noktasındaki hilal bölgesinde, kortikal pigment dispersiyona uğrar. Oluşan soluk renkli hilale Gri Hilal denir ve bu hilaller embriyonun gelecekteki sırtını belirler (31).

7. Toksikite

Yüzyılımızda çalışma hayatı, sosyo-ekonomik yapı yönünden olduğu kadar vasıtaları yönündende sayısız tehlikelerle dolu hale gelmiştir. Hızlı bir gelişim içinde bulunan endüstri, binlerce kimyasal ve solvan-toksik maddeyi beraberinde getirmiş, tarımsal alan tabiatın verdikleriyle değil, ilmin kattıkları (insektisit, fungusid, rodendisit gibi) ile hasat edilen tehlikelerle dolu bir harman yeri olmuştur. Evlerimizde yapılan tüm işler kozmetik, deterjan, demülsan maddelerle görülür hale gelmiştir. Tıp, sağlık dünyasına yeni ilaç silahlarını hızla sürmekte ve insan bu hızlı vasatta, bunalım ve uyumsuzluğun sonuçlarına yine bu yoldan (hipnotik, sedatif, tranklizan) çare aramaktadır (34).

Toksikoloji dünyadaki zehirleri canlılara etkileri, nüfuz etme yolları, korunma ve tedavi yöntemleri ile birlikte inceleyen bilim dalına denir (11). Günümüz insanının içinde yaşadığı ortamda yaklaşık 50-70 bin kimyasal madde yer almakta olup, her yıl bu sayıya 300 civarında yeni kimyasal madde eklenmekte, bu maddelerin çoğu şu veya bu yolla doğal çevreye sızıp , insan ve diğer organizmalar için ciddi bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Kaldı ki modern teknoloji sonucu çevreye sızan ve yaşanan ortamı kirleten etmenler kimyasal maddelerle kısıtlı olmayıp, fiziksel kirliliklerde (ses, duman, koku, radyoaktivite v.b) bu kirleticilere eklenmekte ve çağdaş tüketim toplumlarında doğal kirlilik giderici sistemlerin giderek yetersiz kalmasıyla kirlenme çok daha ciddi boyutlara ulaşmaktadır (29).

Çevre kirliliğine yol açan etmenlerin bütünüyle ortadan kaldırılması, modern teknolojinin sağladığı refahın sürdürülmesi açısından pratik olarak mümkün değildir. Bu durumda çevre kirliliğini yok etme yerine, bu kirliliğinin göstergelerinin belirlenmesi, kirliliğin kontrol altına alınması ve boyutunun denetlenebilmesi önem kazanmış olup çevre kirliliğinin yok edilmesi

yerini kontrol edilebilir bir çevre düşüncesine bırakmıştır (29).

Toksik etkileri akut, kronik, gecikmiş etki etki olarak 3 ana gruba ayırabiliriz:

7.1 Akut Etki: Canlının kirlilikle karşılaşmasını hemen izleyerek gelişen patolojik yanıt olup, psikolojik sıkıntıdan ölüme kadar değişen tablolar ortaya çıkar ve acil tedavi gerektirir. Bu gibi tablolarda temel etmen genellikle iyi bilinmekte olup, bu etmenlerin varlığının saptanması ve bu saptamada kullanılacak yöntemlerin belirlenmesi genellikle amaç için yeterli olmakta ve koruyucu önlemler kolayca alınabilmektedir (29).

7.2 Kronik Etki: Çevreden kaynaklanan kronik etki genellikle akut etmenlerin daha düşük dozda ve/veya daha uzun süre temas etmesi halinde ortaya çıkmakta olup, beliren tablo başlangıçta akut etkiye bağlı olarak beliren bulguların daha düşük şiddette olması veya görülmemesi ile karakterizedir. Sonuç olarak başlangıç evresinde zararsız olan bu etki kirlilik etkeniyle temasın devam etmesi halinde;

a) Giderek artan kirliliğin akut tablo oluşturacak seviyeye ulaşması,

b) Kirlilik etkeninin organizmada işlenmesi sonucu ortaya çıkan ara metabolitlerin zararlı olması,

c) Kirlilik etkenine bağlı olarak kronik tabloların oluşmasına yol açar (29).

Akut temasa oranla başlangıç bulgularının çok hafif olması ve hatta ölüme yol açmaması bir üstünlük sağlıyor gibi görünmekle beraber, kronik temaslar hem zaman zaman ölüme yol açmaları, hemde hemde akut temasa oranla geri dönüşümsüz ve tedavisi mümkün olmayan hastalıklara yol açmaları nedeni ile akut formdan daha tehlikelidirler. Kronik etkide de kirlilik saptanmasında kullanılacak yöntemlerin belirlenip geliştirilmesi ve bunların yol açtığı tabloların tarif edilerek olaya maruz kalan bireylerde uygulanacak koruma ve tedavi yöntemlerinin saptanması gereklidir (29).

7.3 Geç Etki: Çevre kirliliğinin en tehlikeli yönü gecikmiş etki başlığı altında toplanan etkidir. Gecikmiş etki temelde kronik etki ile aynı özelliklere sahip ise de bu etkiyi akut ve kronik etkiden ayıran en önemli yön, akut ve kronik etkide olaya maruz kalan bireyin tek canlı olmasına karşın, gecikmiş etkide gelecek kuşakların sağlığının ciddi bir tehdit altında kalmasıdır. Bir başka deyişle akut ve kronik etki sadece bireyi ilgilendirirken, geç etki o canlıdan gelecek ve sonraki kuşağı oluşturacak yeni nesli vurmaktadır. Mutajenik veya

Teratojenik adı verilen bu kirliliğin saptanmasında, tıpkı akut ve kronik etkiyle ilgili olarak verilen bilgilerde olduğu gibi; kirlilik etkeninin saptanması ve bunun saptanması için kullanılacak yöntemler önem taşırlar. Ancak mutajen ve teratojen maddenin zaman zaman bireyde hiçbir akut ve kronik etki göstermemesi ve etkilerinin ancak gelecek kuşakta ortaya çıkması, bu maddeleri her iki yönden en tehlikeli sınıfa dahil etmektedir. Bu durum araştırmacıları embriyo teratogenesis üzerine yoğunlaştırmıştır (29).

Bu yüzden çeşitli Test sistemleri geliştirilmiştir.

7.4 Ames Testi

Konunun insan sağlığı açısından taşıdığı önem nedeni ile kirlilik etkenlerinin mutajen, teratojen veya karsinojen etkiye sahip olup olmadığını belirlemek için bu güne kadar yoğun çalışmalar yürütülmüş olup örneğin ; hızlı ve ucuz mutajenite tarama testi olarak 1975'te **Ames Testi** geliştirilmiştir (1).

Yazarlar daha önce kimyasal mutajenleri saptamak için çok duyarlı ve basit bir bakteri testi geliştirmiş olup, incelenen maddeler petri plaklarında *Salmonella typhimurium*'un çeşitli özgün mutantları ile incelenmektedir. Bu test petri plaklarına sıçan veya insan karaciğer homojenatlarının direkt eklenmesi ile potansiyel insan karsinojen veya mutajenlerinin saptanmasında kullanılacak şekilde yeniden düzenlenmiş olup, bu yolla memeli metabolizmasının önemli bir komponenti invitro test sistemine eklenmiş olmaktadır (1).

Ames testi; yolu ile metabolik aktivasyon gerektiren çok çeşitli karsinojenlerin mutajen olarak deteksiyonu mümkün olabilmıştır.

Büyük bölümü bu testle elde edilmiş önemli miktarda kanıt bir kaç istisnası bir yana bırakılacak olursa, karsinojenlerin aslında mutajenler olduğunu ortaya koymaktadır. Bu ise insanoğlunun maruz kaldığı binlerce kimyasal madde arasında, potansiyel olarak tehlikeli kimyasal maddelerin taranabilmesi için, hızlı ve ekonomik bir test sisteminin geliştirilmesi gereğini destekler(1).

Bu güne kadar incelenen karsinojen ve non karsinojenlerin %85 kadarının mutajen olduğu saptanmıştır. Bu grubun içinde direkt alkilleştirici ajanlar, nitroz aminler, polisiklik hidrokarbonlar, fungal toksinler, aromatik aminler, nitrofuran karsinojenler, adriamisin, daunomisin ve mitomisin C gibi çeşitli antineoplastik ajanlarla antibiyotik karsinojenler bulunmaktadır (1).

7.5 1982'de Sadler tam embriyo kültüründe teratojeniteyi incelemiştir. Organojenez

periyodunun büyük bölümü boyunca tam embriyo kültüründe tutulmuş fare ve sıçan embriyolarında, erken somit evrelerinde normal gelişme ve morfogenez saptanmıştır (37).

Kimyasalların prognostik teratojenik ve embriyotoksik etkilerini ortaya koymak ve doğru tarama sistemi geliştirmek için çok çeşitli girişimlerde bulunulmuştur.

Sadler bu amaçla **tavuk embriyosu** kullanıldığını ve avian embriyolarının daima memeli organ sistemleri gibi yanıt vermediğini, ayrıca tavuk embriyosunun, memeli türlerine göre birçok kimyasal ve fiziksel manipulasyona çok duyarlı olduğunu ifade etmiştir (37).

Yapılan araştırmalarda hücre kültürlerinin çok geniş madde grubunun teratojenisitesini önceden kestirmede yeterli oldukları kanıtlanmıştır. Fakat en iyi hücre hatlarının dahi memeli embriyoları ile uzaktan ilişkisinin olup, hücre kültürlerinden elde edilen bilgilerin invivo memeli gelişmesine nasıl uygulanacağı konusunda ciddi kuşkular olduğunu yazmıştır. Kaldı ki bu sistemlerin görülebilecek malformasyonların tipi hakkında hiçbir ön bilgi sağlamadıkları gibi, belli bir maddeye karşı embriyogenezin hangi basamağının özellikle duyarlı olduğu konusunda herhangi bir bilgide sağlamamakta olduğunu ve son olarakta hücre kültürleri ile invivo çalışmaların birbirine benzememesi nedeni ile kullanılacak madde dozunun ne olacağının tartışmalı olduğunu yazmıştır (37).

Sadler tam embriyo kültürü deneyinde; kültür ortamında direkt olarak teratojenlere maruz kalmış embriyolarla, toksik bileşiklere maruz bırakılmış erişkin hayvanların serumunda kültüre edilmiş embriyolar, invivo koşullarda aynı ajanla oluşturulmuş malformasyonlara benzeyen konjenital anormalliklere neden olmuştur. Üstelik bu defektler doz ve evreye bağımlı tipte olup daha yüksek dozlar; daha yüksek yüzdede malforme embriyo yaratırken, genç embriyolar yaşlılardan daha duyarlıdır (37).

Bu sistemlerin kimyasal bileşiklerin teratojenisitesini ön görmede potansiyel olarak değerli olabileceğinin gösterilmesine karşın, uygulamaya alınan bir diğer yaklaşım memeli embriyolarının in vivo habitata benzer bir ortam içinde kültüre edilmeleri, hücre ve organ kültür yöntemlerinin kolay, yinelenebilir, ucuz v.s gibi niteliklerinden yararlanmadır. Böyle bir sistem elde mevcuttur. Bu yöntem memeli embriyolarını invitro koşullarda organogenezin büyük dilimi boyunca, yani teratojenik periyod esnasında yaşatabilmektedir. Üstelik bu evrede gelişim normal ve invivo koşuldakine benzer hızda devam etmektedir.

Son olarak büyük sayıda embriyo günümüzde kullanılan tipik invivo testlerden önemli ölçüde

daha ucuza hayatta tutulabilmektedir (37).

Geride kalan tek soru ise bu yöntemin çevresel ve farmasotik bileşiklerin teratojenisitesini hangi oranda doğru şekilde yansıttığıdır (37).

7.6 Drosophila Testi: Schuler 1982'de kimyasalların teratojenisitesini saptamada Drosofilayı kullanmıştır.

Yukarıda da değinildiği gibi piyasada beliren yeni kimyasal maddelerin klasik memeli teratojenite testleri ile komplet olarak incelenebilmesi karışık dölleme işlemi, test protokolu, eğitimli personel gereksinimi ve fiyat açısından pratik olarak mümkün değildir (38).

Mevcut kimyasalların geriye doğru değerlendirilmesi ise bu testleri daha şimdiden tıkanmış haldedir. Bu nedenle araştırmacılar zararlı maddeleri olabildiğince çok hızlı sayıda ve hızlı şekilde tarayabilmek için yeni test sistemleri geliştirme çabasındadırlar (38).

Zararlı maddeleri olabildiğince hızlı şekilde gerçekleştirebilen **Drosophila**; ideal bir materyaldir. Wilson'a göre nisbeten kısa bir zaman dilimi içerisinde çok sayıda yavrunun ekonomik olarak üretilmesi, drosofilanın incelenen kimyasalları absorbe etme , dolaşımına alma, metabolize ve ekstrete etme yeteneğine sahiptir. Bu testin yeni bir rutin yöntem olarak kabulünden önce bazı faktörlerin çözülmesi şarttır. Teknik becerinin 2 haftada kazanılmasına karşın, nesnellik derecesi ve/veya görme hecerisi kişiden kişiye değişmektedir. Derecelendirme yapılırken belli bir belli bir manuplasyon kazanılması zorunludur. Kör değerlendirme ideal ise de kontrol şişelerinin işlem görmüş şişelerden çok farklı olması nedeniyle bu mümkün değildir. Solubilibite problemi de mevcut olup sadece suda veya etanolde azami 0.25ml/şişe çözünen maddeler kullanılabilir. Çözgen olarak kullanılan maddelerinde etkisi olduğundan drosofilada alınan sonuçların yorumlanmasında çok dikkat etmek gerekir (38).

7.7 Planarya testi: Best 1982'de invitro teratogenezis için model olarak Planaryayı seçmiştir. Planarya gibi serbest yüzücü yassı kurtların laboratuvarında kültürü, bakımı ve toksikolojik testlerde kullanılması oldukça ucuzdur (3).

Yapılan çok sayıda temel araştırma **planaryaların** biyokimyasal ve fizyolojik organizasyonlarının birçok yönden memeliler gibi yüksek hayvanlara benzediğini ortaya çıkarmıştır. Bu özellikler arasında çok iyi gelişmiş bir beyin ve değişken davranışlar

bulunmakta olup, bu hayvanlar av yakalama için karmaşık manevralar yapabilmekte, öğrenebilmekte ve memeli beyinde mevcut birçok nörotransmitteri kullanmaktadır. Planaryalar memelilerle aynı şekilde çeşitli toksik maddelere duyarlıdır. Diferansiye olmamış totipotent stem hücreler yani neoblastların varlığı, bunların mitozla uğrayıp çeşitli özgün hücre tiplerine diferansiye olabilmesinden ötürü planarya parçalarından komplet planarya regenerasyonuna izin vermektedir. Keza bu hücreler non-rejenere planaryalarda normal selüler dönüşüm sırasında kaybedilen normal hücrelerin yerine ikame olmaktadır. Hem cerrahi parçaların regenerasyonu hemde tüm planaryada aberan yeniden modellenme; embriyogenezin önemli özelliklerine model vasfı taşımakta ve bunları teratojenlerin incelenmesinde potansiyel olarak kullanılabilir hale geçirmektedir (3).

7.8 Hydra, Dugesia Testi: 1985'de de Sabourin Dugesia (planarya), Hydra ve Xenopusta invitro teratogenez testinin değerlendirme sonuçlarını ele almıştır(46).

Hydra ve Xenopus testlerinde gereken test protokolleri Johson(1982) ve Dumont(1983) tarafından geliştirilmiştir. Dugesia için yapılan protokolde şu noktalara dikkat edilmiştir:

1. Testin azami süresi olup; kontrol planaryalarının regenerasyon süresine bağımlı olarak bu süre 14 gün olarak saptanmıştır.

2. Genel toksik etkiler ile regenerasyon üzerine olan özgün etkiler arasında daha ileri bir ayırım sağlamak için intakt yassı kurtlar, regenere olan yassı kurtlarla birlikte analize alınmıştır (39).

3. Planaryalar grup yerine bireysel olarak test kimyasalına maruz bırakılmış ve derecelendirme gün temeline göre yapılmıştır (39).

Sabourin , **Dugesia(planarya), Hydra ve Xenopus** un değerlendirme sonuçlarını ele almıştır. Elde edilen sonuçlar bu üç testte bitim noktalarının birbirinden önemli derecede farklı olduğunu ortaya çıkarmıştır (39).

Hydra testinde yapay embriyo ve intakt organizmanın dissolüsyonu regenerat ve intakt bireyler arasında toksisitenin mukayesesi için evet veya hayır türü sonuç vermiştir. Burada bildirilen Hydra testi bir mitoz inhibitörü olan (Ferm 1963) vinblastin ile bir DNA sentez inhibitörü (Scott 1971) olan Hidroksi ürenin memeli teratojenleri olduğunu doğru şekilde saptamıştır (39).

Dugesia sisteminde en fazla gelecek vaad eden bitim noktaları, göz noktalarının belirmesi

gibi identifiye edilebilir gelişme markırlarına ulaşma süresidir. Best ve Morita Metil merkürü ve etanol gibi kimyasallara maruz bırakılmış rejenera olan planaryalarda gözlenen morfolojik anormallik ve gelişme retardasyonu örneklerini rapor etmişlerdir. Sabourin ve arkadaşları da maruziyet sırasında gelişen morfolojik anormallikleri farketmişlerdir, fakat bu tip yanıtların frekansı bunun bir toksikolojik araç olarak kullanılmasına izin vermeyecek kadar küçüktür. Teratolojik taramada Dugesianın kullanılması sonuç olarak gelişme markerlarının elde edilebilip incelenmesine bağımlı olacaktır. Alınan sonuçlar 1-2 gün kadar küçük bir gelişme ile elde edilen gelişme evrelerinde, bireysel rejeneratlar arasında gözlenen böylesine düşük bir çeşitliliğin; ileri derecede anlamlı olduğunu ortaya koymuştur. Bu da testin toksisitesinin deteksiyonunda duyarlı bir araç olabileceğini onaylar. Öte yandan büyük sayıda test kimyasalı kullanarak alınan yanıtların mukayesesi ile mevcut ilişkinin daha ileri boyutta incelenmesine olan gereksinim burada da mevcuttur (39).

Xenopus embriyosunun Dugesia ve Hydra sistemlerine üstünlüğü olup bunun nedeni toksikoloğa çok sayıda bitim noktası sağlamasıdır (39).

7.9 Xenopus Testi:

Yukarıda anlatıldığı gibi çeşitli maddelerin toksik, karsinojen ve teratojen etkilerini saptayabilmek için bir çok test sistemi geliştirilmiştir.

Bu etkilerden teratojen ve mutajen etkinin o canlıdan gelecek ve sonraki kuşağı oluşturacak yeni nesle yönelik olması; araştırmacıları embriyoteratogenesis üzerine yoğunlaştırmıştır (29).

Sonuçta embriyo teratojenisini tesbit için FETAX testi (Frog Embryos Teratogenesis Assay: Xenopus) geliştirilmiştir.

Amfibi embriyoları üzerine çeşitli kimyasalların teratojenik etki yaptığı daha 1956'da (43) saptanmış ve amfibi embriyolarının çeşitli kimyasalların teratojenik ve toksik potansiyellerinin saptanmasında yeterince güvenilir olarak kullanılabileceği çeşitli araştırmacılar tarafından ileri sürülmüş (4,12) ve Greenhouse kurbağa larva ve embriyolarını kullanarak, içme suyunda bulunan çeşitli kimyasalların teratojenik etkisini ortaya çıkartacak bir testin ilk adımlarını atmıştır (20-21).

Hızlı ve güvenilir bir teratojenisite testi olarak Xenopusların ve embriyolarının

kullanılması ilk kez Greenhouse tarafından yapılmış, çeşitli gruplar testin geçerliğini analiz etmişlerdir (2,3,7,13,14). Çevre kirliliğinde kullanılacak testlerin ne gibi özelliklere sahip olması gerektiği 1982'de Kimmel ve arkadaşları tarafından özetlenmiş (39 a göre), Dumont tarafından verilen isimle (14,15,16 e göre Dumont) FETAX testi bu ön şartları büyük ölçüde karşılamaktadır. Ayrıca, Xenopusta görülen mutantlar da incelenmiştir. Bu testin metabolik aktivatör sistemide eklenecek şekilde geliştirilmesi ile (8, 14, 15, 16, 18, 19, 21,39) bu gün için teratojenik etkinin saptanmasında kullanılan en güvenilir standart test elde edilmiştir.

8. Lityum Bulunuşu ve Kullanılışı:

FETAX testini gerçekleştirmek için **Lityum** tuzu seçilmiştir. En hafif metal olan lityum Berzelius tarafından keşfedilmiş ve ilk olarak kayalarda bulunduğundan bu ad verilmiştir. Lithos, yunanca taş anlamına gelir. Lityum toprakta organik materyellere bağlı olarak bulunmaz. Kural olarak organik topraklarda düşük miktarda bulunur. Son yıllarda lityum insan psikiyatrisinde özellikle manik depresif psikozunda kullanılmakta ve agresifliği azaltarak etki göstermektedir. Hayvan ve insanda veterinerlikte terapötik ajan olarak kullanılması için çeşitli girişimler vardır (40).

Uzun zamandır lityumun amfibi türlerinde larval vücudu etkilediği bilinmektedir (5, 6, 9, 10, 27, 40, 41, 42, 45).

Pascale ve Leroy; Xenopus'un Hox 2 kompleks gene sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu kompleks memelilerde de bulunup; her ikisinde de erken gelişme evresinde genlerin ardışık ekspresyonunun zamansal ve uzaysal kaidelerini sağlar. LiCl ve retinoik aside Xenopus embriyosunun muamelesinin vücudun aksiyal paternini değiştirdiği bilinmektedir. Embriyodada posterior yapı redüksiyona uğradığında ön yapılar büyür ve ucu kesikmiş gibi olur. LiCl'ün Hox geni üzerine dramatik bir etkisi vardır. Bu madde gastrulasyon ve erken nörolasyon süresince ekspresyonu süprese etmektedir. Bununla beraber daha sonra genlerin ekspresyonu yeterli düzeye ulaşır. Hox gen ekspresyonunun kontrolünde 2 fazın varlığı ileri sürülmüştür. Bu çalışmada veriler Xenopus laevisin Hox 2 kompleksinin, memeli Hox 2 kompleksi ile benzer genomik organizasyona sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu kompleks memeli ve amfibilerde yaklaşık 350 milyon yıl önceden kuvvetle korunmuştur. Memelilerde Hox 1.3 ve 4'ün Xenopusla aynı

olup olmadığı henüz bilinmemektedir (30).

Literatürde verilen çalışmada 0.12 M LiCl'e maruz 32 hücreli evrede maruz bırakılan embriyolardaki anomaliler gösterilmiştir. LiCl muamelesiyle elde edilen sonuç; Li'a maruz kalan embriyoda Hox gen ekspresyonunun normal embriyodan 1 saat sonra başlamasıdır. LiCl'ün sekonder messengerlere sinyal taşıma yolunu bloke ederek etki gösterdiği düşünülmüştür. LiCl'ün erken evrede muamelesi mezoderm indüksiyonunu değiştirir. Hox geninin geç gelişen aksis paterni ile ilgisi yoktur, çünkü LiCl muameleli embriyolarda gövde ve kuyruk eksiktir (27).

William Busa, LiCl'ün teratojen etkisinin polifosfoinositol siklus veya diaçilgliserol analogu aracılığı ile önlenebileceğini ileri sürmüştür. Lityum klorürün 32 hücreli evrede müstakbel ventral blastomer mikroenjeksiyonu, Xenopus embriyosunda notokord, nöral tüp, gözler gibi dorsal anterior yapının duplikasyonuna yol açmıştır(6).

Literatürde rapor edilen Li'un teratojen etkisinin polifosfoinositol siklusun ara ürünü olan miyoinositolün eşit molar koenjeksiyonu ile önlenbildiğidir. Yapılan çalışmalar sonucunda miyoinositolün koenjeksiyonu ile Li'la muamele edilmiş embriyolarda enjekte hücrelerin blok bölünmesi veya intrasellüler hücrelerin Li'un depresyonundan kurtulabileceği ortaya çıkmıştır (6).

Steven yaptığı çalışmada lityumun teratojen olduğunu bulmuştur (42).

Cook lityumun teratojen etkisini saptamak için 0.125 M LiCl'de 64-128 hücreli fazda 45 dakika veya 0.25 M LiCl'de 9-12 dakika muamele ederek gelişen anomalileri derecelendirerek 5 gruba ayırmıştır (10).

Ayrıca Kao ve ark. da 0.3 M LiCl'e 5- 10 dakika muamelede oluşan anomalileri 5'e ayırmışlardır. Maksimal Lityum duyarlılığının 32- 128 hücreli evrede olduğunu ve fertilizasyondan 6 saat sonra muamelenin MBT' de dorsoanterior redüksiyona yol açtığını belirtmişlerdir(Yamaguchi ve Shinagawa'ya göre 25).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada *Xenopus* cinsi kurbağalar kullanılmıştır. *Xenopus* embriyoları bir tarama testi olarak çok büyük avantajlara sahiptir. Kurbağa embriyosu klasik bir gelişme sistemi oluşturmakta olup, bir çok gelişme süreci memeli embriyolarında gördüğümüz süreçlerle aynıdır. Hormonla indükte edilerek yılda pek çok kez çiftleşme yaptırılabilir ve farklı gelişme evrelerindeki gelişme harici olarak malformasyon analizi için hayvanı tahrip etmeden kolayca incelenebilir. Bitim noktalarının çoğu 96 saat içinde kolayca ve nicel olarak değerlendirilebilir. Ayrıca *Xenopus* laboratuvarında cansız yemle beslenebilmektedir. Tüm mutantları bilinmektedir. Döllenme ekstra uterin olup gelişme eksternaldir. Herhangi bir fazdaki malformasyon mikroskopta kolayca tayin edilebilir.

1. Bakım ve Beslenme

*Xenopus*lara barınak olarak camdan yapılmış 95x60x44 cm boyutlarında akvaryumlar kullanılmıştır. Kullanılan su 3-4 gün ağzı açık kaplarda dinlendirilip klordan arındırılmış sudur. Bu su analiz edilmiştir. Analiz sonuçları şöyledir: Cu: yok, Zn: 0.2ppm, Mg:2.5ppm , Ca: 1.5mmol/L, Sertliği: 130 CaCO³ mg/L, PH:7.0.

Su seviyesi 5 cm olacak şekilde akvaryuma su konmuştur.

*Xenopus*ların beslenmesi haftada iki defa yapılmış, dönüşümlü olarak tavuk ciğeri ve alabalık yemi verilmiştir. İndüklemenden önceki bir kaç hafta, 2 günde bir ciğerle ad libidum beslenmiştir. Akvaryumlar düzenli olarak temizlenmiştir.

Oda ısısı 23±3 °C' de tutulmuştur. Normal ışık periyodu kullanılmıştır.

Elde edilen larvalarda beslenme 5. gün başlatılmış, ıspanak püresi ile her gün besleme yapılmış, kaplar her gün temizlenmiştir. Larva ve iribaşlar 35 x27 x15 cm. olan üstü tel kapakla örtülü plastik kaplarda tutulmuştur. Ayda bir yeni filizlenmiş buğday yaprağı+ marul yaprağı hafifçe kaynatılıp gazlı bezle süzülerek hazırlanmıştır. Kullanılan bu sebzeler bitki koruma ilaçlarından korunmak için iyice yıkanmıştır. 3 haftalık olunca iribaşlara yumurta sarısı, ezilip gazlı bezle süzülmüş tavuk ciğeri, toz alabalık yemi vermeye başlanmıştır. Başkalaşımından sonra beslenmeye tavuk ciğeri ezmesi ve toz alabalık yemi ile devam edilmiştir.

Çünkü başkalaşımdan sonra Xenopuslar karnivor olmaya başlarlar. Bunun en iyi kanıtı barsakların kısılmasıdır.

2. Hayvanların İndüklenmesi

FETAX testine başlamadan önce Xenopus cinsi kurbağalar laboratuvarımıza ilk kez getirildiğinden, bu hayvanların laboratuvar koşullarına uyumunu sağlamak amacı ile bakım ve besleme parametreleri incelenmiştir.

Bu parametreler sıcaklık, beslenme, mekan faktörü, havalandırma, rastgele alınan yumurtalarda dölllenme oranı, aynı indüklemeye saat başı toplanan yumurtalarda gelişim faz farklılıkları, kaptaki iribaş sayısına bağlı faz farklılıkları (mekan faktörü) dır.

Bu çalışmalarda embriyo elde etmek için dişiye 1000 I.U human Chorionic Gonadotropin (hCG), erkeğe 500I.U hCG dorsal lenf bezlerine enjekte edilmiştir. Erkek ve dişi aynı üreme kabına konup, üzerleri örtülmüştür. Amplexus genelde 2-4 saat sonra başlamış, yumurta dökme ise 8-14 saat sürmüştür. Yumurtalar akvaryumdan ucu geniş plastik pipetle 20 cm'lik cam kaplara alınmıştır. Döllenmemiş veya dölllenmiş ama normal bölünmeyen yumurtalar ayrılmıştır.

3. Deney Grupları ve Değerlendirilen Parametreler

3.1 Sıcaklık : Bu parametrenin incelenmesinde; kontrol grubu 20-22°C de, deney grubu 24-26°C de tutuldu (n=482).

3.2 Besleme: Beslenme parametresinin incelenmesinde; kontrol grubu haftada iki kez, deney grubu her gün beslendi (n=270).

3.3 Havalandırma: Bu parametrenin incelenmesinde; kontrol grubunda akvaryum suyundan hava geçirilmezken, deney grubundan sürekli hava geçirildi (n=450.)

3.4 Randomize Alınan Yumurtalarda Dölllenme oranı: Döllenenin hangi oranda olduğunu tespit için, 11 kaba 20'şer adet yumurta rastgele alınmış ve mikroskopta incelenerek döllenmişlik oranı saptanmıştır (n=270)

3.5 Mekan Faktörü: Mekan faktörü parametresinin incelenmesinde; larvaların gelişimleri üzerine etkisini incelemek amacı ile aynı indüklemeye elde edilen 2 ayrı yumurta

grubu n=273 ve n=38 olacak şekilde 35x 27x15 cm. olan plastik kaplara su seviyesi 2-3 cm. olacak şekilde konulmuştur. Gelişim evreleri 3 ay incelenmiştir.

3.6 Aynı İndüklemeye Saat Baş Toplanan Yumurta Grupları Arasındaki Evre Farkları : Bunu tespit etmek üzere yumurtalar 5 ayrı gruba ayrılmıştır. Bu çalışmada yumurtlama 8 saat sürmüştür. Bu yumurtalar 5 ayrı gruba n=273, n=233, n= 237, n= 246, n=38 olacak şekilde yerleştirilip, 3 ay süresince gelişim evreleri incelenmiştir.

3.7 Lityumun Xenopus Embriyosuna Etkisi: Lityumun Xenopus üzerine yaratacağı teratojeniteyi saptama çalışmalarında çeşitli literatürlerden yararlanarak pilot çalışmalar yapılmıştır.

Bu çalışmalarda Xenopus dişi ve erkeğine aşırı dozda hCG vermenin aşırı ve olgunlaşmamış yumurta verdiğini görüldüğünden, zerk dozu azaltılmıştır.

Tüm pilot çalışmalarında dişiye 600 I.U hCG, erkeğe 400 IU hCG dorsal lenf bezlerine enjekte edilip , üreme kabına alınmıştır.

3.7.1 Pilot Çalışma 1: Bu çalışmaların birincisinde elde edilen embriyolar mikroskopta incelenip , normal döllenmişler ayrıldıktan sonra embriyolar 2 hücreli; 4 hücreli ve 8 hücreli evrelerde, 0.4 M LiCl'a 5 dakika ,0.3 M LiCl 'a 6 dakika maruz bırakılmıştır. 4 gün sonra bu larvaların baş ve kuyruk uzunlukları ölçülmüştür. Anomaliler derecelendirilmiştir.

3.7.2 Pilot çalışma 2: İkinci çalışmamızda deneylerimiz 5 kez tekrarlanmıştır. 6 ayrı konsantrasyonda 30'ar adet normal döllenmiş embriyo, 2-4 hücreli evreden sonra 4 saat evre 7'ye kadar LiCl'a maruz bırakılmıştır. 4 saat sonra embriyolar saf su ile yıkayıp LiCl'den arındırıldıktan sonra, Fetax çözeltisine (kontrol) konmuştur. 24, 48, 72 ve 96. saatlerde ölenler ayrılmış ve malformasyon gösterenler kaydedilmiştir. 4. gün sonunda larvaların baş ve kuyruk uzunluğu ölçüldü. Anomaliler değerlendirilip her anomalinin görülme yüzdesi hesaplanmıştır.

3.7.3 Pilot çalışma 3: Üçüncü pilot çalışmamızda ise 9 ayrı konsantrasyonda, Evre 7-8 den sonra 96 saat LiCl'e maruz bırakılan embriyolarda oluşacak anomaliler gözlemlendi. İndüklemeye yolu ile elde edilen embriyolar, evre 7-8'de kimyasala maruz bırakılmıştır. Her 24 saatte bir olmak üzere, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde ölenler ayrılıp, anomaliler kaydedilmiştir ve 96.saat sonunda yaşayan embriyoların baş-kuyruk uzunlukları ölçüldü; % 5'lik formalin içinde tesbit edilmiştir.

3.7.4 FETAX TESTİ: Fetax testini gerçekleştirmek için dişiye, yumurta eldesi istenen günden 2-3 gün önce 35IU follikül stimulan hormon enjekte edilmiştir. 2 gün sonra aynı dişiye 400IU hCG ve çiftleştirilecek erkeğe de 300IU hCG dorsal lenf torbasına enjekte edilmiştir. Erkek ve dişi biraraya konulmuştur. Erkeğin döllemeye hazır olduğu ön ayak parmaklarında siyah yapışkan kılların belirmesi ile; dişinin ise pupillasında kızarmasıyla tesbit edilmiştir. Bir araya konulan çiftte amplexus 2-6 saat içinde meydana gelmekte olup; amplexusu izleyen 10-16 saat içinde yumurta bırakma gerçekleşmiştir.

Çiftleşmeden sonra erişkinler ve mevcut artık materyal akvaryumdan çıkarılmış ve yumurtalar ucu geniş pastör pipeti ile 20 cm, çaplı cam kaplara toplanmıştır. Embriyoların jel kılıfları çıkarılmamıştır (Dumont'a göre). Normal gelişme gösteren embriyolarla, nekrotik yumurta ve anormal yarıklanma gösteren embriyolar çıkarılarak, deneyde sadece normal yarıklanma gösteren embriyolar kullanılmıştır.

Tüm pilot çalışmalarda ve asıl testimizde kontrol çözeltisi olarak, Fetax testi için geliştirilmiş **FETAX** çözeltisi kullanılmıştır (14).

Bu çözeltinin içeriği:

625 mg	NaCl
96 mg	NaHCO ₃
30 mg	KCl
15 mg	CaCl ₂
60 mg	CaSO ₄ .2H ₂ O
75 mg	MgSO ₄
1000 ml	deiyonize distile su

şeklindedir.

Hazırlanan çözelti iyice karıştırılarak hafifçe (PH: 7.9) havalandırılmıştır. Çözelti analiz edilmiştir. Bulunan değerler:

PH: 7.9-8.0, Cu (Bakır): yok, Zn (Çinko): 6 µ/dl, Mg (Magnezyum): 10 mg/ dl, Ca (Kalsiyum): 2.5 mmol/L, sertliği: 110- 115 CaCO₃ mg /L., Oksijen içeriği 7.2mg/L olarak bulunmuştur.

Çözeltide kullanılan tüm maddeler Merck'ten sağlanmıştır. Test maddesi olarak kullanılan LiCl (Sigma L 8895) farklı yoğunluklarda olmak üzere Fetax çözeltisinde çözülmüştür. Çalışmada 9 ayrı konsantrasyon denenmiş, deney 5 kez tekrar edilmiştir. Her kaba 50 ml çeşitli

konsantrasyonlarda LiCl konulmuş ve 30'ar embriyo yerleştirilmiştir. Sonuçta her deneyde kontrol grubu da dahil olmak üzere 300 embriyo kullanılmıştır. Tüm çalışmada, 1350'si deney; 150'si kontrol grubu olmak üzere toplam 1500 embriyo kullanılmıştır. Embriyolar 2-4 hücreli evrede kimyasala 96 saat süresince bırakılmıştır. 96 süre boyunca çözeltiler değiştirilmemiştir. Her 24 saatte bir her kap ayrı ayrı kontrol edilerek, gerekenlere çözelti eklenmiştir.

4. Verilerin Toplanması

24, 48, 72 ve 96. saatlerde ölü embriyoların sayısı kaydedilmiştir. Malforme embriyoların evreleri Nieuwkoop'a (28) göre saptanmıştır. Ölen malforme embriyolar malformasyon sayısına dahil edilmemiştir. 24. (Evre 27) ve 48. (Evre 35) saate oluşan ölüm embriyonun deri pigmentasyonu, strüktürel bütünlüğü ve iritabilitesi ile saptanırken, 72. (Evre 42) ve 96. (Evre 45) saate ölüm ,saydam embriyoda kalp atımının durmuş olması ile kesinleştirilmiştir. Ölü ve malforme embriyoların sayısı 96 saat sonunda her grup için ayrı ayrı kaydedilmiştir. Bunun yanısıra embriyoların evreleri günlere göre saptanmıştır. Her embriyonundorsal pigmentasyonu incelenmiş ve kontrollere göre daha küçük veya azalmış sayıda melenofor gösteren embriyolar anormal pigmentasyon olarak değerlendirilmiştir. Hayatta kalan embriyolar %5-10'luk formaldehit içinde tesbit edilmiştir. Her embriyonun baş ve kuyruk uzunlukları ölçülerek kaydedilmiştir.

Tüm deneyler sonunda oluşan anomalilerin video kayıtları yapılmış, daha sonra ekrandan anormal embriyo fotoğrafları elde edilmiştir. Meydana gelen derecelendirilerek her grubun anomali tablosu yapılmıştır.

5. Veri Analizi:

Sürvi, malformasyon ve deri pigmentasyonuna ait veriler analiz edilmiştir. Logaritmik konsantrasyonlara karşı ölüm ve malformasyon yüzdeleri milimetrik kağıtta gösterilmiştir. Yaklaşık LC50 ve EC50 değerleri tayin edilmiştir. Büyümede anlamlı bir azalmanın olup olmadığı, gruplandırılmış gözlemler için ANOVA ile analiz edilmiştir.

Mekan faktörü ve beslenme t- testi ile değerlendirilirken , randomize alınan gruptaki döllenenlik oranı, havalandırma ve sıcaklık parametreleri X^2 ile analiz edilmiştir.

BULGULAR

1. Sıcaklık ile ilgili Değerler

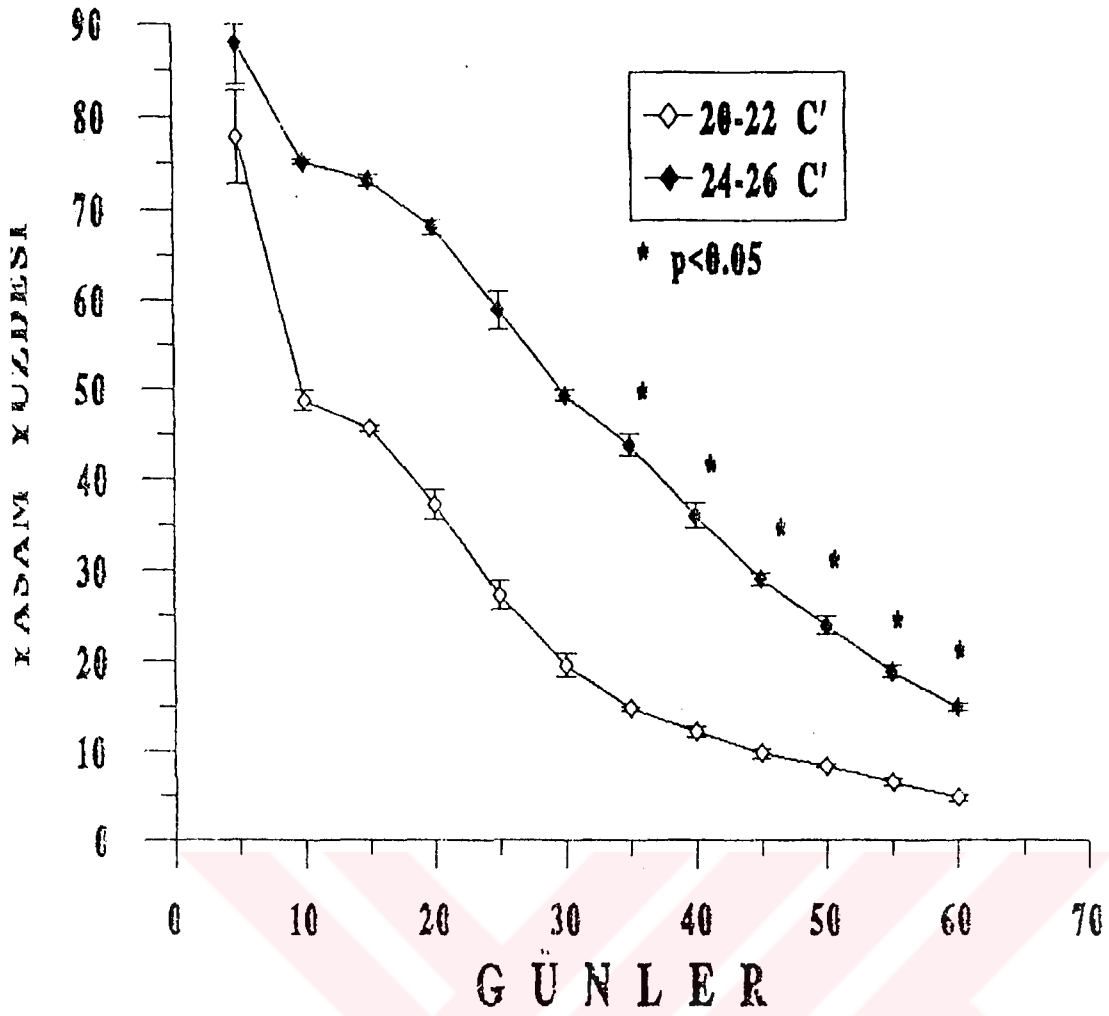
Çalışmamızda; 24-26° C arasında tutulan hayvanlarda % yaşama oranının, 20-22° C sıcaklıkta bırakılanlara göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir ($p < 0.005$).

Tablo I. 25-26° C ile 20-22° C sıcaklığa maruz bırakılan iribaşlarda % yaşama oranının değerlendirilmesi

	24-26° C	20-22° C	Khi-kare Değeri	p değeri
30-35. Gün Ort. \pm SE SD	43 \pm 1.280 6	14 \pm 1.288 6	14.375	0.0257
35-40. Gün Ort. \pm SE SD	36 \pm 1.414 7	12 \pm 0.583 7	17.295	0.0156
40-45. Gün Ort. \pm SE SD	29 \pm 0.602 8	10 \pm 0.489 8	19.345	0.0135
45-50. Gün Ort. \pm SE SD	25 \pm 0.927 9	8 \pm 0.489 9	21.014	0.0126
50-55. Gün Ort. \pm SE SD	19 \pm 0.707 10	7 \pm 0.400 10	22.078	0.0147
55-60. Gün Ort. \pm SE SD	15 \pm 0.447 11	5 \pm 0.374 11	23.007	0.0176

(SD: Serbestlik derecesi)

İstatiksel anlamlılık 25-30. günde başlamıştır. Gözlemler 60 gün sürmüştür.



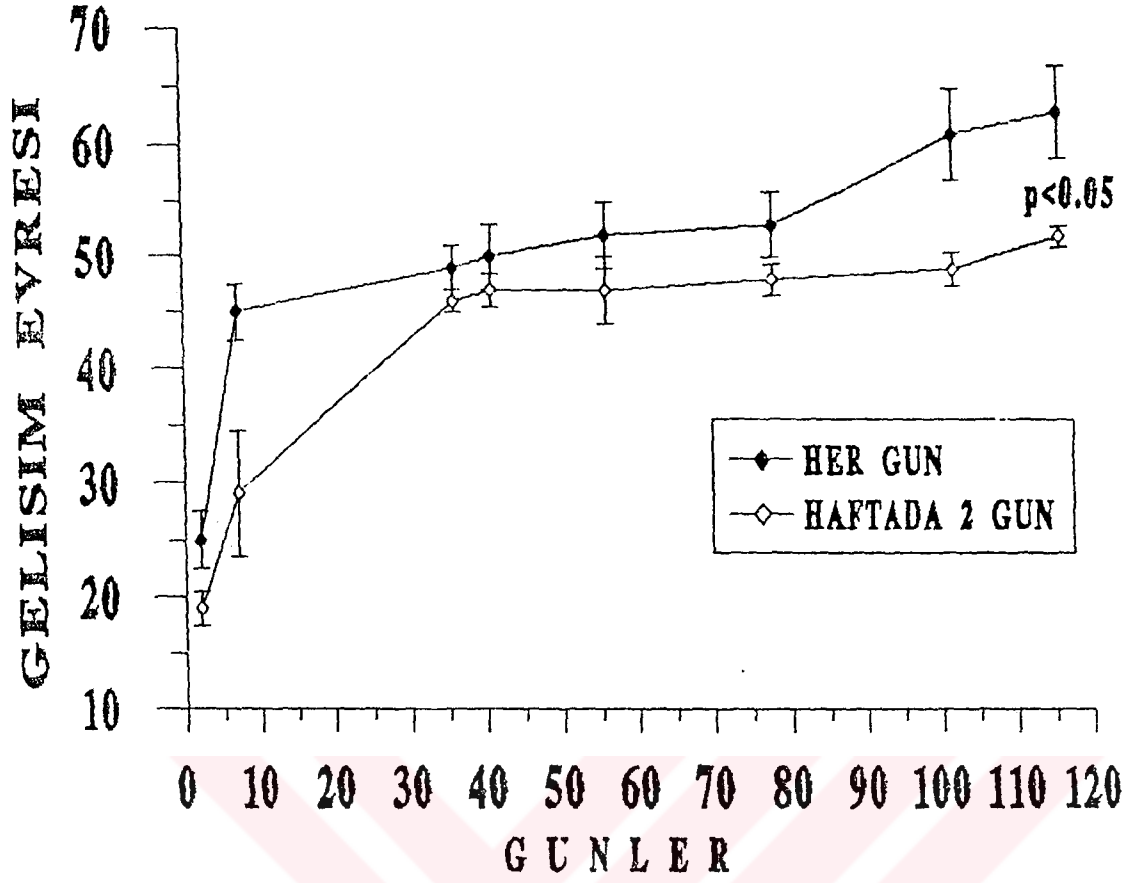
Sekil 6. *Xenopus laevis* embriyosunun yüzde yasam oranı üzerine farklı sıcaklıkların etkisinin günlere göre karşılaştırılması.

2. Beslenmede ile İlgili Değerler

Kaynatılmış ve gazlı bezle süzülükten sonra kullanılan ıspanak ve marul yaprağı ile her gün ve haftada 2 gün olmak üzere beslenen gruplardan, her gün beslenende gelişim evrelerinde istatistiksel anlamlılık görülmüştür ($p < 0.05$).

Her gün beslenende evre sayısı ortalama \pm SE: 49.428 ± 4.750 olup; T-testi değeri 4.010, p değeri ise 0.013 olarak bulunmuştur.

Haftada iki kez beslenen gruplarda ise, evre sayısı ortalama \pm SE; 41.571 ± 4.230 olup T-testi değeri 3.506, p değeri ise 0.05 olarak bulunmuştur.



Sekil 7 . Xenopus Embriyo Gelişimi Üzerine Beslenme zamanlarının etkileri.

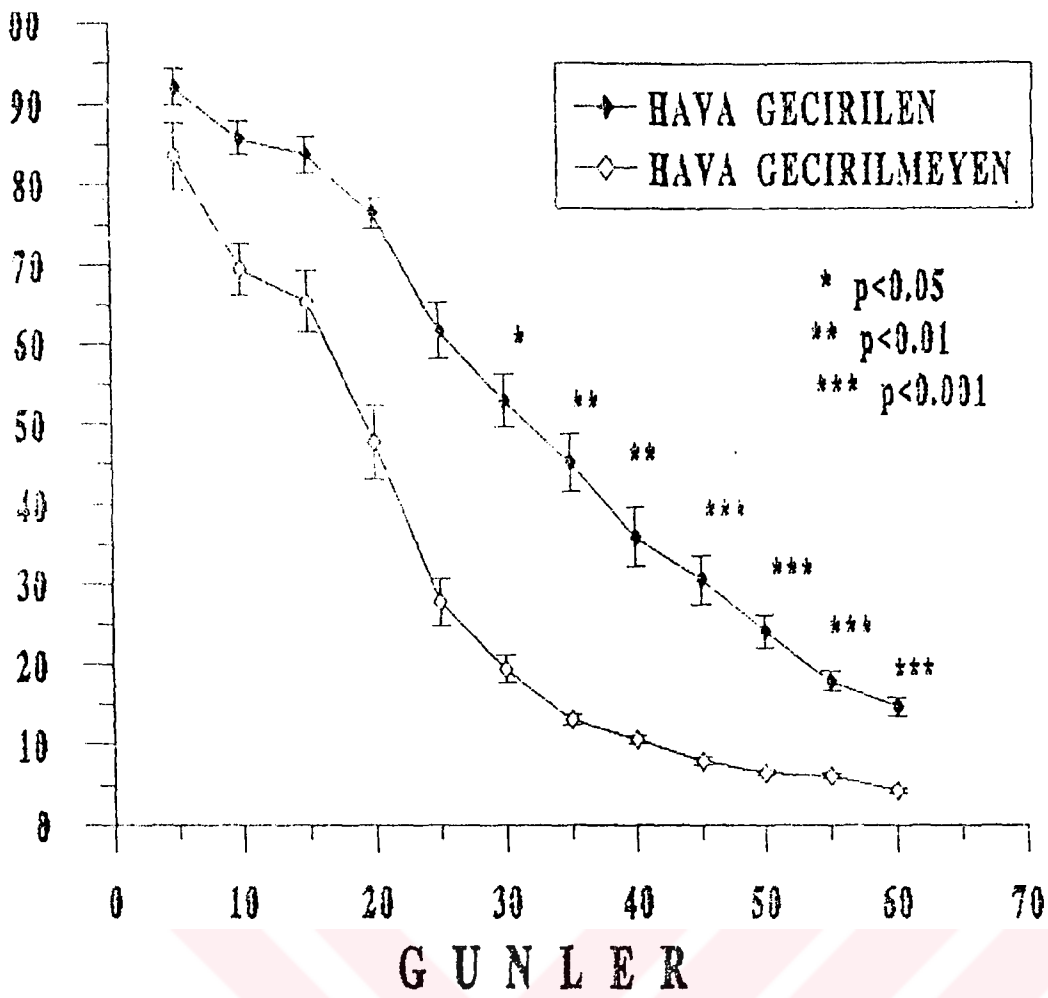
3. Havalandırma ile ilgili Değerler;

60 gün süre ile sularından hava geçirilen grupta %yaşama oranında istatistiksel anlamlılık görülmüştür ($p < 0.005$, $p < 0.001$, $p < 0.01$). 5-25. günler arasında istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır. Anlamlılık 20-25.günlerde başlamıştır. Anlamlılık 25-30. günlerde ($p < 0.05$), 35-40. günlerde ($p < 0.01$), 45-60.günlerde ($p < .0.001$) şeklinde gözlenmiştir.

Tablo II. İki ay süresince sularından hava geçirilen ve geçirilmeyen gruplardaki % yaşama oranlarının karşılaştırılması

	Hava Geçirilen	Hava Geçirilmeyen	Khi-Kare Değeri	p değeri
20-25. Gün Ort.±SE SD	61.780±3.583 4	27.720±3.027 4	7.81	0.098
25-30. Gün Ort.±SE SD	52.950±3.296 5	19.370±1.672 5	14.78	0.011
30-35. Gün Ort.±SE SD	45.200±3.603 6	13.040±0.677 6	22.61	0.0009
35-40. Gün Ort.±SE SD	35.860±3.681 7	10.530±0.546 7	27.69	0.0003
40-45. Gün Ort.±SE SD	30.470±3.095 8	7.940±0.483 8	32.70	0.0001
45-50. Gün Ort.±SE SD	24.020±2.076 9	6.450±0.245 9	36.90	0.0000
50-55. Gün Ort.±SE SD	17.897±1.210 10	6.106±0.360 10	38.56	0.0000
55-60. Gün Ort.±SE SD	14.648±1.166 11	4.304±0.342 11	40.75	0.0000

(SD: serbestlik derecesi)



Sekil 8 . Sularından sürekli hava geçirilen *Xenopus Laevis* embriyolarında yüzde yasama oranlarının karşılaştırılması.

3.4 Randomize alınan gruptaki döllenme oranı;

Randomize alınan gruptaki döllenmişlik oranı %65-85 arasında gözlenmiştir ($p < 0.001$).

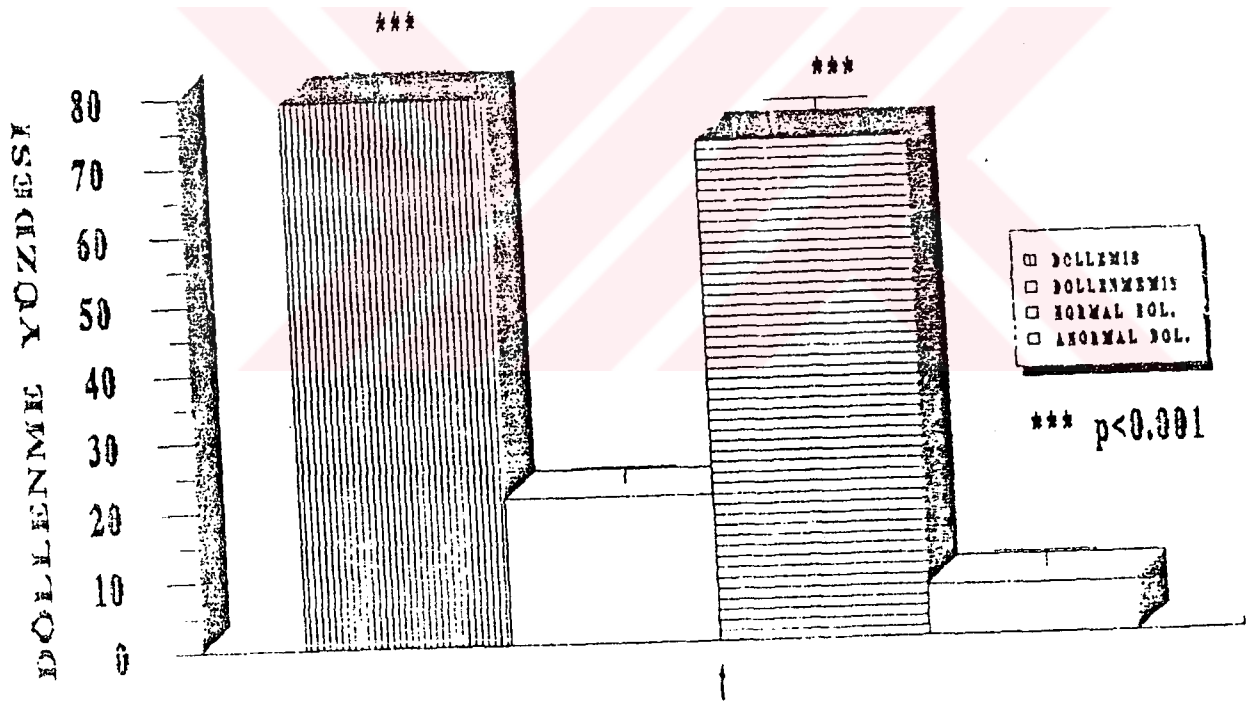
Sonuçta randomize alınan grupta; döllenmiş yumurta sayısı ile döllenmeyenler arasında ve döllenmiş ve normal olan yumurtalarla, anormal olanlar arasında anlamlı farklılık olduğu görülmüştür. Döllenmiş, döllenmemiş yumurta analizinde X^2 : 32.709 ve $p < 0.001$ olarak bulunurken; döllenmiş olanlarda; normal ve anormal bölünenler arasındaki analizde X^2 :97.838 ve $p < 0.001$ olarak bulunmuştur.

Tablo III. Randomize alınan gruplarda döllenmiş, döllenmemiş oranı ve döllenmişlerde normal, anormal oranı (%).

Grup	Sayı	Döllenmiş %	Döllenmemiş %	Döllenmiş Normal %	Döllenmiş Anormal %
1	20	80	20	75	5
2	20	75	25	75	0
3	20	75	25	70	5
4	20	65	35	60	5
5	20	85	15	80	5
6	20	85	15	85	0
7	20	70	30	85	5
8	20	80	20	55	150
9	20	90	10	75	150
10	20	85	15	8	0
11	20	80	20	55	25

$\chi^2=97.838$ $p<0.001$ (Döllenmiş normal ve anormal yumurta karşılaştırılması)

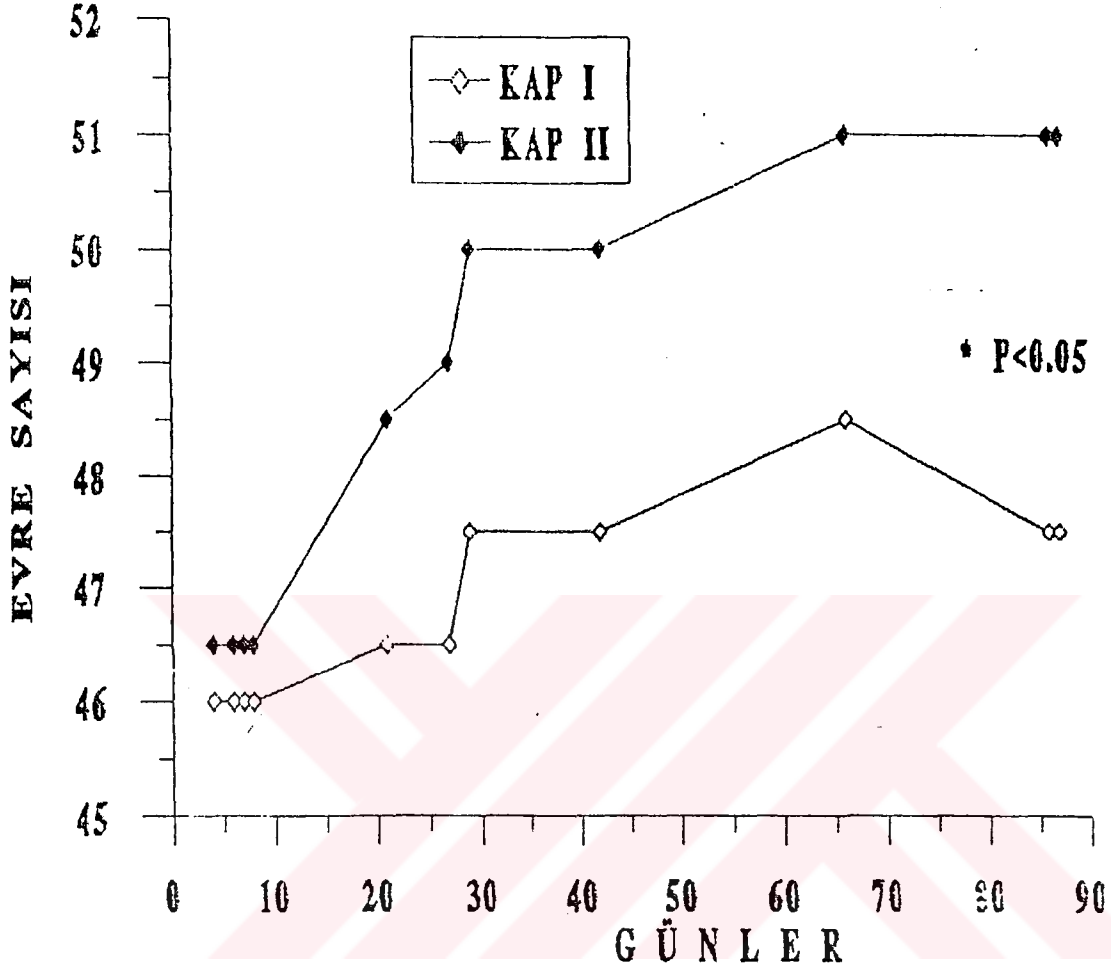
$\chi^2=32.709$ $p<0.001$ (Döllenmiş ve döllenmemiş yumurta karşılaştırılması)



Sekil 2. Randomize alınan yumurtalarda döllenmiş ve döllenmemiş yumurtalarla döllenmiş olgularda normal ve anormal oranlarının karşılaştırılması.

5. Mekan Faktörüne ait Değerler

Mekan faktörünü tespit etmek için alınan 2 gruptaki embriyolar, yaklaşık 3 ay incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre iribaş sayısı az olan kapta, gelişim evresi 4 evre ileridedir.



Sekil 10. İki farklı kaptaki iribaş sayısına bağlı evre farklılıklarının günlere göre karşılaştırılması.

Elde edilen verilere göre aynı boyuttaki kapta larvaların sayısına bağlı faz farklılıkları deneyimizde I. kapta ortalama (evre) 46.87, II.kapta 48.77iken \pm SE sırasıyla 0.261 ve 0.593 olarak bulunmuştur ($p < 0.001$).

Sonuç olarak kapta larva sayısı azaldıkça gelişimlerinde anlamlı farklılık olduğu gözlenmiştir.

6. Aynı İndüklemeye Saat Başı Toplanan Yumurtalarda Evre Gelişimine ait Değerler

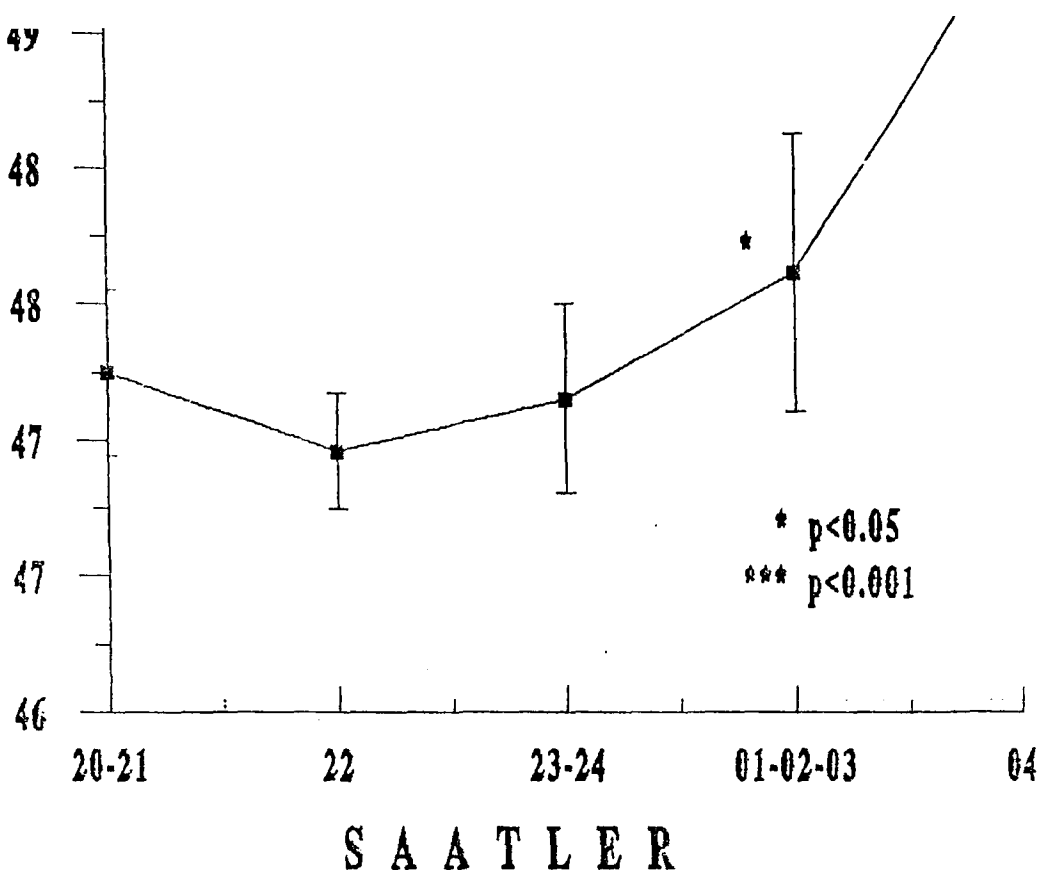
Bu parametrenin değerlendirilmesinde ise 5. saatten sonra alınan yumurtalarda gelişim evresinin daha ileri olduğu gözlenmiştir.

Tablo IV. Aynı indükleme ile saat başı toplanan yumurtalardaki evre farkları.

Saat	ayı	Evre	T DEĞERLERİ					P DEĞERLERİ					
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
20- 21	273	47.2±0. 30	-	-	-	2.6	6.7	0	0.	0.	0.	0.	0.
									180	53	02	00	
22	233	46.9±0. 15	-	-	-	2.9	4.7	0.		0.	0.	0.	0.
								180		18	01	00	
23- 24	237	47.1±0. 21	-	-	-	2.7	5.3	0.	0.		0.	0.	0.
								530	182		01	00	
1-2 -3	246	47.6±0. 34	2.6	2.7	2.7	-	4.8	0.	0.	0.		0.	0.
								05	01	010		00	
4	38	48.9±0. 51	6.7	4.7	5.3	4.8	-	0.	0.	0.	0.		
								00	0	00	00		

(1) Saat 20-21, (2) Saat 22, (3) Saat 23-24, (4) Saat 1-2-3, (5) Saat 4

GELİŞİM EVRESİ



Sekil 11. İndükleme ile saat başı toplanan yumurtaların evrelere göre karşılaştırılması

Elde edilen verilere göre, saat.20⁰⁰-21⁰⁰ de alınan yumurtalar diğer saatlerde alınan yumurtalarla karşılaştırıldığında, 22⁰⁰-23⁰⁰-24⁰⁰. saatler arasında anlamlı farklılık olmadığı ; farklılığın 1⁰⁰-2⁰⁰-3⁰⁰(p< 0.05) ve-4⁰⁰. (p<0.001) saatlerde olduğu görülmüştür.

Saat 22⁰⁰ de alınan yumurtaların, diğer saatlerde alınan yumurtalarla karşılaştırılmasında 20⁰⁰-21⁰⁰-22⁰⁰-24⁰⁰ saatler arasında anlamlı bir farklılık olmadığı ; anlamlılığın 1⁰⁰-2⁰⁰-3⁰⁰ (p< 0.05)ve 4⁰⁰. (p<0.001) saatlerde olduğu görülmüştür.

Saat 23⁰⁰-24⁰⁰ ün diğer saatlerle karşılaştırıldığında 20⁰⁰-21⁰⁰-22⁰⁰ de anlamlılık olmadığı ;anlamlılığın 1⁰⁰-2⁰⁰-3⁰⁰ (p<0.05) ve 4⁰⁰. (p<0.001) saatlerde olduğu görülmüştür.

Saat 1⁰⁰-2⁰⁰-3⁰⁰ ün diğer saatlerle karşılaştırılmasında, 20⁰⁰-21⁰⁰-22⁰⁰-23⁰⁰-24⁰⁰ (p<0.05) ve 4⁰⁰ (p<0.001)ile anlamlı olduğu görülmüştür. Saat 4⁰⁰ 'ün diğer gruplarla karşılaştırılmasında, hepsinde anlamlı olduğu görülmüştür (p<0.001).

Sonuç olarak saat başı toplanan yumurtalarda 5.saatten sonra evre sayısında anlamlı farklılık olduğu görülmüştür. Bu da muhtemelen uterusu daha önceden gelmiş yaşlı yumurtaların kalitesindeki azalmaya bağlı olarak gözlemlenmiştir. Zaten bu yumurtaların çoğu olgun olmayan ve dolayısı ile döllenenemeyen yumurtalardır.

7. Pilot Çalışma 1'e ait Değerler

Lityum için yapılan pilot çalışmaların ilkinde 0.3-0.4 M LiCl'e sırası ile 5' ve 6' süre ile 2 hücreli 4 hücreli ve 8 hücreli evrede maruz bırakılan gruplarda elde edilen bulgular Tablo V da özetlenmiştir. Bu çalışmamızda anomali derecelendirilmiştir. Bu derecelendirmede A₁, en fazla görülmüş, bunu sıra ile A₂ ve A₃ izlemiştir.

Tablo V. 0.3 mol ve 0.4 mol konsantrasyonlara 5 ve 6 dakika lityum klorüre maruz bırakılan embriyolarda % yaşama, % malformasyon ve ortalama baş kuyruk uzunlukları.

Konst. (g/L)	Sayı	Evre	Süre	% Yaşam	% Malfor.	Ortalama Boy (cm)
Kontrol	20	2 Hücre	2 gün	100	5	0.30+0.78
0.3M	20	2 Hücre	6 dak.	100	10	0.29+0.74
0.3M	20	4 Hücre	6 dak.	100	20	0.19+0.41
0.3M	20	8 Hücre	6 dak.	100	20	0.25+0.71
0.4M	20	2 Hücre	5 dak.	100	25	0.28+0.76
0.4M	20	4 Hücre	5 dak.	100	20	0.19+.0.51
0.4M	20	8 Hücre	5 dak.	100	20	0.28+0.69

(Konst.: Konsantrasyon; Malfor.: Malformasyon)

8. Pilot Çalışma 2'ye ait Değerler

Çalışmaların ikincisinde ise 0.01 den 0.1 M'e kadar değişen 6 ayrı konsantrasyon 2-4 hücreli evreden sonra 4 saat evre 7 ye kadar LiCl'e maruz bırakılmıştır. Elde edilen bulgular 0.1M LiCl e 4 saat maruz bırakmanın embriyoda gastrulasyonu süprese ettiği bulunmuştur. Bulgular Tablo VI de özetlenmiştir.

Tablo VII de ise 0.01 den 0.1 M'a kadar değişen konsantrasyonlarda vücut uzunluğunun karşılaştırılmıştır.

Tablo VI. Farklı konsantrasyonlara 2-4 hücreli evreden sonra maruz kalan Xenopus embriyolarının 96 saat sonunda elde edilen % yaşam ve malformasyon oranları.

Konst. Sayı	I. Grup	II. Grup	III. Grup	IV. Grup	V. Grup	Toplam Sayı	% Yaşam	% Malf.
0.01 M 150	27 N 1 A	24 N 3 A	26 N 1 A	25 N 2 A	25 N 1 A	127 N 8 A	90.0	5.3
0.02 M 150	26 N 2 A	23 N 2 A	25 N 2 A	22 N 4 A	22 N 3 A	118 N 13 A	87.3	8.6
0.04 M 150	18 N 6 A	17 N 8 A	18 N 7 A	16 N 4 A	23 N 0 A	92 N 26 A	78.6	17.3
0.06 M 150	0 N 13 A	14 N 1 A	0 N 14 A	12 N 2 A	2 N 9 A	5 N 62 A	44.6	41.3
0.08 M 150	0 N 9 A	0 N 5 A	0 N 9 A	0 N 10 A	0 N 1 A	0 N 34 A	22.6	22.6
0.01 M 150	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0	0
Kontrol 150	27 N 1 A	27 N 3 A	27 N 1 A	27 N 0 A	29 N 1 A	137 N 3 A	93.3	2.0

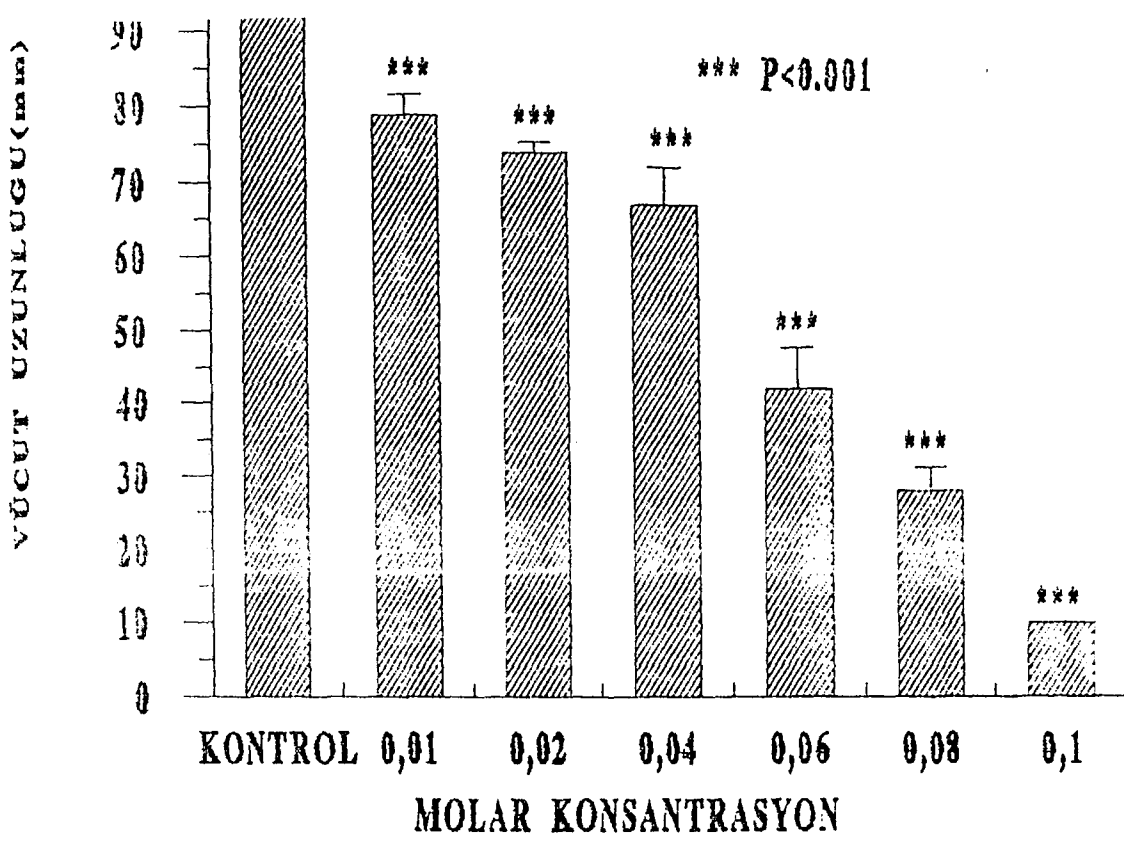
Bu çalışmada elde edilen % yaşama oranının gruplar arası karşılaştırmalarda; anlamlılığın 0.06 mol' den sonra başladığı görülmüştür ($p < 0.001$, $\chi^2 = 84.15$). % malformasyonun karşılaştırılmasında ise anlamlılığın 0.06 mol'den sonra başladığı görülmüştür ($p < 0.05$, $\chi^2 = 9.6$).

Tablo VII. Aynı deneyde muamele sonucu canlı kalan larvaların baş-kuyruk uzunluğu (cm.).

Konsant. (g/L)	n	Ort ± SE	Kontrol	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
Kontrol (1)	150	1.09 ± 0.002	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
0.01 (2)	150	0.79 ± 0.027	0.000	-	0.295	0.016	0.000	0.000	0.00
0.02 (3)	150	0.74 ± 0.015	0.000	0.295	-	0.147	0.000	0.000	0.000
0.04 (4)	150	0.67 ± 0.51	0.000	0.000	0.147	-	0.000	0.000	0.000
0.06 (4)	150	0.42 ± 0.056	0.000	0.000	0.000	0.000	-	0.006	0.000
0.08 (5)	150	0.28 ± 0.036	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	-	0.006
0.1 (6)	150	0.10 ± 0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-

Tablo VII e göre baş ve kuyruk uzunluğunun karşılaştırılmasında; kontrolün(1) diğer gruplarla karşılaştırılmasında, tüm gruplarla ($p < 0.001$) anlamlı olduğu görülmüştür. 0.01 M ün (2) diğer gruplarla karşılaştırılmasında sadece 3.grup ile anlamlı olmadığı , diğer gruplarla ise anlamlılık gösterdiği görülmüştür ($p < 0.001$). 0.02 M ün (3) diğer gruplarla karşılaştırılmasında ise, 0.01 M ve 0.04 M ile anlamlı olmadığı, diğer gruplarla ($p < 0.001$) anlamlı olduğu gözlenmiştir. 0.04 M ün(4) diğer gruplarla karşılaştırılmasında, 3. grup ile anlamlı olmadığı,2. grup ile ($p < 0.05$) ve diğer gruplarla ($p < 0.001$) anlamlı olduğu gözlenmiştir. 0.06M ün (5) , 6. grup ($p > 0.05$)ile ve diğer gruplarla($p < 0.001$) anlamlı olduğu görülmüştür.

0.08 M ün (6) ise 5. grup ile ($p > 0.05$), ve diğer gruplarla ($p < 0.001$) karşılaştırılmasında anlamlı olduğu görülmüştür. 0.1 M ün ise tüm gruplarla ($p < 0.001$) anlamlı olduğu görülmüştür.

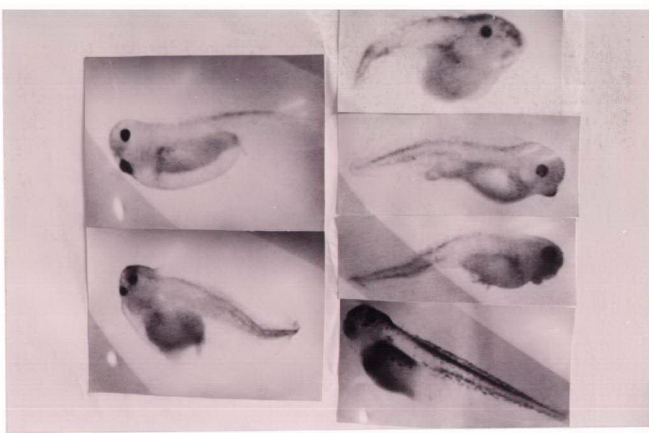


Sekil 12. Çeşitli konsantrasyonlarda 2-4 hücreli evreden sonra 4 saat lityum klorür'e maruz bırakılan embriyoların vücut uzunluğunun kontrole göre karşılaştırılması.

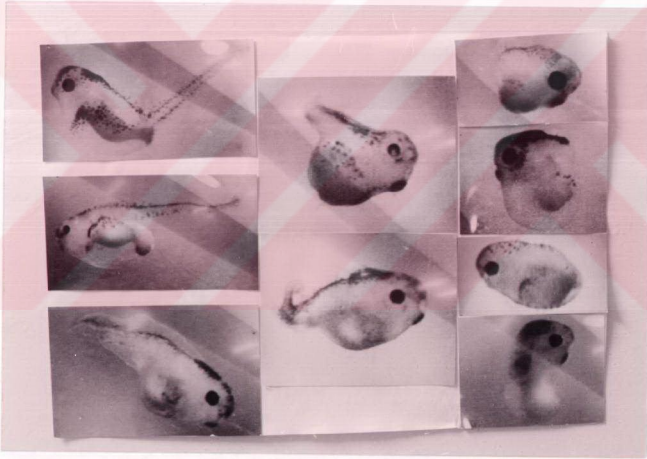
Tablo VIII. 2-4 hücreli evreden sonra 4 saat evre 7'ye kadar lityum klorüre maruz bırakılan embriyolarda anomali derecelendirilmesi

Konsant.	n	Muamele fazı	Normal	Anteriozasyon				Posteriozasyon*	% Or. Anomali
				A1	A2	A3	A4		
Kontrol	150	2-4 hücre	127	3	-	-	-	2.3 A1	
0.01	150	2-4 hücre	127	8	-	-	-	5.9 A1	
0.02	150	2-4 hücre	118	13	-	-	-	9.9 A1	
0.04	150	2-4 hücre	92	7	5	4	-	5.9 A1, 12.7 A2, 3.58 A3	
0.06	150	2-4 hücre	62	23	-	-	-	2.9 A1, 4.4 A2	
0.08	150	2-4 hücre	34	6	12	6	-	8.8 A2, 17.6 A3, 23.5 A4	
0.1	150	2-4 hücre	-	-	-	-	-	-	

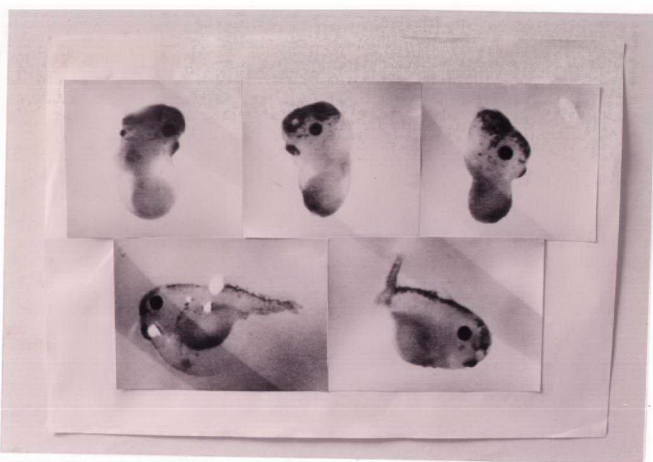
(*) P1, P2, P3 ve P4 ile değerlendirilen anomaliler görülmemiştir.



Şekil 13. 0.01 ve 0.02 M'de 4 saat LiCl'e maruz bırakılan embriyolarda görülen anomaliler.



Şekil 14. 0.04 M'de 4 saat LiCl'e maruz bırakılan embriyolarda görülen anomaliler.



Şekil 15. 0.06 M'de 4 saat LiCl'e maruz bırakılan embriyolarda görülen anomaliler.



Şekil 16. 0.08 M'de 4 saat LiCl'e maruz bırakılan embriyolarda görülen anomaliler.

9. Pilot Çalışma 3'e ait Değerler

Asıl sunacağımız deney bulgusunu vermeden önce aynı konsantrasyonda Evre 7-8 den itibaren 96 saat süresince maruz bırakılan embriyolardaki bulgular Tablo IX da verilmiştir.

Tablo IX. Evre 7-8'den sonra 96 saat LiCl'e maruz bırakılan embriyolarda % yaşam % malformasyon oranları ve evre sayıları.

Konsant. (g/L)	I. Grup	II. Grup	III. Grup	IV. Grup	V. Grup	% Yaşam	% Malf.
$3 \times 10^{-4} M$	28 E45 2 A	26 E45 3 A	25 E45 2 A	26 E45 3 A	28 E45 2 A	96.8	8.0
$4 \times 10^{-4} M$	24 E45 5 A	24 E45 4 A	25 E45 4 A	26 E45 1 A	25 E45 3 A	94.0	11.3
$6 \times 10^{-4} M$	23 E45 5 A	23 E45 2 A	25 E45 3 A	26 E45 4 A	23 E45 3 A	88.0	8.6
$8 \times 10^{-4} M$	21 E45 6 A	22 E45 5 A	23 E45 4 A	23 E45 2 A	20 E45 6 A	87.3	15.3
$9 \times 10^{-4} M$	23 E45 7 A	18 E45 6 A	22 E45 5 A	23 E45 2 A	18 E45 6 A	86.6	17.3
1×10^{-3}	23 E45 5 A	23 E45 4 A	20 E45 3 A	17 E45 3 A	19 E45 5 A	81.3	13.3
2×10^{-3}	21 E45 9 A	23 E45 5 A	18 E45 2 A	16 E45 3 A	18 E45 6 A	80.6	16.6
4×10^{-3}	18 E45 3 A	20 E45 5 A	18 E45 1 A	17 E45 4 A	15 E45 9 A	73.3	14.0
6×10^{-3}	15 E45 9 A	20 E45 3 A	16 E45 5 A	22 E45 1 A	14 E45 4 A	72.6	14.6
Kontrol	29 E45 1 A	29 E45 1 A	29 E45 1 A	27 E46 1 A	29 E45 1 A	95.3	3.3

Bu deneyde aynı konsantrasyonda fakat farklı evrelerde LiCl'in çeşitli yoğunluklarına maruz bırakılan embriyolarda hem % yaşam oranında hem de anomali tipleri arasında farklar bulunmuştur.

Tablo X. Evre 7-8'den sonra 96 saat LICi2 maruz bırakılan embriyolarda görülen anomali tipleri.

Kons.	Ödem	Bül	K.eğr.	Som.btk.	Mikrosf.	dep.	Siklopi	Mikroft.	Spina bif.	Yolk	Göz.med.	A1	A2	A3	A4	FR2P3P4
	3x10 ⁴	6	2	4	6	4	8	4	4	-	-	-	-	-	-	-
	4x10 ⁴	10	-	13	3	9	4	-	11	8	-	-	-	-	-	-
	6x10 ⁴	-	-	5	-	-	13	-	-	13	-	-	-	4	-	-3
	8x10 ⁴	23	4	23	8	8	-	8	-	5	-	-	-	-	-	-
	9x10 ⁴	15	6	16	5	6	11	11	-	-	-	-	-	-	-	-
	1x10 ⁵	10	-	6	2	3	5	0	2	-	9	2	2	1	7	-4
	2x10 ⁵	15	-	-	-	7	4	-	-	-	-	4	4	3	-	-
	4x10 ⁵	8	8	-	13	11	-	9	9	5	-	-	-	-	3	-
	6x10 ⁵	20	22	-	22	19	15	-	8	2	6	-	-	-	-	-
	Kontrol	-	4	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

10. FETAX Testine ait Değerler

Vermek istediğimiz asıl deneyimizde LiCl'e 96 saat süre ile 2-4 hücreliden sonra 2×10^{-4} den $8 \times 10^{-3}M$ e kadar değişen 9 ayrı koonsantrasyona maruz bırakılan embriyolarda elde edilen bulgular Tablo XI de verilmiştir.

Tablo.XI. 2-4 hücreli evreden sonra 96 saat LiCl e maruz bırakılan embriyolarda yaşam, normal, anorma oranları (%). (n:1500).

	I.grup	II.grup	III.grup	IV.grup	V.grup	Top.N.An	Ort.% yaşam	ort.% normal	Ort.%A normal
Kontrol(1)	27N. 1An.	28N. 1An.	27N. 2An.	28N. 1An.	27N. 2An.	137N.7An	96	91.3	4.66
2×10^{-4} (2)	27N. 2An.	27N. 3An.	27N. 2An.	26N. 3An.	26N.3An	133N. 13An.	97.3	88.6	8.66
4×10^{-4} (3)	22N. 4An.	23N. 7An.	24N. 2An.	22N. 4An.	21N.3An	112N. 20An.	88	74.6	13.3
6×10^{-4} (4)	20N. 4An.	20N. 7An.	19N. 8An.	18N. 6An.	19N. 3An	96N. 28An.	82.6	64	18.66
8×10^{-4} (5)	10N. 17An.	14N. 6An.	16N. 9An.	18N. 8An.	15N. 7An.	72N. 48An.	80	48	32
9×10^{-4} (6)	12N. 14An.	11N. 16An.	13N. 15An.	11N. 17An.	14N. 15.	61N. 77An.	92	40.6	51.3
2×10^{-3} (7)	0N. 12An.	0N. 14An.	0N. 13An.	9N. 8An.	0N. 18An.	9N. 65An.	49.3	6	94
4×10^{-3} (8)	0.N. 7An.	0N. 6An.	0N. 8An.	0N. 9An.	0N. 8An.	0N. 38An.	25.3	-	100
6×10^{-3} (9)	-	-	0N. 3An.		0.N. 2An.		3.33	-	100

Tablo XII. $\times 10^{-4}$ Mol konsantrasyona 2-4 hücreliden sonra 96 saat maruz bırakılan embriyolarda baş uzunluğu (cm.)

Kon.(g/L)	Ort. \pm SE	1*	2*	3*	4*	5*	6*
Kontrol(1)	0.204 \pm 0.002	-	0.181	0.003	0.000	0.000	0.000
2x10 ⁻⁴ (2)	0.194 \pm 0.005	0.181	-	0.066	0.000	0.000	0.000
4x10 ⁻⁴ (3)	0.180 \pm 0.003	0.003	0.066	-	0.021	0.006	0.001
6x10 ⁻⁴ (4)	0.162 \pm 0.007	0.000	0.002	0.021	-	-	0.281
8x10 ⁻⁴ (5)	0.158 \pm 0.007	0.000	0.000	0.006	0.585	0.585	0.585
9x10 ⁻⁴ (6)	0.154 \pm 0.004	0.000	0.000	0.001	0.281	0.585	-

(*) p değerleri

Tablo XIII. $\times 10^{-4}$ M konsantrasyona 2-4 hücreli evreden sonra LiCl'e 96 saat maruz bırakılan embriyolarda kuyruk uzunluğu (cm).

Mol(gr/L)	Ort \pm SE	1*	2*	3*	4*	5*	6*
Kontrol(1)	0.876.0.004	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2x10 ⁻⁴ (2)	0.666.0.008	0.000	-	0.000	0.000	0.000	0.000
4x10 ⁻⁴ (3)	0.574.0.016	0.000	0.000	-	0.011	0.000	0.000
6x10 ⁻⁴ (4)	0.538.0.012	0.000	0.000	0.011	-	0.289	0.000
8x10 ⁻⁴ (5)	0.524.0.009	0.000	0.000	0.000	0.289	-	0.000
9x10 ⁻⁴ (6)	0.452.0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

(*) p değerleri

Tablo XIV. $\times 10^{-3}$ M konsantrasyonda 2-4 hücreli evreden sonra 96 saat LiCl'e maruz bırakılan embriyolarda baş uzunluğu(cm.)

Kons. (g/L)	Ort \pm SE	1*	2*	3*	4*
Kontro(1)	0.204.0.002	-	0.06	0.000	0.000
2×10^{-3} (2)	0.164.0.012	0.06	-	0.311	0.000
4×10^{-3} (3)	0.116.0.002	0.000	0.031	-	0.003
6×10^{-3} (4)	0.044.0.027	0.000	0.000	0.003	-

(*) p değerleri

Tablo XV. $\times 10^{-3}$ M konsantrasyona 2-4 hücreliden sonra 96 saat LiCl'e maruz bırakılan embriyolarda kuyruk uzunluğu(cm.)

Kons. (gr/L)	Ort \pm SE	1*	2*	3*	4*
Kontrol (1)	0.876.0.004	-	0.000	0.000	0.000
2×10^{-3} (2)	0.356.0.027	0.000	-	0.093	0.000
4×10^{-3} (3)	0.272.0.014	0.000	0.093	-	0.000
6×10^{-3} (4)	0.102.0.062	0.000	0.000	0.003	0.000

(*) p değerleri

Elde edilen veriler baş ve kuyruk uzunluğu ayrı olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca $\times 10^{-4}$ M ve $\times 10^{-3}$ M ile elde edilen bulgular ayrı değerlendirilmiştir.

Baş uzunluğu ve kuyruk uzunluğu bulgularımız ($\times 10^{-4}$ M) şöyledir:

Kontrolün (1) diğer 5 grupta karşılaştırılmasında sadece (2×10^{-4}) ile aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı, diğer gruplarla anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0.001$ ve $p < 0.005$). 2×10^{-4} M(2) ün diğer gruplarla karşılaştırılmasında; aynı şekilde sadece kontrolle anlamlı farklılık göstermediği; 4×10^{-4} M ile ($p < 0.05$), 6×10^{-4} M (0.005) ve 8×10^{-4} M ile 9×10^{-4} M (0.001) anlamlılık gösterdiği gözlenmiştir. 4×10^{-4} M (3)ün diğer gruplarla karşılaştırılmasında, kontrol ($p < 0.005$), 2×10^{-4} M ($p > 0.05$), 6×10^{-4} M ($p < 0.05$) olduğu ve 8×10^{-4} M ($p < 0.005$) ve 9×10^{-4} M ($p < 0.005$) konsantrasyonları arasında yani tüm gruplarla anlamlılık gösterdiği gözlenmiştir. 6×10^{-4} M (4) ün diğer gruplarla karşılaştırılmasında; 1. ($p < 0.001$), 2. ($p < 0.005$), 3. ($p < 0.05$) gruplar arasında anlamlılık olduğu, 5. ve 6. gruplar arasında

ise anlamlılık olmadığı gözlenmiştir. $8 \times 10^{-4} M$ (5) diğer gruplarla karşılaştırılmasında; 1. ($p < 0.001$), 2. ($p < 0.001$), 3. ($p < 0.05$) gruplar arasında anlamlılık olduğu, 4.,6. gruplar arasında ise anlamlı farklılığın olmadığı gözlenmiştir. $9 \times 10^{-4} M$ (6) diğer gruplarla karşılaştırıldığında; 4. ve 5. gruplarda anlamlılık göstermediği gözlenmiştir. 1. ve 2. ($p < 0.001$), 3. ($p < 0.05$) gruplarla arasında farklılık olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak; Kontrol(1) ve 2. grup arasında baş uzunluğu açısından farklılık olmadığı, 3. grubun tüm gruplarla anlamlılık gösterdiği, 4.grubun kendisinden az konsantrasyondaki gruplarla anlamlılık gösterdiği, kendisinden fazla konsantrasyondaki gruplar arasında ise anlamlılık göstermediği, 5.grubun 3. ve 4. gruplarla anlamlılık göstermediği; diğer gruplarla anlamlılık gösterdiği, 6.grubun ise 4.ve 5. gruplarla anlamlılık göstermediği; diğer gruplarla ise anlamlılık gösterdiği görülmüştür.

Tablo XIII baş uzunluğu ve Tablo XIV kuyruk uzunluğu değerlerini vermektedir($\times 10^{-4} M$).

Tablo XIV e göre, kontrol (ort. 0.876) grubu, diğer gruplarla karşılaştırıldığında hepsi ile anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0.001$).

$2 \times 10^{-4} M$ (2) ile diğer gruplar karşılaştırıldığında 1.,3., 4., 5., 6. gruplarla anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0.001$). $4 \times 10^{-4} M$ (3), diğer gruplarla karşılaştırıldığında, 4.grup ile ($p < 0.05$), 1. 2. 3. 4. 5. 6.gruplarla ($p < 0.001$) anlamlı olduğu görülmüştür. $6 \times 10^{-4} M$ (4) diğer gruplarla karşılaştırıldığında, 5. grup ile anlamlı olmadığı, 3.grup ile ($p < 0.05$), 1.2.3.6. gruplar arasında ($p < 0.001$) anlamlı olduğu görülmüştür. $8 \times 10^{-4} M$ (5) , diğer gruplarla karşılaştırıldığında 4.grup ile anlamlılık göstermediği, 1. 2., 3., 6. gruplarla anlamlılık gösterdiği görülmüştür ($p < 0.001$).

$9 \times 10^{-4} M$ diğer gruplarla karşılaştırılmasında; tüm gruplarla anlamlılık gösterdiği görülmüştür ($p < 0.001$).

Sonuçta Kontrol (1), 2. 3. grupların diğer tüm gruplarla ve kendi aralarında anlamlı olduğu, 4. grubun 5. grupla; 5.grubun 4.grupla anlamlı olmadığı, 6.grubun ise tüm gruplarla anlamlı olduğu görüldü. Yani $6 \times 10^{-4} M$ ile $4 \times 10^{-4} M$ konsantrasyondaki gruplarda boyca uzamanın birbiri ile anlamlı farklılık göstermediği ortaya çıktı. Tablo XIV. Kuyruk uzunluğu($10^{-4} M$).

$\times 10^{-3} M$ de baş uzunluğu karşılaştırılmasındaki bulgular (Tablo XV), kontrol(1) grubu diğer gruplarla karşılaştırıldığında, 2.grup ile ($p > 0.05$), 3. grupla ve 4.grupla ($p < 0.001$) anlamlılık göstermiştir.

$2 \times 10^{-3} M$ (2) diğer gruplarla karşılaştırıldığında 1. ($p > 0.05$), 3.ve 4.($p < 0.001$)gruplarla anlamlı olduğu görülmüştür. $4 \times 10^{-3} M$ (3) diğer gruplarla karşılaştırıldığında, 2. grupla anlamlı olmadığı, 1. ($p < 0.001$), 2. ($p < 0.05$), 3. ($p < 0.005$) gruplarla anlamlı olduğu görülmüştür.

$6 \times 10^{-3} M$ diğer gruplarla karşılaştırıldığında 1. 2.gruplarla ($p < 0.001$), 3. grupla ($p < 0.005$) anlamlı olduğu görüldü. $\times 10^{-3} M$ de kuyruk uzunluğu karşılaştırıldığında, şu bulgular gözlenmiştir (Tablo XVI).

Kontrol (1) grubu diğler gruplarla karşılaştırıldığında sadece 2. 3. 4. gruplarla($p < 0.001$) anlamlı olduğu gözlenmiştir.

2×10^{-3} M (2) ile diğler gruplar karşılaştırıldığında; 4. grupta ($p > 0.05$), 1. grupta ($p < 0.001$), 3. grupta ($p < 0.005$) anlamlı olduğu görülmüştür.

4×10^{-3} M (3) diğler gruplarla karşılaştırıldığında; 2. grupta ($p > 0.05$), 4.grupta ($p < 0.005$), 1. grupta ($p < 0.001$) anlamlı olduğu görülmüştür.

6×10^{-3} M (4) diğler gruplarla karşılaştırıldığında; 1.grupta ($p < 0.001$), 2. grupta ($p < 0.001$), 3.grupta ($p < 0.005$) anlamlı olduğu görülmüştür.

Sonuçta 2×10^{-3} M ile 4×10^{-3} M konsantrasyonlarda kendi aralarında anlamlılık olmadığı,diğler tüm grupların kontrolle ve kendi aralarında anlamlı olduğu görülmüştür.

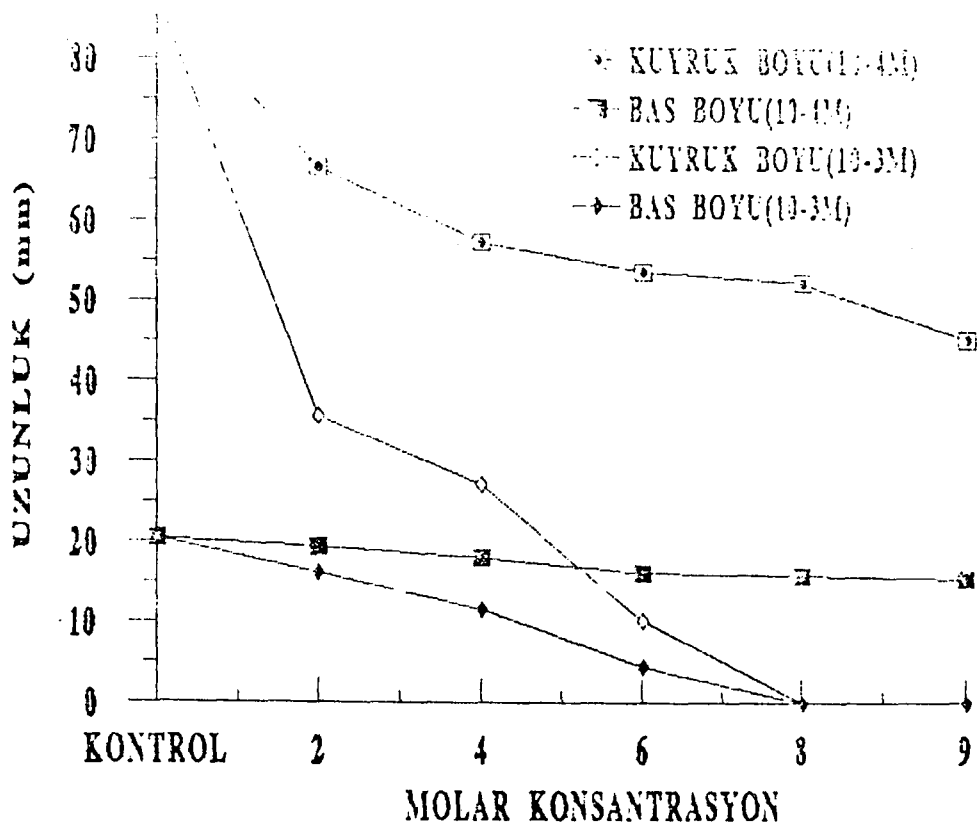
Bu deneylerde kontrol gruplarında %4 oranında anomali(6)* %0.6 oranında ölüm(1) görülmüştür. Anomaliler somit bükümlenmesi, kuyruk eğriliği gibi nisbeten hafif anomalilerdir.

Tablo XVI. 2-4 hücrelerden sonra 96 saat LiCl'e maruz kalan embriyolarda görülen anomaliler.

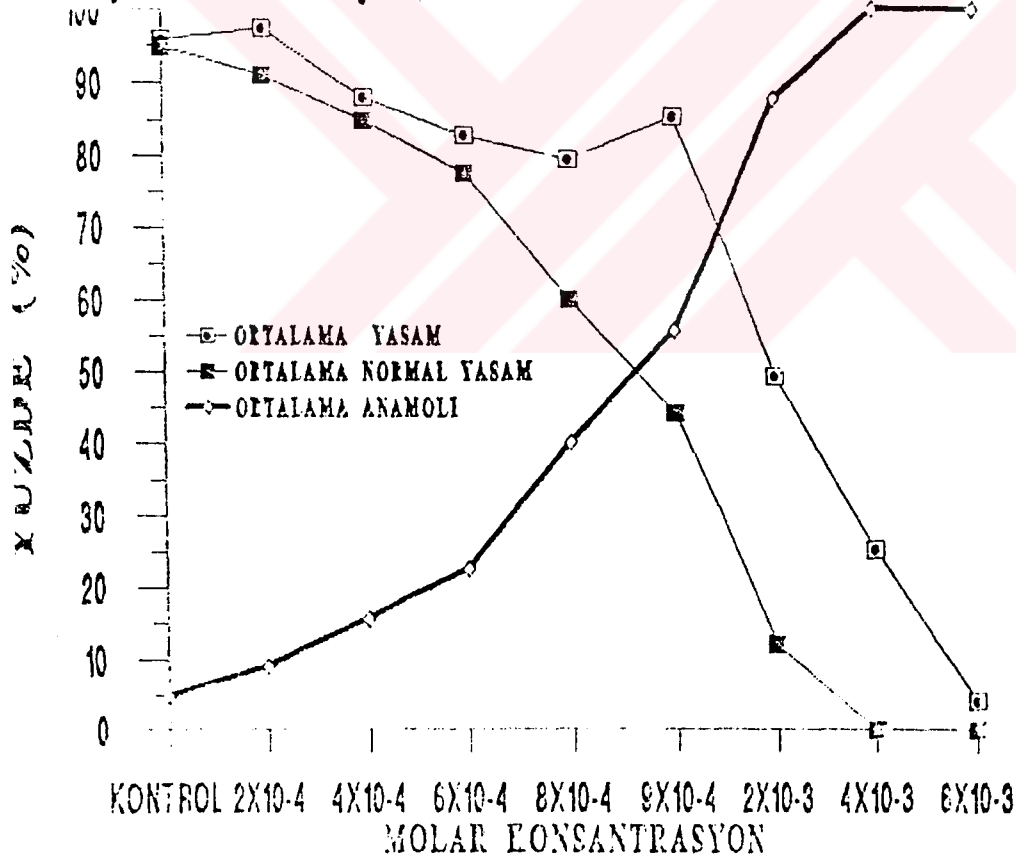
Konstrasyon (g/L)	Ödem	Bül	K.E	Sm.B	Ms.	G.O	Sik.	Mf.	Sp.B	Yolk	Dp.	Anterizasyon				Post. (P4)
												A1	A2	A3	A4	
2x10 ⁻⁴	16	5	7	2	5	1	-	2	-	5	4	-	1	1	-	1
4x10 ⁻⁴	12	2	16	4	2	-	8	2	-	8	4	-	-	-	-	-
6x10 ⁻⁴	11	15	10	2	5	3	1	-	1	6	6	-	-	-	5	-
8x10 ⁻⁴	38	-	28	1	10	-	-	10	-	6	41	-	-	-	9	16
9x10 ⁻⁴	28	-	49	21	20	-	-	13	-	-	49	-	-	11	-	-
2x10 ⁻³	40	3	17	2	33	-	16	-	-	34	40	-	-	-	10	-
4x10 ⁻³	15	18	18	17	9	-	-	9	-	2	6	-	-	-	-	1
6x10 ⁻³	-	-	2	2	2	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
8x10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrol	7	9	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(K.E: Kuyruk eğriliği; Sm.B: Somit bölünmesi; G.O: Gözler Ortada; Sik.: Siklopiya; Ms: Mikrocefali; Sp.B: Sipina Bifida; Dp: Depigmentasyon)

Bu çalışmada P1, P2 ve P3 anomalilerine rastlanmamıştır.



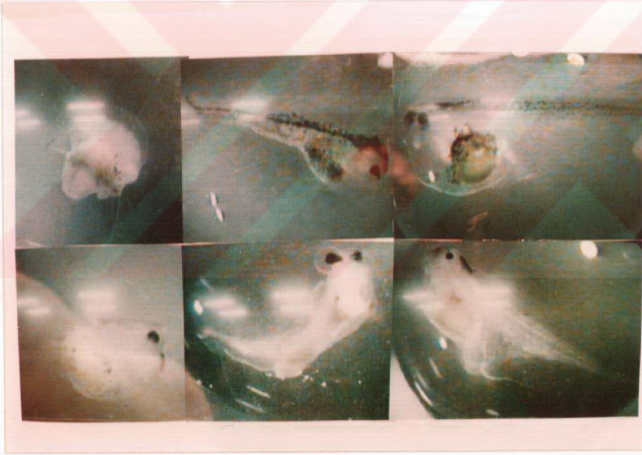
Sekil 17. 2-4 hücreli evreden sonra lityum klorür'e 96 saat maruz bırakılan embriyoların bas ve kuyruk uzunlukları.



Sekil 18. İki ve dört hücreli evreden sonra 96 saat lityum klorür'e maruz bırakılan embriyoların yüzde canlı, normal yaşam ve anormal yaşam oranları.



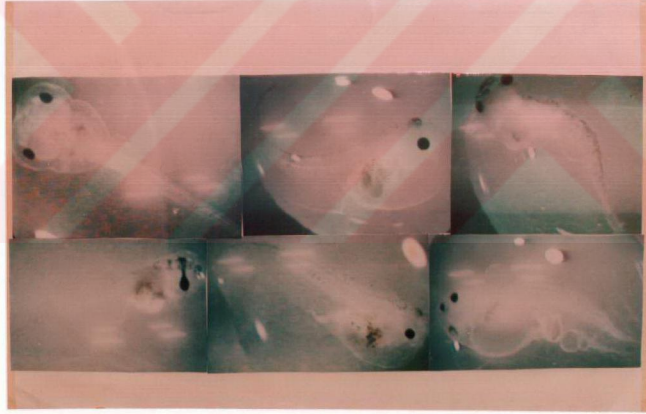
Şekil. 19 Xenopus iriabaşı (kontrol)



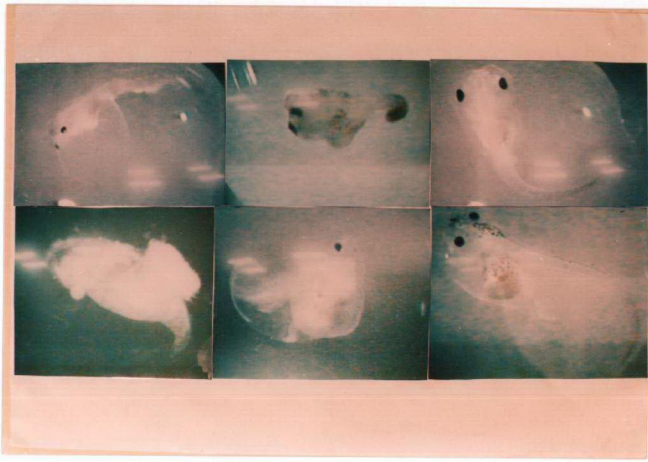
Şekil. 20 2×10^{-4} M LiCl a 96 saat maruz bırakılan emriyolarda anomaliler



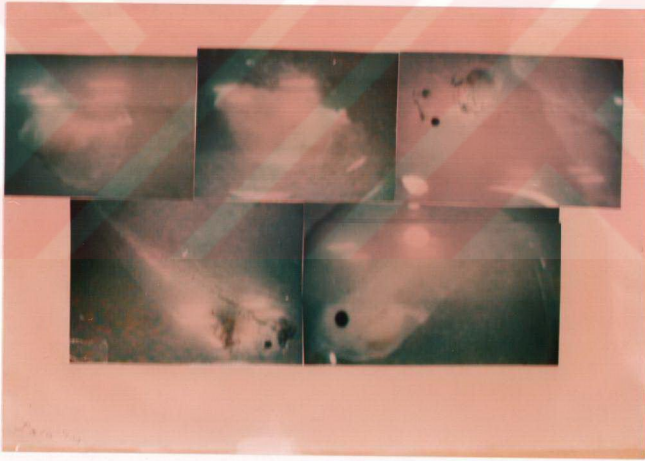
Şekil.21 4×10^{-4} M LiCl a 96 saat maruz bırakılan emriyolarda anomaliler



Şekil.22 6×10^{-4} M LiCl a 96 saat maruz bırakılan emriyolarda anomaliler



Şekil. 23 8×10^{-4} M LiCl a 96 saat maruz bırakılan emriyolarda anomaliler



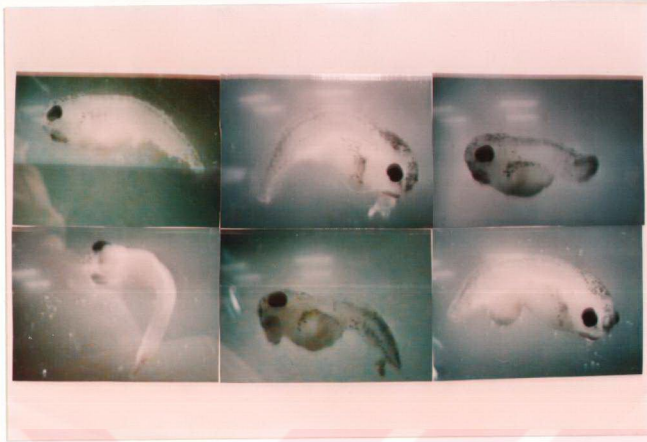
Şekil. 24 9×10^{-4} M LiCl a 96 saat maruz bırakılan emriyolarda anomaliler



Şekil 25 2×10^{-3} M LiCl i 96 saat maruz bırakılan emriyolarda anomaliler



Şekil. 26 4×10^{-3} M LiCl i 96 saat maruz bırakılan emriyolarda anomaliler

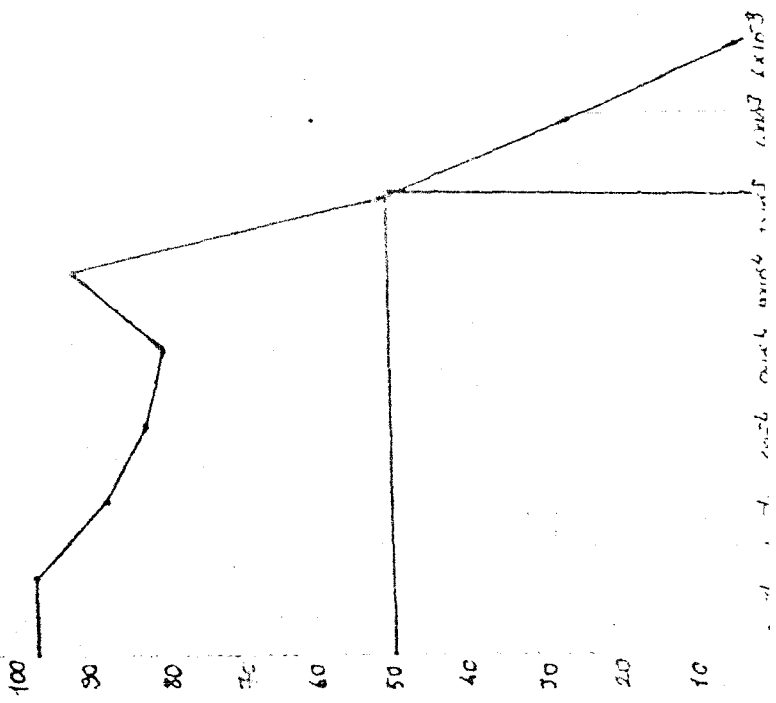
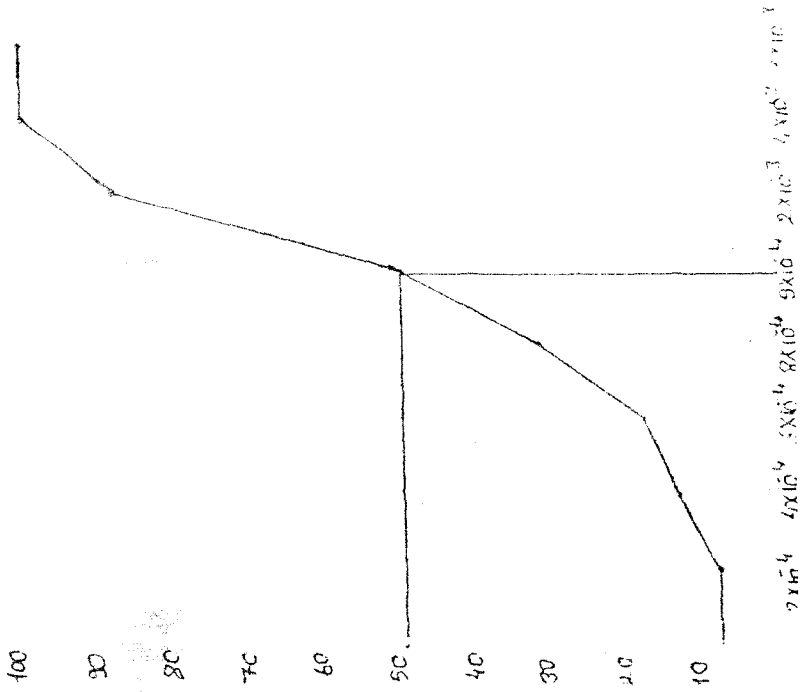


Şekil. 27 6×10^{-3} M LiCl a 96 saat maruz bırakılan emriyolarda anomaliler



Şekil. 28 0.3 M LiCl de 6 dakika bırakılan embriyo

$$TI = \frac{LC50}{EC50} = \frac{0.0022}{0.00088} = 2.5$$



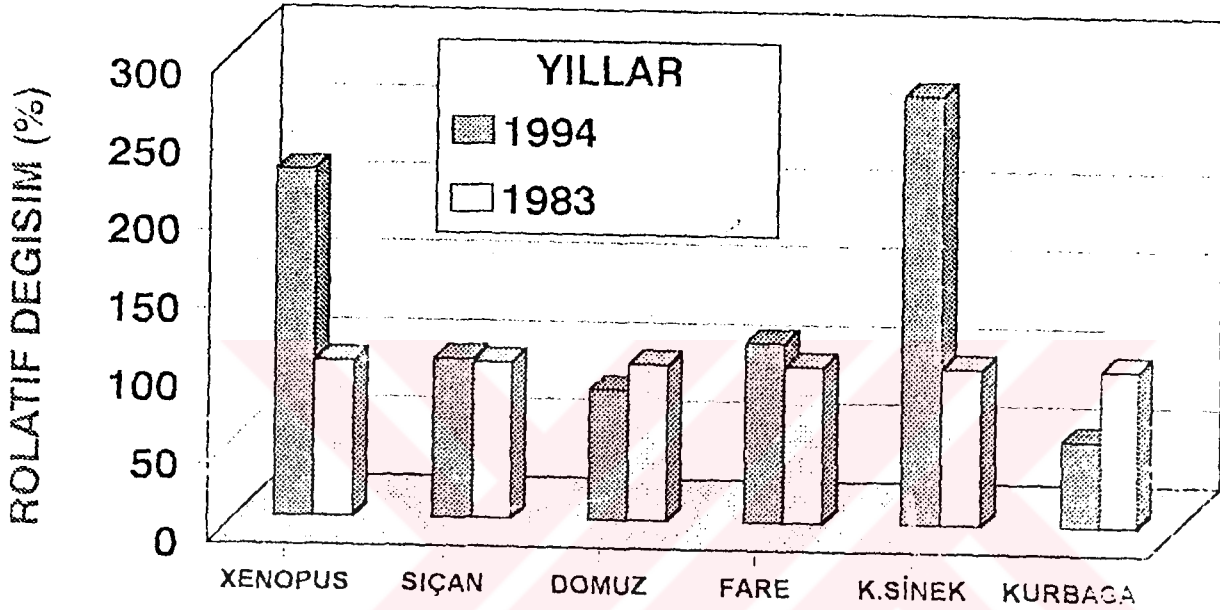


Sekil.29. 96 saatlik LiCl uygulamasında elde edilen LC50 ve EC50 değerleri

TARTIŞMA VE SONUÇ

1. Xenopus'un Kullanım Alanları

Amfibiiler son yıllarda gittikçe artan kullanım alanı bularak hayvan sistemlerinde popüler model durumuna gelmişlerdir. 1983-1994 yılları arasında çeşitli deney hayvanlarının kullanım yüzdesini saptamak için yaptığımız Med line taramasında Xenopus kullanımında %225 oranında artış olduğu gözlenmiştir (Şekil 30.)



Şekil.30. 1983-1994 yılları arasında çeşitli deney hayvanlarının kullanım yüzdesi.

Xenopusun ilk kullanım alanı gebelik testleri olmuştur. Son yıllarda Xenopusla gen mühendisliği alanında : gen izolasyonu, reseptör komponentlerinin kimliklendirilmesi, mRNA injeksiyonu ile translasyon sağlanması, nükleer transplantasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Xenopus' un erken kullanımları Witschi, Gallieu tarafından hormonlarla cinsiyet değiştirme işlemiyle olmuştur. 1950 de John Gurdon Xenopusta ilk olarak nükleer transplantasyonu gerçekleştirmiştir. Diğer taraftan embriyolojide yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (7 ye göre). Bir çok gruplar Xenopus laevis' in inbred konjenik dayanlı suşlarını üretmişlerdir (36).

Xenopus embryoları tarama testi olarak çok büyük avantajlara sahiptir. Bu embryolar memeli embryoları ile aynı gelişme süreçlerini izleyen klasik bir test hayvanı olup (8, 31, 33), diğer kurbağalardan farklı olarak laboratuvarında cansız yemle (alabalık yemi) beslenebilmekte, gerektiği anda yılın herhangi bir zamanında embryo elde edilebilmekte, döllenme vücut dışında gerçekleşmekte, embriyonik gelişme saate bağlı olarak standardize edildiğinden farklı gelişme evrelerinde gözlenen malformasyonlar hayvanı tahrip etmeden kolayca incelenabilmektedir (5, 29).

Noble, Xenopusu tarif ederken bazı karakteristikleri " primitif" bazı karakteristikleri ise özgünleşmiş olarak tanımlamıştır. Öte yandan Xenopusa ait karakteristiklerden hangilerinin sudaki yaşama uyum sonucu özgünleşerek kazanılmış olduğu, hangilerinin ise karadaki yaşama uyum sonucu kaybedilmeyi temsil ettiği konusunda görüş birliği bulunmamaktadır. Bir başka deyişle acaba Xenopusun ataları önce karada yaşarken bu genus daha sonra tekrar su ortamına geri mi dönmüştür, yoksa Xenopus daha hala karada yaşaması için gereken evrimden geçmemiş midir? Bu sorunun hala kesin yanıtı bulunmamakla beraber kesin olan şey, bu hayvanın bir grup su kurbağasını içeren Pipidaeye dahil olup Bufonoid kara kurbağaları ile ilgisi olmadığıdır. Kara kurbağası adının (toad) Xenopusa yapışıp kalmasının muhtemel nedeni hayvanın diğer birçok su kurbağasından farklı olarak kara kurbağalarının çirkinliğine sahip olmasıdır. Ancak hayvanın tüm gelişme evreleri incelenecek olursa yeterli mekan ve temiz koşullarda bunların çok istekli olarak yüzdükleri görülür. Larvalar harikulade çizgilere sahip ve saydam olup başkalaşımı tamamlayan uzun bacaklı kurbağacıklar, diğer diğer tüm bebek ve gençler kadar sevimlidirler. Erginler büyük gövde ve oburluklarını telafi etmek üzere öylesine ilginç anatomik, fizyolojik ve gelişimsel özelliklere sahiptir ki en sonunda kendilerini araştırmacılara sevdirmiş ve cazip bir laboratuvar hayvanı olma özelliği kazanmışlardır (31).

Xenopus laevis türü kurbağalar laboratuvarımıza ilk kez getirildiğinden FETAX testine geçmeden önce bu hayvanın laboratuvar koşullarında en rahat üretileceği, bakılacağı koşulları saptamak üzere çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Sıcaklık, beslenme, havalandırma, mekan faktörü, rastgele toplanan yumurtalarda döllenmişlik oranını saptamak üzere bir seri deneyler yapılmıştır:

2. Sıcaklık: Xenopus laevis 14°C nin altında 26°C nin üzerinde uzun süreli muamelelerde strese girerler. Yaşayan ergin sayısında, yumurta kalitesinde ve oositlerde azalma görülür. Stres oositlerin atrezisine neden olur (44). Hangi sıcaklıkta embriyoların daha iyi geliştiğini saptamak üzere bu deney yapılmış ve 24-26 °C sıcaklıkta larvaların daha iyi büyüüp geliştiği görülmüştür (p < 0.001) (Şekil VI, Tablo I, Şekil 6).

3. Beslenme: Larvalarda 5. gün başlar(28, 44). Isırgan otu tozu, alfa alfa yaprağı tozu ile mükemmel sonuçlar elde edildiği ileri sürülmüştür.(Nieuwkoop, Faber 1975(28' e göre), Özgünen 1994 (32' ye göre). Diğerleri kuru maya (Thomson 28' e göre) ciğer tozu (Deanesly, Parkes 1945 28' e göre) ile de iyi sonuç alındığını bildirmişlerdir (Faber 33.e göre). Fakat taze dana ciğeri kullanımının tatmin edici olmadığı ve büyüme inhibisyonu ile anomalilere yol açtığı bildirilmiştir. Wunderlich ve ark. ısırgan otu tozu, maya ve kemik tozunu 7:2:1 oranında kullanmışlardır. Kemik tozu kalsiyum ve fosfat kaynağı olarak hizmet eder. Bunlar yetersizliğinde hayvanlarda hayvanlarda iskelet deformiteleri meydana gelmektedir(44' e göre). Taze süt diyetine liyofilize maya başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Süt günde iki kez üzerini tam örtmeyecek şekilde küçük miktarlarda ilave edilmiştir (Kobel ve Nieuwkoop 44'e göre). Beslenme zamanları için çeşitli öneriler bulunmaktadır. Araştırmacılar genellikle beslenmenin haftada 1 kez (28), 2 kez veya hergün olmasını önermişlerdir. Beslenme amfibi larvalarında ağız açıldıktan sonra hala bir süre yedek yolk kullanabileceğinden bu süre içinde beslenmesine gerek yoktur. Anuranlar herbivordur. Ama karma diyet genellikle en iyisidir. Aç kalan kurbağa iribaşları ölü iribaşları, kurtları ve diğer organizmaları yerler. Anuran iribaşlarının barsaklarının uzun oluşu bunların vejeteryan diyetle beslendiğinin kanıtıdır (33). Sadece protein ve non vejeteryan diyetle beslenen türlerde barsak kısalma eğilimi gösterir. İspanaktaki oksalik asit tarafından oluşturulan ve başkalaşım evresindeki kurbağa iribaşlarında sıklıkla görülen böbrek taşları ciddi hasara neden olmaz ve görüldüğü kadarı ile ıspanak diğer diyetlere oranla larvaları başkalaşıma çok daha hızla ulaştırmaktadır (33). Bizim çalışmamızda larvaların iyi gelişebilmesi ve yaşama oranının artması için hergün beslenmesi gerektiği bulunmuştur. Larvaları beslemede, hafifçe kaynatıldıktan sonra gazlı bezden süzölmüş ıspanak özü kullanılmıştır (28,33) ($p < 0.05$) (Şekil 7).

4. Havalandırma: Bazı yazarlara göre larvalar kendi akciğerleri ile solumaya başlayıncaya kadar sudan hava geçirilmesi zorunludur (Bu yüzeyde hava kabarcıklarının görülmesi ile anlaşılır (5. gün)) (40, 44). Havalandırmanın larva büyümesini hızlandırdığı ve su yüzeyindeki fazla besinin havalandırma yolu ile uzaklaştırılarak larva ölümünü azalttığı ileri sürülmüştür (44).

Bizim çalışmamızda, sudan hava geçirme işlemi sadece 5 gün değil ; 60 gün süresince devam ettirilmiştir. İlk 5 günde kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır.. Farklılık 15. günde başlamıştır ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) (Tablo II, Şekil 8.)

5. Mekan Faktörü: Çeşitli araştırmacılara göre (ortam) mekan gelişim hızını belirlemede çok önemli rol oynamaktadır. Diğer tüm faktörler sabit tutulduğunda kalabalık olmayan gruplarda gelişim daha iyidir. İribaşlar hareket etmeye ve gıda aramaya başlar başlamaz gelişme hızında farklılaşma belirir. Aynı yumurta kümelerinde dahi gelişme hızı yönünden genetik farklılık bulunabileceğinden,

gelişme hızlarının hem farklı hem aynı sayıda hayvan içeren bölükler arasında oranlanması gerekir (32). Bu deneyde diğer koşullar sabit tutularak sadece kaplardaki iribaş sayısı farklı tutulmuştur. Yüzey alanı tüm kaplarda aynı olduğundan çözünen oksijen miktarında sabit olacak ve özellikle iribaşların hareketli oluşu vasatı sürekli karıştırarak çözünen gazlar tüm kapta eşit hale getirilecektir (32,44). Bunu laboratuvar koşullarında gözlemliyebilmek için; aynı büyüklükte iki kaba farklı sayılarda embriyo konulmuştur. Gelişim fazları Nieuwkoop'a göre değerlendirilmiştir. Larva sayısı az olan kapta gelişim evrelerinin daha ileri olduğu gözlenmiştir. Bu sonucumuz diğer araştırmacıların sonuçları ile uyumludur (ort±SE sıraile 46.7, 48.77 ve $p < 0.001$) (Şekil 10).

Sonuçta araştırmacılar çok hızlı bir gelişim istiyorlarsa kapta az sayıda iribaş bulundurmali, daha sık beslemeli, zengin besin kaynağı vermeli ve 23°C de sıcaklığı sabit tutmalıdır. Tabi bu metod sadece az sayıda hayvan gruplarında uygulanabilir (44). Bizim elde ettiğimiz sonuçlarla tek çelişen nokta sıcaklığın 24-26°C arasında olması ile en iyi almamızdır. Ayrıca bizim çalışmamızda, sularından sadece akciğer solunumu başlayıncaya kadar; 5 gün süresince değıilde sürekli hava geçirmenin gelişim açısından bir farklılık yaratmasa da yaşama oranında anlamlı farklılıklarar saptanmıştır (Şekil XI).

6. Randomize Alınan Gruplarda Döllenme Oranı: Yüzde döllenme oranının % 65-85 olduğu gözlenmiştir ($p < 0.001$). Literatürler deneylerde %95 ve üzeri fertil grupların deneylerde kullanılmasını önermektedir, ancak çalışmalarımızda gerek doğal yolla gerek indükleme ile bu orana ulaşamamıştır. Bu güne kadar 40.483 adet yumurta elde edilmiş, ancak bunun 12.025 tanesinin döllenmiş olduğu saptanmıştır. Toplam 34 defada elde edilen bu gruplarda dölleneme oranı %49.58 dir.(Şekil 9, Tablo III).

7. İndükleme ile Elde Edilerek Saat Başı Toplanan Ymurtalarda Evre Farkları: 5. saatten sonra elde edilen yumurtalarda gelişim evrelerinin daha ileri olduğunu gözlemlenmiştir. Bununla beraber literatürde bu bulgumuzu destekleyecek bir veriye ulaşamamıştır ($p < 0.05$, $p < 0.001$) (Tablo IV, Şekil 11).

8. Toksikite: Belli miktarda alındığı takdirde canlı organizmaya kimyasal yollardan zarar veren ve hatta ölümcül olabilen bütün maddelere zehir denir. Bir kimya laboratuvarında bulunan kimyasal maddeler ve bileşikler miktarına ve kullanım maksadına göre zehir yada ilaç yerine geçebilirler. Pratikte zehir(toxique, poison) özelliğine sahip maddeler gram hatta miligram düzeyinde organizmada zararlı değışikliklere ve vazife karışıklıklarına neden olan ve bu etkileri kimyasal ve/veya fizikokimyasal yollardan oluşturan nesnelere dir (11).

9. FETAX Testi: 1977'de Amerikan Kimya derneği total 4.029.907 adet birbirinden ayrı kimyasal bileşiğin bulunduğunu ve buna her hafta 5000 yeni bileşiğin eklendiğini yayınlamıştır. Bu maddelerden sadece 1930 tanesi teratojenite yönünden test edilmiştir. Üreme bozukluklarının çevrede bulunan toksik ajanlara maruz kalma sonucu görüldüğünün giderek anlaşılması nedeni ile bu rakamlar özellikle çarpıcı bir değer almaktadır. Keza konu bu yönden ele alındığında döllenmiş insan yumurtasının %50'sinin normal gelişme göstermediği ve düşük olduğu bilinmektedir (37).

Günümüzde özel merkezlerde kimyasal maddeler 3 ayrı faz temas kullanılarak tam hayvanda reproduktif toksisite yönünden değerlendirilmektedir. Bu fazlar ;

1. Çiftleşme öncesinden süttan kesilmeye kadar,
2. Organogenez esnasında,
3. Perinatal periyod esnasında,
4. Daha sonra çiftleşme, fertilitte, implantasyon, doğum, laktasyon, embriyo toksisite, teratojenisite ve neonatal etkiler kaydedilmektedir.

Tahmin edileceği gibi bu yaklaşım çok miktarda bilgi üretmekte ancak bunun bedelide korkunç bir zaman ve para kaybı olmaktadır. Ayrıca her yeni kimyasal için bu protokolün aynen kullanılması olanaksızdır. Dolayısı bir bileşiğin memeli embriyogenezi üzerine olan etkilerini doğru şekilde önceden ön gördürecek alternatif tarama sistemlerine ihtiyaç vardır. Bu sistemlerin hızlı bir sonuç vermesi, ucuz olması, yinelenebilir olması ve yapılmasının basit olması zorunludur (37).

Araştırmacılar bunun yüzden, bu şartları karşılayacak sistemleri bulabilmek için çeşitli hayvan modellerini denemişlerdir. Bu modeller; bakteri, drosophila, planarya, tam embriyo kültürü, dugesia ve Xenopus ve diğer cins kurbağalardır.

Birçok araştırmacı tarafından Xenopus testinin en avantajlı ve memelilere en uygunluk gösteren test hayvanı olduğu ve en iyi teratojenisite testi olduğu onaylanmıştır.

Waddigton 1956 da tripan mavisinin amfibi embriyosu üzerine teratojenik etkisini saptamak için çalışmalar yapmıştır. Bu çalışmada tripan mavisinin anne kanı gibi bir aracıya gerek kalmaksızın embriyoya direkt olarak uygulandığında, anormalliklere yol açtığını kanıtlanmaktadır. Buna karşın gebe memelilere zerk edildiğinde bu boyanın fötus tarafından absorbe edilmesi sonucu direkt bir etki mi yaptığı yoksa anne sıvılarında modifiye olduktan sonra mı etki yaptığı sorgulamaya açıksa da bu ikinci olasılığın doğru olduğunu düşündüren bir ön bilgide mevcut değildir.

Tripan mavisinin amfibi yumurtalarında oluşturduğu anomalilerden notokorun mezodermalizasyonu, Lityumun amfibi embriyolarına olan etkisine son derece benzeyen bir anomalidir (43).

Greenhouse 1975 yılında amfibi türlerine ait embriyo ve larvaları kullanan bir polutan test sistemi geliştirmek amacı ile bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada aminleri kimyasal olarak kullanmıştır (20).

İribaşların kesin toksisiteye sahip çeşitli çevresel polutanlara karşı duyarlı olduğu gösterilmiş olup, bu maddeler arasında pestisidler (Cabejszek 1973, Cook 1972, 1973, Bancroft ve Prahlad 1973); Herbisidler (Pravda 1973) ve ağır metaller (Birge ve Just 1973) ile bilinen teratojenler örn. tripan mavisi (Greenhouse ve Hamburg 1968), LiCl (Hall 1942) ve tetrasiklin (Greenhouse 1975) bulunmaktadır (20 ye göre). Bu çalışmada embriyo ve larvaların ortamdaki kimyasal maddelere göreceli duyarlılığı incelendiğinde, embriyoların larvalara göre çok daha yüksek yoğunluklara tahammül edebildiği ortaya çıkmış olup, bunun muhtemel nedeni embriyonik evrelerin, pratik olarak ortamdaki maddelere karşı geçirimsiz olmasına karşın larva evrelerinin ileri derecede geçirimli olmasıdır(20).

Embriyo-iribaş sistemi viabiliteye ek olarak teratojenite hakkındada bilgi vermektedir. Bu bilgi test materyali olarak tek hücreli veya erişkin çok hücreli organizmalardan elde edilemez.

İnsan topluluklarında konjenital malformasyon ensidansının yüksek oluşu ve bunların etiolojisi hakkındaki bilgilerin azlığı teratojenitenin öngörülmesinde böyle bir sistemin kullanılmasını pratik bir zorunluluk haline getirmektedir (20).

Greenhouse 1976 da yaptığı çalışmada ise hidrazin, metil hirazin ve dimetil hidrazinin Xenopus embriyosu üzerine olan teratojenik etkisini değerlendirmek için bir çalışma yapmıştır.

Deneyinde sadece %95 ve üzeri fertil olan grupları kullanmıştır.

Elde edilen verilere göre malformasyonların daha çok nörulasyon evresindeki maruziyette(13-20. evre) görüldüğünü, daha önce ve daha sonraki evrelerde muamelenin letal olduğunu veya gözlenebilir bir etkiye sahip olmadığını ortaya koymuştur. Malformasyonlar kafa, gövde ve kuyruğu ilgilendirmekle beraber tüm embriyolarda notokor anormal olup bu da anomalinin diğerlerine yol açtığını düşündürmüştür (21).

Dial 1976 da yaptığı çalışmada, metil merkürinin Rana cinsi kurbağalar üzerine olan etkisini incelemiş ve kurbağa gastrulalarının kimyasal muameleye başladıktan sonra özellikle blastopor bölgesinden etkilendiğini görmüştür. Gastrulasyonun erken gelişimi evresinde önemli bir basamak olması nedeni ile (zira bu dönemde bir seri metabolik ve uzaysal ilişkiler değişikliğe uğramaktadır) bu olay daha önceden belirlenebilir (12).

FETAX (Frog Embryos Teratogenesis Assay: Xenopus) Dumont ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olup bu gün için kimyasal ajanların ve kirli suların teratojenik riskini tayinde bir tarama testi olarak yararlı olduğu kanıtlanmıştır (14). FETAX testi sadece kontrol ve test çözeltileri kullanılarak uygulanmakta ve çalışmanın sonucu 96 saat gibi oldukça kısa sürede kolayca nümerik olarak değerlendirilebilmektedir (16).

Testin 96 saatte bitirilmesinin birçok nedeni mevcuttur. Öncelikle testin 96 saatte durdurulması testin hızını artırmaktadır. 45. evrede bulunan *Xenopus* embriyolarında gros malformasyonlar kolayca saptanır. Larvalar motil iseler de henüz beslenmeye başlamamışlardır. Testin 96 saatten sonraya uzatılması beslenme, fekal materyalin birikmesi ve ortamda bakteri üremesi gibi diğer sorunların doğmasına yol açar. Bununla beraber bu testi 96 saatten sonraya uzatmakta kabildir (Dumert 1984 8'e göre). Daha sonra larva evrelerinin kullanılması ile metabolik aktivatör sistem kullanmaya gerksinim başlar. Ve başkalaşım süreci bacak gelişmesini etkileyen teratojenlerin deteksiyonu şansını doğurur (8).

Fetax kullanarak gelişmenin hangi evresinin etkilendiğini saptamakta mümkün olup; bunun nedeni gelişmenin eksternal olması ve kuşkulanan teratojenin gelişme esnasında istenildiği anda ilave edilmesidir (8).

Gelişimin eksternal olmasından ötürü mortalite ve malformasyon hızları zamana karşı gözlemlenebilir. Amfibi embriyosunda hücre bölünme hızı gelişmenin ilk 48 saati içinde çok yüksek olup, bu hız daha sonra azalmaktadır. Bu testte embriyonun tamamı bir disseksiyon mikroskopunda incelenir ve gros malformasyonların varlığı tayin edilir. Bu yöntemle normalde saptanamayan embriyo harabiyetinin fark edilmesi mümkündür. Yüzme davranışı ve anormal pigmentasyon selüler düzeydeki harabiyetin ortaya çıkarılması için belirlenmiş olan bitim noktalarını oluşturur (Dumont 1983 8'e göre).

Fetaxın özgün yararı çok sayıda nicelendirilebilir bitim noktasına sahip olmasıdır. Bunlar arasında iskelet ve iç organ malformasyonları, ödem, bül görülmesi, pigmentasyon değişiklikleri, anormal yüzme davranışı ve gelişme geriliği bulunmaktadır (39).

Ayrıca bu testin sadece tek bir kimyasalın değil, kompleks karışımlarında test edilmesinde kullanılabileceği Dawson ve ark. tarafından 1985'te gösterilmiştir (18). Bu test sadece toksisiteyi ve toksisiteden sorumlu nedenleri göstermekle kalmayıp kompleks karışımlarda yapılacak bir testte farkedilmeyecek metallere bağlı bir teratojenik etkiye gösterecektir. Mortalite ve malformasyon yoğunluk eğrilerinin üst üste bindiği bölgelerde embriyoya yönelik ana tehlike ya ölüm yada daha düşük yoğunluklarda görülecek olan hüüme inhibisyonudur (18). Bununla beraber embriyoların bir çoğu ağır şekilde malforme olduğundan teratojenisite aşırı ilzam edilmemelidir. Mortalite ve malformasyonun eğrilerinin birbirinden açık şekilde ayrıldığı durumlarda ise teratojenik risk büyük olacaktır. Uygulanan bir testin amacı etkileri saptama ve bu etkilerin nedenlerini belirlemede bu genel amaç FETAX tarafından sağlanmaktadır(18).

Gene Dawson ve Bantle (14)'a göre Dumont 1983'de EC50 ve LC50 değerlerini ortaya atmıştır. 96 saatlik EC50 96 saatte embriyoların %50 sinin malforme olduğu yoğunluktur. Aynı şekilde LC50 de 96 saatlik testte %50 letaliteye neden olan yoğunluktur (14).

96. saate ait LC50'nin 96.saate ait EC50'ye oranı Teratojenisite İndeksi(TI) ni verir. Bu değer bir maddeye ait teratojenisite riskinin tahmininde kullanılmaktadır. TI değeri 1.3-2.0; 2.0- 3.0 ve 3.0 dan büyük olan maddeler sırası ile zayıf, orta şiddetli ve şiddetli teratojenler olarak adlandırılır. Bir maddenin teratojenisitesinin nihai tayini ise malformasyonun tipi ve şiddeti ile hayatta kalmış embriyoların %100 malformasyon gösterdiği en düşük yoğunluktaki % embriyo mortalitesini içerir (18).

TI, farmakolojide bir ilacın diğer ilaçlara oranla emniyet marjını gösterecek ölçek olarak kullanılan terapötik indekse benzemektedir (13 e göre Gerald).

Dawson ve Bantle (14) 1987'de Fetax testi için kullanılacak bir düzenlenmiş su vasatı geliştirdiler, Dumont ve ark. tarafından geliştirilen bu testin bu gün için kimyasal ajanların ve kirli suların teratojenik riskini tayinde bir tarama testi olarak yararlı olduğunu kanıtladıklarını yazmışlardır.

Testin genel kabul görmesi için Fetax'ın intra ve interlaboratuvar değişkenliğini asgariye indirecek şekilde modifikasyona uğratılmasının zorunlu olduğu düşüncesi ile çözgen olarak suyun kullanıldığı akuvatik toksisite biyoesseylerinde seyreltici olarak kullanılan suyun niteliğinin laboratuvarlar arası büyük değişkenlik göstermekte olduğu ve alınan sonuçların yorumlanmasında zorluklara yol açması (USEPA 1975) nedeni ile uygun *Xenopus* gelişimine izin veren ve aynı zamanda tanımlanmamış bir vasattan kaynaklanacak varyasyonları azaltacak bir düzenlenmiş su formülü kullandılar.Bu çözelti *Xenopus* embriolarında mükemmel bir gelişme sağlamakta , malformasyon ve mortalite yüzdesini düşürürken kontrol embriolarının gelişme ve büyüme hızlarını artırmaktadır (14).

Davis ve ark. 1981 de yaptıkları çalışmada aromatik aminlerin *Xenopus laevis* üzerine olan toksik ve teratojenik etkisini incelemişlerdir .Elde edilen verilere göre anilin, akridin ve kinolin gibi aromatik aminler düşük yoğunluklarda bile toksik ve teratojenik etkileri olduğunu göstermiştir.

Bu bileşiklerin doğal çevrede meydana getireceği tehdit, bildirilen LC50 değerlerinden çok daha ileri boyutta olup bunun nedeni gelişme hızında gerilik, anormal pigmentasyon ve azalmış motilitenin bu canlıların doğal ortamdaki yaşama yeteneğini dahada azaltmasıdır.Bu yazarlara göre bu hayvanlarda görülen immobilitenin kesin nedeni selüler ve dokusal harabiyettir (13).

Birge ve ark. yukarıda da değinildiği gibi 1985 de yaptıkları deneyde tek başına bulunan maddeler veya kompleks etkileri incelemek için kullanılabilir, kısa süreli embriyo - larva sistemi geliştirmişlerdir. Akuatik Toksikolojide biota üzerine olan toksik stresin nicelendirilmesi temel olarak klasik akut ve kronik test yöntemlerine istinat etmektedir (4). Akut testin toksikoloji araştırmalarında ana yöntem haline gelmesinin ana nedeni; büyük ölçüde bu testin basit oluşu , kısa sürede ve ucuza mal olmasıdır. Ekonomik yönden kronik araştırmalar yaşam döngüsünün tümü veya büyük bölümünü içeren maruziyet periyotları gerektirdiği için uzun yıllar önce araştırmacılar kısa süreli test yöntemleri araştırmaya başlamışlardır (Mc Kim 1977. Birge 1981 ,4'e göre).

Dawson 1987' de metil ksantin ve inhibitör bileşiklerin *Xenopus* embriyolarında potansiyelize teratojenik etkisini saptamak için DNA (hidrokşi üre ve sitozin arabinozid ,) protein (sikloheksimid ve emetin) ve nükleik asit sentez inhibitörleri, metil ksantinlerin herbiri ile beraberce kullanılmıştır (kafein, teofilin, teobromin). Bu çalışmada kafein veya teofilinin inhibitör bileşiklerle beraber kullanılmasının teratojenik etkiyi potansiyelize ettiğini göstermişlerdir (15).

Bu çalışmanın amacı DNA , protein ve nükleik asit sentez inhibitörlerine ait *Xenopus* embriyolarındaki teratojenik etkilerin aynı anda metil ksantinlerinde kullanılması ile potansiyelize olup olmadığını saptamaktır. Böyle bir potansiyalizasyonun tıpkı memelilerde olduğu gibi mevcut olduğunun gösterilmesi ile Fetax testinin invitro teratogenez testi olarak kullanılma değerlendirilmesi işlemine olumlu katkı sağlanmıştır (15).

1988'de Fort, Dawson, Bantle (19) *Xenopus* embriyolarının gelişmenin ilk 48 saati içinde kısıtlı bir metabolik metabolizmaya sahip olmasından ötürü Aroclor 1254' le indükte edilmiş sıçan karaciğer mikrozoamlarının kullanıldığı invitro bir metabolik aktivatör sistem geliştirmişlerdir (19).

Günümüzde kullanıldığı biçimi ile Fetaxın invitro teratogenez testinde test irdelemede öngörülen kriterlerin büyük bölümünü karşılar. Bununla beraber erken evre *Xenopus* embriyolarının mikrozomal mikst işlevsel oksidaz sistemi ile (MFO) proteratogenik bileşikleri teratogenik metabolitlere biyotransforme etme yeteneği çok az veya hiç yoktur. Bantle ve Dawson (19) tam sıçan embriyo kültürü kullanan Kitchin ve Woods'un verilerine dayanarak, Fetax için ekzogen metabolik aktivatör sistem olarak yakın tarihlerde indükte edilmemiş sıçan karaciğer mikrozoamlarını kullanmışlardır. Böyle bir aktivatör sistem Fetaxın ön görme doğruluğunu artıracak ve böylece insandaki gelişme toksikanlarının deteksiyonunda kullanılabilir. Yani sonuç olarak FETAX testinin metabolik kapasitesi olmaksızın insanda gelişme toksisitesine sahip maddelerin başarılı şekilde taranmasında işe yararlıları kuşkuludur. Testlerde gözden kaçan proteratogenik maddeler insanda metabolizma sonucu teratogenik forma dönüşüp doğum kusurlarına neden olabilir (19).

Bu gün için FETAX , örneklerin hızla taranması ve daha ileri memeli testleri için önceliğin belirlenmesinde yararlı bir test niteliğindedir. Testin değerlendirilmesi tamamlandığında bu yöntem çeşitli ajanların teratogenisitesini ve bu sürece katılan işlemlerin standardizasyonu için yeterli bilgi sağlayacaktır (19). Dawson ve Bantle 1985 de *Xenopus laevis* embriyolarının fungusid ve herbisidlerin (Anderson 1975 14' e göre), kimyasalların (Greenhouse 1976, 21), ağır metallerin (Miller 1978, 14'e göre) ve kompleks atıkların (Birge 1985,4) teratojenik ve toksik etkilerini ortaya çıkartmakta kullanıldığını yazmışlardır. Diğer araştırmacılar da *Xeopus* ve diğer amfibi türlerini kullanarak benzer araştırmalar yapmışlardır.

10. Lityumun Etkileri: Uzun zamandan beri Lityumun amfibi türlerinde larval vücudu etkilediği bilinmektedir. Çalışmalar göstermiştir ki lityuma erken evrelerde (yarıklanma fazı) muamele edilen embriyolarda, posterior yapının redüksiyonu görülür. Örnek verecek olursak kuyruk yüzgeci, larval fazdaki segmente somitler (5,6,9,30,48,49,52). İleri fazlarda lityuma maruz bırakılma (gastrula fazı fazı) anterior yapının redüksiyonuna yol açar. Buna örnek ise baş, optik veziküller ve sement bezleri. Bu bulgular lityumun larval vücut formasyonu üzerine blastuladan gastrulaya kadar etki ettiğini göstermiştir (5,49). Bölünme siklusunun aniden yavaşlaması ve asenkronizasyonu midblastula transisyon olarak biliniyor blastula süresince oluşur. Xenopusda ve Cynopsda 12. bölünmede morfogenez için gerekli çeşitli RNA ve protein sentezinin başlangıç zamanının MBT olduğu bilindiği yazılmıştır (Yamaguchi ve Shinegawe'ya (52) göre Lee ve ark.). Bu araştırmacılar lityum etkisinin hangi fazda hangi değişiklikleri yaptığını tam olarak saptamak için çalışmışlardır. Diğer araştırmacıların bunu yapmamış olmasının nedeni, daha önceki çalışmalarda nispeten düşük konsantrasyonda (yaklaşık 0.1 M) uzunca bir süre (1-4 saat) maruz bırakılmasıdır. Bu uzun periyot süresince embriyoların çoğu 2 veya daha fazla yarıklanma siklusuna uğrar ve sonrada kesin başkalaşması tesbit edilemez(52).

Kao ve ark. (Yamaguchi ve Shinogowe'ya(52) göre) 0.3 M lityumun 6 dakikada posterior yapıyı redüksiyona uğrattığını bulmuşlardır. Yaptığımız pilot çalışmada bu araştırmacıların bulgularına uyan sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca Yamaguchi 0.4 M da 5 dakika tutmanında aynı etkiyi yaptığını bildirmiştir. Bizime çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Literatürlere göre 2¹² hücreli evreye kadar 5 dakikalık muamelelerde anteriozasyon görülür. Anteriozasyon 4'e ayrılarak derecelendirilir:

A1: Kuyruk redüksiyonu

A2: Posterior yapının redüksiyonu (ör.kuyruk yüzgeci, segmente somit)

A3: Posterior yapının yokluğu (ör.göz ve sement bezi)

A4: Aksiyal yapının yokluğu fakat radyal yerleşmiş sement bezi

2¹³ hücreli evreden geç blastulaya kadar her evrede 5 dakikalık muamelelerde posteriozasyonda 4'e ayrılarak derecelendirilir:

P1: Anterior yapıyı redüksiyonu

P2: Göz ve sement yokluğu (posterior yapı normal)

P3: Baş ve kuyruk yokluğu (segmente somit var)

P4: Yuvarlak bir şekil, belirgin eksternal organ yok (ör. sement bezi)

Erken nöral evresinden sonra bu konsantrasyona maruz bırakılan embriyolarda hiçbir anomali görülmemiştir (bu etki erken nöral fazında ortadan kalkar) (45).

Daha önce bahsettiğimiz gibi, pilot çalışma yaptığımızdan dolayı sadece 2, 4 ve 8 hücreli evrelerde kimyasal maddeye maruz bırakılmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Anomali olarak en fazla

sırasıyla A1, A2 ve A3'te derecelendirilen anomaliler görülmüştür (Tablo VI).

Lityumun morfogenez üzerine etkisi uzun süreden beri bilinmektedir. Lityum muamelesi vegetal kutupta köken alan yapı prodüksiyonunun artmasına neden olurken, animal kutuptan kaynaklanan yapılarda da azalma olur. Amfibi embriyolarında lityum muamelesi notokor gelişimini etkiler ve nöral yapının redüksiyona yol açar (ör. optik rudiment). Breckenridge (29), Morgan (1903), Backstrom'da (1954) (29a göre)benzer sonuçlar elde edip, nöral diferansiyonun redüksiyona uğradığını ileri sürmüşlerdir. Sonuçta lityum embriyoyu ventralize etmektedir. İleri evrelerde muamelelerde ise nöronal farklılık ve gelişimsel kusurlar normal düzeye inmiştir.

Bu araştırmacı ayrıca Xenopusta Lityum alımı ve görünür etkilerin eşik değerinin 0.5mM olduğunu ve maksimal etkinin ise 2-3 mM de görüldüğünü bildirmiştir (5).

Çalışmamızda, elde edilen embriyolar, bu literatürde verilen konsantrasyonları bu çerçeve içerisinde artırarak LiCl'a maruz bırakılmıştır. Elde edilen bulgular literatür ile uyumludur. Anomali olarak daha çok A1, sonra A2 ve A3' le derecelendirilen anomaliler bulunmuştur.

Slack literatürde 0.1 M LiCl'a 2 saatlik muamelenin anterozasyon yaptığını göstermiştir (41). Yaptığımız deneyde 0.1 M LiCl'e 4 saat maruz bıraktık ve tüm yumurtalar gastrula aşamasında süprese olduğu görülmüştür (Tablo VIII).

FETAX testini gerçekleştirmek için çalışmamızda temelde Dumont'un yöntemi kullanılmıştır.

Xenopus yumurtasının jel membranı soyulmamış ve çözelti 96 saat boyunca hiç değiştirilmemiş; sadece çözelti eklenmiştir. Farklı olarak , 1987 de Dawson tarafından geliştirilen Fetax çözeltisini kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca Dumont çalışmalarında gastrula aşamasındaki embriyoları kullanmıştır. Bizim çalışmamızda son aylarda muhtemelen yaz mevsimi olduğu için ve daha önceki çalışmalarımızda yüksek dozda hCG verildiğinden,, istediğimiz sayıda döllenmiş yumurta elde edilemediğimizden, gastrula aşamasından sonra 96 saatlik muamelede % 50 ölüme neden olan konsantrasyonu bulunamamıştır. Bunun yerine elde edilen az sayıdaki embriyolarla yapılan çalışmaları yürütürken çeşitli literatürlerden yararlanarak 2-4 hücreli evreden sonra 96 saatlik muamelede %50 ölüm ve %50 malformasyona neden olan konsantrasyon bulunmuş , % anomali ve % yaşam değerleri ile her konsantrasyonda gözlenen başkuyruk uzunlukları karşılaştırılmış ve gözlenen anomaliler Yamaguchi'ye göre (45) derecelendirilerek ve o sınıfa koyamadığımız anomaliler adları verilerek Tablo halinde sunulmuştur (Tablo XII,XIII, XIV, XV, XVI, XVII).

Bu çalışmayı takiben hemen aynı konsantrasyonu bu kez 7.-8. evredeki embriyolara denenmiştir. Bir çok araştırmacının da belirttiği gibi evreye bağımlı yanıt farklı olmuştur (Tablo X. XI)

Bu deneyde aynı konsantrasyonda fakat farklı evrelerde LiCl'ün çeşitli yoğunluklarına maruz bırakılan embriyolarda hem % yaşam oranında hem de anomali tipleri arasında farklar bulunmuştur.

Yani aynı konsantrasyona 2-4 hücreliden sonra 96 saat muamelede % 100'e varan ölüm ve malformasyon görülürken bu deneyde yaptığımız gibi 7-8. evrede 96 saat muamelede en fazla %27.4 oranında ölüm ve %17.3 oranında malformasyon gözlenmiştir (Tablo X).

Tüm bu çalışmalarda kafa anomalisi olarak siklopi, mikroftalmi, birkaç anensefali de dahil olmak üzere mikrosefalinin tüm tipleri görülmüştür. Amfibilerde mikrosefali olayı büyük oranda görülmekte olup, bu olay genellikle kimyasalın sinir sisteminde bir azalma yaptırmasına bağlıdır (43).

Bazılarında gözler lateralden ziyade medial olarak yerleşmiştir. Siklopik embriyoda siklopiya perfektanın ful sendromu görülmüştür. Yani mevcut tek gözün büyük parçaları tam veya inkomplettir. Normal olarak iki göze sahip embriyoların bazılarında göz yuvarlağının tamamlanmadığı gözlenmiş ,bazılarında bir gözün normal olup diğer gözün olmadığı görülmüştür.

Gözlenen anomalilerden kırık kuyruk ; hem dorsoventral hemde horizontal planda görülür. Aksial iskeletteki kırıklar - bükülmeler notokordal hiperplaziye, sekonder nöral tüp gelişmesi bifurkasyona uğramış notokora bağlıdır (2).

Bir hayvanda birden fazla kırıkta görülmüştür. Ayrıca az miktarda gözlediğimiz iki kuyruklu hayvanlarda bifurkasyona uğramış notokor vardır. Bu bifurkasyon kuyruk tomurcuğunun önünde görüldüğünde iki nöral tüp ve iki iki notokorla iki kuyruk meydana gelecektir. Çok az miktarda görülen bu kuyruk çiftleşmesi gövdenin kısılmasına neden olur ve bu iki kuyruk yamru yumru bükülmüş haldedir. Bu şekildeki anomali, yapılan pilot çalışma 1' de 0.3M de 2 hücreli evrede 6 dakika tuttuğumuz embriyolarda ve Pilot çalışma3' te, (Evre 7-8) 4×10^{-3} M konsantrasyonda gözlenmiştir.

Sık gördüğümüz malformasyonlardan bir tanesi de mikromiyelia olup bu olay spinal kordanın anormal derecede kısılmasıdır. Gövdede beliren anomaliler bariz şekilde embriyonun boyca uzayamaması (Tablo XII-XVII) ve ödem oluşumuna bağlıdır (Çeşitli konsantrasyonlardaki anomaliler, Şekil XIII-XXIX) anormal embriyolar ve larvalar yüksek oranda ödem geliştirir. Bu anomali baş ve kuyruksu da görülmesine karşın , yaptığımız çalışmada daha çok gövdede gözlenmiştir. Bu anomalide embriyolar son derece şişmiş olup, doku mesafeleri sıvı ile doludur. Bunun nedeni gastrulasyon hareketlerinin inhibe olmasıdır. Arka uçta gözlenen notokor kütlelerin nedeni kuyruk tomurcuğunun inhibe olmasıdır.

Sık rastladığımız bir diğer anomalide bül oluşumudur. Bu dokunun hücreleri sıklıkla vakuollü ve şişmiş haldedir. Epidermis altta yer alan mezoderm ile füzyona uğramış olabilir. Bu katman bazan kendisi boyca uzayamayan bir embriyoda gelişmenin devam etmesine bağlı olarak çok sayıda kıvrımlar ve bukleler yapar (Şekil).

Bül oluşumu genelde ödemle beraber gözlenmiştir. Gerçi ödem çeşitli yapısal anomaliden sonra ortaya çıktığından diğer defektlerin primer nedeni ödemin yol açtığı şişkinlik değildir.

Gastrulasyonun süpresyonu olayında gastrulasyondan önce muamele edilmiş ve son derece afetzede olmuş

bazı yumurtalarda invajinasyon sürecinin tamamı süprese olmuştur. Embriyo hiç bir doku farklılığının görülmediği az veya çok özelliksiz bir kütle halindedir (20).

Yapılan çalışmada bu olay, 2-4 hücreli evreden sonra 4 saat LiCl e maruz bıraktığımız embriyoda gözlenmiştir.

Ranzi'ye göre (43' e göre) bir grup madde embriyoda vejetalizasyona neden olacak şekilde etki yapar. Bu gruba giren Lityum amfibide korda mezodermalizasyona yolaçar. Bu maddeler çözültideki protein partiküllerinin agregasyonunu değiştirerek etki gösterirler. Vejetalizasyona yol açan maddelerin, embriyolojik olarak aktif yoğunlukta kullanılmaları halinde fibriler protein çözültülerinin viskozitesini artırdığını bulmuşlardır. Bu güne kadar sadece birkaç maddenin amfibide mezodermalizasyona yol açtığı ortaya konmuştur.

Gastrulasyon ve kuyruk tomurcuğunun uzaması üzerine olan morfogenetik etkilerin stoplazmadaki protein partiküllerinin fiziksel durumunu değiştirmeye dayanması olası ise de bu konu daha ziyade spekülatif bir görüştür.

Ödeme yol açmak üzere sıvı dengesinde bozulma olması , epidermis üzerine olan etkiler , nöral ve mezodermal dokuların vakuollü dejenerasyonu bunun protein viskozitesi üzerine olan etkisi yerine muhtemelen çok daha genel bir toksik özelliğine bağlıdır (50).

Yaptığımız FETAX testinde milimetrik kağıda elde edilen değerler yerleştirildiğinde (% olarak), LC50' nin 0.0022 M, EC50' nin 0.00088 M olduğu bulunmuştur. Bu değerler birbirine oranlandığında TI: 2.5 olarak bulunmuş ve lityumun orta şiddette bir teratojen olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak; Lityum klorürün animalizasyon ve vejetalizasyon üzerine olan etkisi standardize edilmiş olan amfibilerde ekzogastrulaya neden oluş gösterilmiştir. Çok çeşitli kimyasallar gastrulasyonu bozmakta olup, oluşan etkilerin uniformite ve yinelenebilirliği açısından LiCl tatmin edici bir maddeye benzemektedir.

LiCl kullanılsa dahi elde edilen sonucun çeşitli faktörlere bağımlı olduğu gösterilmiş olup bu faktörler;

- a. Lityum yoğunluğu
- b. Bu tuza maruz kalma süresi
- c. Embriyonun gelişme evresi
- d. Vasatın sıcaklığı
- e. Diğer tuzların varlığı

Farklılaşım üzerine olan etkiler gastrulasyon esnasında çok büyük önem taşıyan gelişme faktörleri arasındaki duyarlı dengenin bozulmasına bağılı olup gözlenen sonuçlar, baş ve kuyruk organizörlerinde nisbeten daha fazla etki yapmaktadır. Vasatta kalsiyumun bulunması ve kontrol vasat tuzlarının varlığı

bu olumsuz etkiyi hafifletmektedir (Özgüven, 32).

FETAX testi için bu ön çalışmayı yaptıktan sonra, bu konudaki daha ileri çalışmalar yapılacaktır.



KAYNAKLAR

1. Ames B Mc Cann J Yamasaki E: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/ Mammalian- microsome mutagenicity test. *Mutation Res*, 1975, 31:347-364
2. Browne CL, Dumont JN: Toxicity of Selenium do Developing *Xenopus laevis* Embryos. *J Toxicology Environ Health*, 1979, 5:699-709
3. Best JB Morita M: Planarians as a model system for invitro teratogenesis studies. *Terat Carcino Mutagen*; 1982, 2:277-291
4. 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. Toxicol. Chem*, 1989, 4:807-821
5. Brecken Ridge LJ Warren RL Warner AE, Lithium _nhbits morphogenesis of the nervous system but not neuronal diffirentation in *Xenopus laevis*. *Development*, 1987, 99:353-370
6. Busa W.B Gimlich RL: Lithium Induced Teratogenesis in Frog Embryos prevented by a Polyphosphoinositid Cycle Intermediate or a Diacylglycerol Analog. *Developmental Biology*, 1989, 132: 315-324
7. Brian K. Kay, H. Benjamin Peng, *Methods in Cell Biology*, Volume 36, *Xenopus laevis: Practical Uses in Cell and Molecular Biology* , edited by Brian Kay, H. Benjamin Peng, Academic Press, 1991 p: Preface
8. Courchesne CL Bantle JA: Analysis of the activity of DNA, RNA and Protein synthesis inhibitors on *Xenopus* embryo development. *Teratogenesis. Carcinog. Mutagen*, 1985, 5:177-193
9. Cortese R, Harland R, Melton D, Cooke J Smith JC: The restrictive effects of exposure to lithium upon body pattern in *Xenopus* development studied by quantitative anatomy and immunofluorescence, *Development*, 1988, 102:85-99
10. Cooke J, Symes K, Smith EJ: Potentiation by Lithium Ion on morphogenetic Responses to a *Xenopus* Inducing Factor , *Development*, 1985, 103: 549-558.
11. Çayan S., *Genel Toksikoloji*, Çukurova Ün. Tıp Fak. Adli Tıp Kurumu, Adana, 1981, p:1-10.
12. Dial NA: Methyl mercury; Teratogenic and lethal effects in frog embryos. *Teratology*, 1976, 13:327-334
13. Davis K Schultz TW Dumont JN: Toxic and Teratogenic Effects of Selected Aromatic Amines on Embryos of Amphibian *Xenopus laevis*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1981, 10:371-391
14. Dawson DA Bantle JA: Development of a reconstituted water medium and preliminary validation of the frog embryo teratogenesis assay. *J Appl Toxicol*, 1987, 7:237-244
15. Dawson DA Bantle JA: Coadministration of methylxanthines and inhibitör compounds potentiates

- teratogenicity in *Xenopus* embryos, *Teratology*, 1987, 35:221-227
16. Dawson DA Stebler EF Burks SL Bantle JA: Evaluation of the developmental toxicity of metal-contaminated sediments using short-term fathead minnow and frog embryo-larval assays. *Environ Toxicol Chem*, 1988, 7:27-34
 17. Dumont J, Schultz TW Buchanan M, Kao G: Frog Embryo Teratogenesis Assay: *Xenopus* (FETAX)- A short term Assay applicable to complex environmental mixtures. In Waters MD, Sandhu SS, Lewtons J, Claxton L, Nesnow S: *Short term Bioassays in the Analysis of complex Environmental mixtures III*. Newyork: Plenum Pub., 1983, p.393-405.
 18. Dawson DA Mc Cormick CA Bantle JA: Detection of teratogenic substances in acidic mine water samples using the frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus* (FETAX). *J Appl. Toxicol*, 1985, 5:234-244
 19. 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
 20. Greenhouse G: Effects of pollutants on embryos and larvae of frogs: A system for evaluating teratogenic effects of compounds in fresh water environments. In: *Proceedings of the Sixth Annual Conference of Environmental Toxicology*. Dayton: National Technical Information Service, 1975, p: 493-511
 21. Greenhouse G: Evaluation of the teratogenic effects of hydrazine, methylhydrazine and dimethyl hydrazine on embryos of *Xenopus laevis*. *Teratology*, 1976, 13: 167-178
 22. 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
 23. Hedrick L. Nishihara Tatsuro: Structure and Function of the extracellular Matrix of Anuran Eggs, *Journal of Electronmicroscopy Technik*, 1991, 17: 319-335
 24. Keller R, Early Embryonic Development of *Xenopus laevis*, Chapter 5, *Methods in Cell Biology*, Volume 36. *Xenopus laevis* practical uses in Cell and Molecular Biology, edited by Brian Kay, H. Benjamin Peng, Academic Press, 1991.
 25. Kao Ken, Danilchik Mike: Correlation of Body plan phenotypes in early Embryogenesis Chapter 14. *Methods in Cell Biology*, Volume 36. *Xenopus laevis* practical uses in Cell and Molecular Biology, edited by Brian Kay, H. Benjamin Peng, Academic Press, 1991.
 26. Kalankaya Dürdane, *Biyoloji Ders Notları*, Hacettepe Ün. 1986.
 27. Leroy P. Robertis E.M : Effects of Lithium chloride and Retinoic on the Expression of Genes from the *Xenopus laevis* Hox 2 complex, *Developmental Dynamics*, 1992, 194: 21-32.

- 28.Nieuwkoop P.D, Faber J: Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin) North- Holland Pub. Co., Amsterdam, 1975, p.1-248
- 29.ÖZGÜNEN T:Fertilite ve Embriyo Mühendisliği Uygulama Merkezi Tevsii Çalışması, Çukurova Ün. Arş. Fonu TF_ALT 93.1 sayılı protokol, 1993, Adana
- 30.Özgünen T. : Deney hayvanları ve Deneysel Cerrahi Yüksek Lisans Ders Notu , Adana, 1989.
- 31.Özgünen T, *Xenopus* Fizyolojisi, Ders Notu Adana, 1991.
- 32.Özgünen T.: *Xenopus laevis* Biyolojisi, Ders Notu, Adana 1994.
- 33.Özgünen T. *Xenopus laevis* deneysel embriyoloji, Ders notu, Adana, 1994.
- 34.Pamir Fikret, Klinik Toksikology, Ankara, 1969, p.1-22.
- 35.Rugh Roberts, The Frog, Fertilization of the Frog,Newyork, 1991,p:76.
- 36.Robert Tompkins and Dana Reinschmidt, Experimentally Induced Homozygosity in *Xenopus laevis*, Chapter 3 Methods in Cell Biology, Volume 36, *Xenopus laevis*: Practical Uses in Cell and Molecular Biology , edited by Brian Kay, H. Benjamin Peng, Academic Press, 1991 p:35.
- 37.Sadler TW Horton WE Warner CW :Whole Embryo Culture:A Screening Technique for Teratogens.Teratogenesis Carcinog Mutagen, 1982,2:243-253
- 38.Schuler R Hardin BD Niemeier R:Drosophila as a tool for the rapid assessment of chemicals for teratogenicity.Teratogenesis Carcinogen Mutagen,1982,2:293-301
- 39.Sabourin TD Faulk RT Goss LB: The Efficacy of three nonmammalian Test Systems in the Identification of Chemical Teratogens.J.Appl Toxicol,1985,5:227-233
- 40.Sizilaygi M. Anke M. Suri A, Balogh I, Reprus Mocsenyi:
Lithium Status and Animal Metabolism. Trace 89, Yüreğir T. Güneş, Donma Orkide, Kayrın Levent, Adana, 1991, 107-119.
- 41.Slack MV,Isaac HV, Darlington B.G: Inductive effects of fibroblast growth factor and Lithium ion *Xenopus* blastula ectoderm, Development, 1988, 103: 581-590.
- 42.Steven L, Klein and Sally A. Moody: Lithium changes the ectodermal fate of individual frog blastomeres because it causes ectopic neural plate formation, Development, 1989, 106: 595-610.
- 43.Waddington CH Perry MM:Teratogenic effects of trypan blue on amphibian embryos.J Embryol Exp Morph;1956,4:110-119.
- 44.Wu M., Gerhart J.: Raising *Xenopus* in the Laboratory,Chapter 1,Methods in Cell Biology, Volume 36.*Xenopus laevis*: Practical Uses in Cell and Molecular Biology , edited by Brian Kay, H. Benjamin Peng, Academic Press, 1991 p:3-18.
- 45.Weilong N, Smith D. I.,Varnold R.: Oogenesis and Oocyte Isolation,Chapter 4,Methods in Cell Biology, Volume 36, *Xenopus laevis*: Practical Uses in Cell and Molecular Biology , edited by Brian

Kay, H. Benjamin Peng, Academic Press, 1991 p:46.

46. Yamaguchi Y. Shinagawa A: Marked alteration at Midblastula Transition in the effect of Lithium on formation of the Larval body pattern of *X. laevis*, *Develop Growth Differ.* 1989, 31(6) : 531-541.



ÖZGEÇMİŞ

1965 yılında Adana'da doğdum. 1983 yılında Adana Anafartalar Lisesini birincilikle bitirdim. 1988 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. 1993 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Bölümünde Yüksek Lisansa başladım. Ayrıca Sağlık Bilimleri Enstitüsüne bağlı olarak Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım. İngilizce, Almanca ve çok az olmak üzere Fransızca ile Arapça biliyorum.

