

TC
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI TEKSTİL BOYAR MADDELERİNİN *Xenopus laevis* ÜZERİNDE
TOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

131192

AYŞE BİRHANLI

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA
Haziran 2003

131192
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOL. ANABİLİM DALI

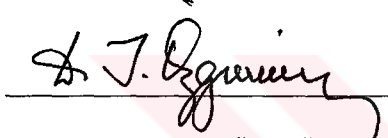
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma, Jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Dürdane KOLANKAYA

Başkan



Prof. Dr. Tuncay ÖZGÜNEN

Üye



Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA

Üye



Doç. Dr. Murat ÖZMEN

Üye




Yrd. Doç. Dr. Haluk TÜRKDEMİR

Üye

Onay

Yukarıdaki imzaların adı geçen Öğretim Üyelerine ait olduğunu onaylarım.

15.7.2002



(İmza)
Doç. Dr. Ali ŞAHİN
Enstitü Müdürü
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRLÜĞÜ

Tüm sevgimle kızıma, tüm özlemimle babama...



ÖZET

Doktora Tezi

BAZI TEKSTİL BOYAR MADDELERİNİN *Xenopus laevis* ÜZERİNDE TOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşe Birhanlı

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

111 + x sayfa

2003

Danışman: Doç Dr. Murat Özmen

Günümüzde su kaynaklarının çoğu çeşitli tipte endüstriyel atıklar tarafından kirletilmiş olup, tekstil boyar maddelerin atıkları son yıllarda Türkiye’ de ve Malatya’ da su kirliliğinin önemli kaynaklarından birini teşkil etmektedir. Buna bağlı olarak, ekosistem dengeleri tahrip olmakta ve bu tipte çevresel kirlilik problemlerine bağlı olarak, amfibi populasyonlarının tüm dünyada azaldığı rapor edilmektedir.

Bu çalışmada, çeşitli tipte tekstil boyar maddelerinin *Xenopus laevis* embriyoları üzerine etkileri statik yenilemeli test sisteminde teratojenite testi (FETAX) kullanılarak araştırıldı. Diğer taraftan ölüm oranı (LC50), ortalama etkili konsantrasyon (EC50) değerleri, yapısal bozukluk oranı, teratojenik index (TI) ve büyümeyi inhibe eden minimum konsantrasyon (MCIG) değerleri de çalışmada hesaplandı. Ayrıca, yedi günlük maruz kalma periyodu boyunca 46. evredeki iribaşlarda subakut toksik etkileri saptandı. Glutatyon S-transferaz (GST), karboksilesteraz (CaE) ve laktat dehidrogenaz (LHD) aktiviteleri 24 saat süre ile çeşitli dozlarda boyar madde etkisine maruz kalan iribaşlarda ölçüldü.

Araştırma sonuçları tekstil boyar maddelerinin *Xenopus* embriyoları ve iribaşları üzerine toksik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, test edilen bütün boyalar embriyo gelişimini baskılamıştır ve *Xenopus laevis* iribaşlarında çeşitli tiplerde yapısal bozukluklara neden olmuştur. Hem fitallosiyanin hem de azo boyalarının teratojenik aktivitesi belirlenmiştir. Buna göre, astrazon boyalarının test edilen bütün boyalar arasında en yüksek toksik etkiye sahip oldukları ve astrazon mavisinin ise en fazla toksik etkili boyar madde olduğu bulundu. Araştırmada, 24 saatlik maruz kalma sürecinde boyar maddelerin çeşitli enzim aktivitelerinde değişime yol açtığı saptandı. Ayrıca, *Xenopus* gelişimi periyoduna bağlı olarak, test edilen boyaların toksisitesinde de artış saptandı.

ANAHTAR KELİMELER : Tekstil boyası, *Xenopus laevis*, FETAX, malformasyon, teratojenite, toksisite

ABSTRACT

PhD. Thesis

THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SOME TEXTILE DYE STUFFS ON THE *Xenopus laevis*

Ayşe BİRHANLI

Inonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

111 + x pages

2003

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat ÖZMEN

Most of the water sources are now being contaminated by different types of industrial effluents. One of the most common water pollution problem in Turkey and especially in the region (Malatya) where this study has been carried, is from this type of discharge. This kind of pollution creates an imbalance in ecosystem and causes a substantial decrease in amphibian population world-wide.

The effect of various textile dye stuff on *Xenopus laevis* embriyos was examined through a 96 h static exposure using a teratogenic assay (FETAX) method. The influence of dye stuff was compiled in terms of mortality (LC50), effective concentration (EC50), deformity ratio, teratogenix index (TI) and minimum concentration to inhibit growth (MCIG). Also, the tadpoles at the 46 th developmental stage were exposed to the subacute toxic doses of these dye stuff for a seven-day period. In tadpoles exposed to textile dyes at different concentrations for 24 h glutathion S-transferase (GST), carboxylesterase (CaE) and lactate dehydrogenase (LDH) were determined.

Results show that, tested textile dyes stuff have toxic potential on *Xenopus* embriyos and tadpoles. Also, all tested dyes inhibited development of embriyos and caused to different types of deformity on tadpoles of *Xenopus laevis*. Teratogenic activity of both phthalocyanine and azo dyes were determined; astrazon dyes were found to be the most toxic dyes within all tested dye groups, astrazon blue being the most toxic in this group. The enzyme activities of 24 h exposed tadpoles were also determined to be caried with dye species applied. We also found that, toxicity of the dyes was increased due to developmental period of *Xenopus*.

KEYWORDS: Textile dye, *Xenopus laevis*, FETAX, malformation, teratogenesis, toxicity

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanmasında, hazırlanmasında, hem deneysel hem de teorik çalışmalarım sırasında değerli katkılarda bulunan, yardım, öneri ve desteğini esirgmeden beni yönlendiren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Murat ÖZMEN' e;

Çalışmalar için gerekli damızlıkları hediye ederek, Türkiye' deki ikinci *Xenopus* laboratuvarını kurmamızı sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Sayın Prof. Dr. Tuncay ÖZGÜNEN' e, Yrd. Doç. Dr. Seçil BİNOKAY' a, Arş. Grv. Ayper BOĞA' ya;

Çalışmalarımız için gerekli olan tekstil boyalarını sağlayan ve değerli fikirleriyle her zaman yardımını gördüğüm Sayın Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA' ya;

Deneysel çalışmalar boyunca fikir ve önerileriyle yardımcı olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Haluk TÜRKDEMİR' e;

Çalışmaların her aşamasında yardım eden ve her zaman destekleyen Arş. Grv. Abbas GÜNGÖRDÜ' ye;

Çalışmalarım boyunca bana destek olan Eğitim Fakültesi Araştırma Görevlilerinden Muhammet GAFFAROĞLU, F. Bilge EMRE, Elif APOHAN' a, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü Arş. Grv. Emre BİRHANLI' ya ve Yüksek Lisans Öğrencisi Handan AYDIN' a ;

Tüm hayatım boyunca yardımlarını ve desteklerini gördüğüm AİLEM' e, eşim Ogün ve kızım Gizem' e;

Ve desteklerini hissettiğim tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma;

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	ÖZET.....	i
	ABSTRACT.....	ii
	TEŞEKKÜR.....	iii
	İÇİNDEKİLER.....	iv
	ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
	TABLolar LİSTESİ.....	viii
	SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
1.	GİRİŞ.....	1
1.1.	Boyar Maddelerin Tanımı ve Sınıflandırılması.....	3
1.1.1.	Boyar Maddelerin Çözünürlüklerine Göre Sınıflandırılması.....	4
1.1.2.	Boyama Özelliklerine Göre Sınıflandırma.....	4
1.1.3.	Kimyasal Yapıya Göre Sınıflandırma.....	5
1.2.	Xenopus laevis Hakkında Genel Bilgi.....	8
1.2.1.	Bakım Yöntemleri ve Beslenme.....	10
1.2.2.	Xenopus' un Üremesi.....	12
1.2.2.a.	Doğada X. laevis' in Üremesi.....	12
1.2.2.b.	Laboratuvar Ortamında X. laevis' in Üremesi.....	13
1.2.3.	Xenopus laevis Embriyo ve Larvaların Gelişimi.....	14
1.2.4.	FETAX Testi.....	18
1.2.5.	Xenopus laevis' de Görülebilecek Enfeksiyon Tipleri.....	19
1.3.	Xenopus İribaşlarında Çalışılan Enzimler.....	19
1.3.1.	Glutasyon S-Transferaz.....	19
1.3.2.	Karboksil Esteraz.....	20
1.3.3.	Laktat Dehidrogenaz.....	21
2.	KAYNAK ÖZETLERİ.....	22
3.	MATERYAL VE METOD.....	29
3.1.	Çalışmalarda Kullanılan Deney Hayvanı.....	29
3.1.1.	Bakım ve Beslenme.....	29
3.1.2.	Deney Hayvanlarının İndüklenmesi.....	30
3.2.	Toksisite Testlerinin Uygulanması.....	31
3.2.1.	FETAX Testi.....	31
3.2.2.	Xenopus laevis İribaşlarında (46. evre) Yapılan Çalışma.....	32
3.2.3.	FETAX Testi Sonunda Hayatta Kalan İribaşların Baş-Kuyruk Uzunluk Ölçümü.....	33
3.3.	Çalışmalarda Kullanılan Tekstil Boya Maddeleri.....	33
3.4.	Çözelti pH' sının Saptanması.....	34
3.5.	Enzimatik Çalışmalar.....	35
3.5.1.	Enzim Aktivitelerinin Saptanması İle İlgili Çalışmalar.....	35
3.5.2.	Xenopus İribaşlarında Enzim Aktiviteleri.....	35
3.5.2.1.	Glutasyon S-transferaz Aktivitesi.....	36
3.5.2.2.	Karboksilesteraz Aktivitesi.....	36
3.5.2.3.	Laktat Dehidrogenaz Aktivitesi.....	37
3.5.2.4.	Total Protein Tayini.....	37
3.5.2.5.	Enzim Spesifik Aktivitesi.....	38
3.6.	İstatistiksel Analiz ve Hesaplamalar.....	38
4.	BULGULAR.....	40

4.1.	Astrazon Boyalarının Toksik Etkileri.....	40
4.1.1.	Astrazon Kırmızısı İle İlgili Embriyonal Toksikite Testleri.....	40
4.1.2.	Astrazon Kırmızısının 46. Evredeki İribaşlar Üzerine Toksik Etkileri.....	41
4.1.3.	Astrazon Mavisini İle İlgili Embriyonal Toksikite Testleri	42
4.1.4.	Astrazon Mavisinin 46. Evredeki İribaşlar Üzerine Etkileri.....	43
4.2.	Remazol Boyalarının Toksik Etkileri.....	45
4.2.1.	Remazol Kırmızısı ile İlgili Embriyonal Toksikite Testleri.....	45
4.2.2.	Remazol Kırmızısının 46. Evredeki İribaşlar Üzerine Etkileri.....	46
4.2.3.	Remazol Mavisini İle İlgili Embriyonal Toksikite Testleri.....	47
4.2.4.	Remazol Mavisinin 46. Evredeki İribaşlar Üzerine Etkileri.....	48
4.3.	Cibacron Boyalarının Toksik Etkileri.....	49
4.3.1.	Cibacron Kırmızısı İle İlgili Embriyonal Toksikite Testleri.....	49
4.3.2.	Cibacron Kırmızısının 46. Evredeki İribaşlar Üzerine Etkileri.....	50
4.3.3.	Cibacron Mavisini İle İlgili Embriyonal Toksikite Testleri.....	51
4.3.4.	Cibacron Mavisinin 46. Evredeki İribaşlar Üzerine Etkileri.....	52
4.4.	FETAX Testi Sonucu Hesaplanan LC50, EC50, Tİ ve MCİG Değerleri.....	53
4.5.	Tekstil Boyalarının 46. Evredeki İribaşlar İçin Hesaplanan Ortalama Öldürücü Konsantrasyon Değerleri	55
4.6.	Astrazon Boyalarının Malformasyon Oranlarına ve Malformasyon Tipleri Üzerine Etkileri (FETAX Testi).....	56
4.6.1.	Astrazon Kırmızısının Malformasyon Oranları ve Tiplerine Etkisi.....	56
4.6.2.	Astrazon Mavisinin Malformasyon Oranları ve Tiplerine Etkisi ...	57
4.7.	Remazol Boyalarının Malformasyon Oranları ve Malformasyon Tipleri Üzerine Etkileri (FETAX Testi).....	59
4.7.1.	Remazol Kırmızısının Malformasyon Oranları ve Tiplerine Etkisi.....	59
4.7.2.	Remazol Mavisinin Malformasyon Oranları ve Tiplerine Etkisi.....	60
4.8.	Cibacron Boyalarının Malformasyon Oranları ve Malformasyon Tipleri Üzerine Etkileri (FETAX Testi).....	61
4.8.1.	Cibacron Kırmızısının Malformasyon Oranları ve Tiplerine Etkisi.....	61
4.8.2.	Cibacron Mavisinin Malformasyon Oranları ve Tiplerine Etkisi....	63
4.9.	FETAX Testi Sonucunda Hayatta Kalan İribaşlar İçin Saptanan Baş-Kuyruk Uzunluk Değerleri.....	64
4.9.1.	Astrazon Boyaları.....	64
4.9.1.1.	Astrazon Kırmızısının İribaşların Baş-Kuyruk Uzunluk Değerlerine Etkisi.....	64
4.9.1.2.	Astrazon Mavisinin İribaşların Baş-Kuyruk Uzunluk Değerlerine Etkisi.....	65
4.9.2.	Remazol Boyaları.....	66
4.9.2.1.	Remazol Kırmızısının İribaşların Baş-Kuyruk Uzunluk Değerlerine Etkisi.....	66
4.9.2.2.	Remazol Mavisinin İribaşların Baş-Kuyruk Uzunluk Değerlerine Etkisi.....	67
4.9.3.	Cibacron Boyaları.....	68
4.9.3.1.	Cibacron Kırmızısının İribaşların Baş-Kuyruk Uzunluk	

	Değerlerine Etkisi.....	68
4.9.3.2.	Cibacron Mavisinin İribaşların Baş-Kuyruk Uzunluk Değerlerine Etkisi.....	69
4.10.	Kullanılan Tekstil Boyalarının Ortalama pH Değerleri.....	70
4.11.	Tekstil Boyar Maddelerine Maruz Kalan İribaşlarda Enzimatik Bulgular.....	72
4.11.1.	Astrazon Boyaları.....	72
4.11.1.1.	Astrazon Kırmızısı Uygulaması ile İlgili Enzimatik Bulgular.....	72
4.11.1.2.	Astrazon Mavisini Uygulaması ile İlgili Enzimatik Bulgular.....	75
4.11.2.	Remazol Boyaları.....	77
4.11.2.1.	Remazol Kırmızısı Uygulaması ile İlgili Enzimatik Bulgular.....	77
4.11.2.2.	Remazol Mavisini Uygulaması İle İlgili Enzimatik Bulgular.....	79
4.11.3.	Cibacron Boyaları.....	81
4.11.3.1.	Cibacron Kırmızısı Uygulaması İle İlgili Enzimatik Bulgular.....	81
4.11.3.2.	Cibacron Mavisini Uygulaması İle İlgili Enzimatik Bulgular.....	84
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	86
6.	KAYNAKLAR	95
7.	EKLER	104
EK 1.	Astrazon kırmızısına maruz kalan embriyolarda 96. saat sonunda gözlenen malformasyonlara bazı örnekler.....	104
EK 2.	Astrazon mavisine maruz kalan embriyolarda 96. saat sonunda gözlenen malformasyonlara bazı örnekler	105
EK 3.	Remazol kırmızısına maruz kalan embriyolarda 96. saat sonunda gözlenen malformasyonlara bazı örnekler	106
EK 4.	Remazol mavisine maruz kalan embriyolarda 96. saat sonunda gözlenen malformasyonlara bazı örnekler	107
EK 5.	Cibacron kırmızısına maruz kalan embriyolarda 96. saat sonunda gözlenen malformasyonlara bazı örnekler	108
EK 6.	Cibacron mavisine maruz kalan embriyolarda 96. saat sonunda gözlenen malformasyonlara bazı örnekler	109
EK 7.	FETAX çözeltisinde bırakılan kontrol grubu iribaşlara örnek..... ÖZGEÇMİŞ	110 111

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Reaktif azo boyalardan reaktif kırmızı 17' nin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 1.2.	Fitallosiyanin reaktif boyalardan reaktif mavi 7' nin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 1.3.	Azo grubu boyalardan asit mavi 92' nin kimyasal yapısı	7
Şekil 1.4.	Azo grubu boyalardan asit kırmızı 14' ün kimyasal yapısı	7
Şekil 1.5.	Azo grubu boyalardan bazik kırmızı 18' in kimyasal yapısı	7
Şekil 1.6.	Dişi ve erkek <i>Xenopus</i> fotoğrafları	9
Şekil 1.7.	<i>Xenopus</i> ' da zigot bölünmesinin elektron mikroskopik fotoğrafı	15
Şekil 1.8.	<i>Xenopus laevis</i> ' in bazı metamorfoz evreleri	17
Şekil 3.1.	BSA Standart Eğrisi.....	38
Şekil 4.1.	Astrazon kırmızısına maruz kalan iribaşlarda spesifik enzim aktiviteleri	74
Şekil 4.2.	Astrazon mavisine maruz kalan iribaşlarda spesifik enzim aktiviteleri	76
Şekil 4.3.	Remazol kırmızısına maruz kalan iribaşlarda spesifik enzim aktiviteleri	78
Şekil 4.4.	Remazol mavisine maruz kalan iribaşlarda spesifik enzim aktiviteleri.....	80
Şekil 4.5.	Cibacron kırmızısına maruz kalan iribaşlarda spesifik enzim aktiviteleri.....	83
Şekil 4.6.	Cibacron mavisine maruz kalan iribaşlarda spesifik enzim aktiviteleri	85

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1.	Toksisite testlerinde kullanılan boyalar ve özellikleri.....	34
Tablo 4.1.	Çeşitli dozlardaki astrazon kırmızısına maruz kalan <i>Xenopus</i> embriyolarında saptanan ölüm oranları.....	41
Tablo 4.2.	Yedi gün süre ile astrazon kırmızısı etkisine maruz bırakılan 46. evredeki iribaşlarda gözlenen ölüm oranları.....	42
Tablo 4.3.	Çeşitli dozlardaki astrazon mavisine maruz kalan <i>Xenopus</i> embriyolarında 96 saatlik test sonunda saptanan ölüm oranları.....	43
Tablo 4.4.	Yedi gün süre ile astrazon mavisi etkisine maruz bırakılan 46. evredeki iribaşlarda gözlenen ölüm oranları.....	44
Tablo 4.5.	Çeşitli dozlardaki remazol kırmızısına maruz kalan <i>Xenopus</i> embriyolarında saptanan ölüm oranları.....	45
Tablo 4.6.	Yedi gün süre ile remazol kırmızısı etkisine maruz bırakılan 46. evredeki iribaşlarda gözlenen ölüm oranları.....	47
Tablo 4.7.	Çeşitli dozlardaki remazol mavisine maruz kalan <i>Xenopus</i> embriyolarında saptanan ölüm oranları.....	48
Tablo 4.8.	Yedi gün süre ile remazol mavisi etkisine maruz bırakılan 46. evredeki iribaşlarda gözlenen ölüm oranları	49
Tablo 4.9.	Çeşitli dozlardaki cibacron kırmızısına maruz kalan <i>Xenopus</i> embriyolarında saptanan ölüm oranları.....	50
Tablo 4.10.	Yedi gün süre ile cibacron kırmızısının etkisine maruz bırakılan 46. evredeki iribaşlarda gözlenen ölüm oranları.....	51
Tablo 4.11.	Çeşitli dozlardaki cibacron mavisine maruz kalan <i>Xenopus</i> embriyolarında saptanan ölüm oranları.....	52
Tablo 4.12.	Yedi gün süre ile cibacron mavisinin etkisine maruz bırakılan 46. evredeki iribaşlarda gözlenen ölüm oranları.....	53
Tablo 4.13.	FETAX testi sonucunda boyar maddelere maruz bırakılan ve hayatta kalan iribaşlar için hesaplanan LC50, EC50, Tİ ve MCİG değerleri.....	54
Tablo 4.14.	Tekstil boyalarının <i>Xenopus laevis</i> iribaşlarında LC50 değişimleri.....	55
Tablo 4.15.	Astrazon kırmızı boyasının FETAX testi sonucunda malformasyon oranlarına ve malformasyon tiplerinin dağılımı üzerine etkisi.....	57
Tablo 4.16.	Astrazon mavi boyasının FETAX testi sonucunda malformasyon oranlarına ve malformasyon tiplerinin üzerine etkisi.....	58
Tablo 4.17.	Remazol kırmızı boyasının FETAX testi sonucunda Malformasyon oranlarına ve malformasyon tiplerinin dağılımı üzerine etkisi.....	59
Tablo 4.18.	Remazol mavi boyasının FETAX testi sonucunda malformasyon oranlarına ve malformasyon tiplerinin dağılımı üzerinde etkisi.....	61
Tablo 4.19.	Cibacron kırmızı boyasının FETAX testi sonucunda Malformasyon oranlarına ve malformasyon tiplerinin dağılımı üzerine etkisi.....	62

Tablo 4.20.	Cibacron mavi boyasının FETAX testi sonucunda malformasyon oranlarına ve malformasyon tiplerinin dağılımı üzerine etkisi.....	63
Tablo 4.21.	Astrazon kırmızı uygulaması sonucunda hayatta kalan FETAX test grubu iribaşların baş-kuyruk uzunluk değerleri.....	65
Tablo 4.22.	Astrazon mavi uygulaması sonucunda hayatta kalan FETAX test grubu iribaşların baş-kuyruk uzunluk değerleri.....	66
Tablo 4.23.	Remazol kırmızısı uygulaması sonucunda hayatta kalan FETAX test grubu iribaşların baş-kuyruk uzunluk değerleri.....	67
Tablo 4.24.	Remazol mavi uygulaması sonucunda hayatta kalan FETAX test grubu iribaşların baş-kuyruk uzunluk değerleri.....	68
Tablo 4.25.	Cibacron kırmızı uygulaması sonucunda hayatta kalan FETAX test grubu iribaşların baş-kuyruk uzunluk değerleri.....	69
Tablo 4.26.	Cibacron mavi uygulaması sonucunda hayatta kalan FETAX test grubu iribaşların baş-kuyruk uzunluk değerleri.....	70
Tablo 4.27.	Araştırmada test edilen üç farklı gruptaki altı boyar madde için saptanan ortalama pH değerleri	71
Tablo 4.28.	Astrazon kırmızısı uygulamasına bağlı olarak iribaşlarda saptanan spesifik enzim aktiviteleri.....	73
Tablo 4.29.	Astrazon mavisi etkisine maruz kalan iribaşlarda spesifik enzim aktiviteleri.....	75
Tablo 4.30.	Remazol kırmızısı uygulamasına bağlı olarak iribaşlarda saptanan spesifik enzim aktiviteleri.....	77
Tablo 4.31.	Remazol mavisi etkisine maruz kalan iribaşlarda spesifik enzim aktiviteleri.....	79
Tablo 4.32.	Cibacron kırmızısına maruz kalan iribaşlarda spesifik enzim aktiviteleri.....	81
Tablo 4.33.	Cibacron mavisi etkisine maruz kalan iribaşlarda spesifik enzim aktiviteleri.....	84

SİMGELER VE KISALTMALAR

FETAX	Frog Embryos Teratogenesis Assay : <i>Xenopus</i> (Kurbağa Embriyosu Teratojenite Deneyi : <i>Xenopus</i>)
hCG	İnsan Koriyonik Gonadotropin Hormon
I.U	International Units
LC50	Organizmaların %50' sinin ölümüne neden olan madde konsantrasyonu
EC50	Test edilen organizmaların %50' sinde malformasyona neden olan madde konsantrasyonu
MCİG	Büyümeyi inhibe eden minimum konsantrasyon
Tİ	Teratojenite İndeksi
GST	Glutasyon S-Transferaz
LDH	Laktat dehidrogenaz
CaE	Karboksil esteraz
p-NPA	Paranitrofenilasetat
GSH	Redükte glutasyon
CDNB	1-kloro, 2,4 dinitrobenzen
DTT	Dithiothreitol
DTNB	5,5' – dithiobis (2-nitrobenzoik asit)
BSA	Bovine Serum Albumin (Sığır Serum Albumini)
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FSH	Folikül uyarıcı hormon
MSH	Melanin uyarıcı hormon
LH	Luteinize hormon
ASTM	Amerikan Standartları Enstitüsü
EPA	Amerikan Çevre Koruma Kurumu
ETAD	Boyar Madde Üretim Endüstrisi Ekoloji ve Toksikoloji Birliği
SEM	Ortalama standart hata
SD	Standart sapma
ppm	miligram/litre
ANOVA	Varyans analizi
OD	Optik densite
$\mu\text{mol}/\mu\text{g t.p./ml}$	Mikromol/mikrogram total protein/mililitre

1. GİRİŞ

Ülkemiz hızla sanayileşmekte ve tekstil sanayiinde de dev adımlar atmaktadır. Fakat bu sanayileşmenin artması ile çevre kirliliği sorunları büyük önem kazanmaktadır. Çevre kirliliği, ekosistemdeki herhangi bir çevre kaynağının canlılar tarafından kullanımları ve doğal değişimleri sonucu sistemin hem canlı hem de cansız varlıkların, dolayısıyla sistemin toplam değerlerinin düşmesi olarak tanımlanmaktadır. Çevresel kirliliğe neden olan kaynakların başında, atık sularını doğrudan sulara ve toprağa veren endüstriyel üretim yapan fabrikalar, evsel atıklar, tarımsal amaçla kullanılan pestisitler gelmektedir. Bu atıklar yalnızca canlı organizmaları etkilemekle kalmaz, aynı zamanda cansız çevre üzerinde de olumsuz etki gösterir. Cansız çevrede oluşacak her türlü olumsuz değişiklik ise ekosistemin bütününe etkiler. Endüstrileşmenin bir sonucu olarak yoğun şekilde çeşitli ağır metaller ve zehirli bileşikler içeren tekstil boyar maddeleri su ve topraklarda yaşayan organizmaların dolayısıyla ekosistemin olumsuz yönde etkilenmesine yol açabilir.

Toksisite, organizmalarda zararlı bir etki meydana getiren maddenin etkisi olarak tanımlanır ve çeşitli kimyasal maddelere bağlı olarak ortaya çıkar. Biyolojik sistemler tarafından üretilen doğal toksikantlar olduğu gibi, doğal olmayan kimyasal kökenli toksikantlarda olabilir. Günümüzde kullanılan maddelerin çoğunluğu ksenobiyotik olarak adlandırılan ve sentetik olan kimyasal maddelerdir. Bu kimyasal maddelerde ekolojik dengeyi bozmaktadır [1].

Su kirleticisi ana kaynaklarından birisi de boyar maddelerin çok fazla miktarda kullanıldığı endüstrilerdir. Boyalı atık sular içerdiği renk ve toksik maddelerden dolayı su kaynaklarını kirliletmektedir [2]. Renk atık sularında tanımlanmış ilk kirleticilerdir [3]. Bu tip atık suların sucul ortama verilmesi güneş ışığının suyun alt kısımlarına geçmesini engellemekte, fotosentez aktivitesi ve çözülmüş oksijen konsantrasyonunu azaltmaktadır [4,5]. Bu nedenle, boyalı atık sular toksik etki göstermelerinden dolayı sucul canlıların ve toprak ekosisteminin tahribatına neden olmaktadır [6].

Endüstriyel atıkların renk, yüksek konsantrasyonda organik ve inorganik bileşikler, yüksek pH ve ağır metaller dahil olmak üzere birçok toksik madde ve kirleticisi unsur içerdikleri bilinmektedir [3,7]. Tekstil boyalarının özellikle ayrışmaya dayanıklı olarak tasarlanan sentetik kökenli ve kompleks aromatik moleküllerden oluştuğu bildirilmektedir [8,9]. Tekstil endüstrisi atık suları kompleks bir karışım içermekte ve bu kompleks yapıdaki boya ve boya ürünlerinde çeşitli kimyasal

özelliklerde organik bileşikler ve ağır metaller gibi inorganik bileşikler bulunmaktadır [10].

Tekstil sanayi üretim işlemlerine göre farklılık içeren yün, pamuk ve sentetik elyaf vb. üretim süreçlerinde tekstil atık sularında boyalar, deterjanlar, yağlar, parlaticılar, renklendiriciler, lateks ürünleri, sürünücü boyalar vs. içeren bu boyaların kullanımı ile kirliliği su bileşimleri elde edilmiştir [11,12]. Bu atık suların çevreye salınmasıyla estetik, çevresel ve sağlık problemlerine maruz kalınabilmektedir [13,14]. Yapılan bir çalışmada endüstriyel atıkların bitkiler ve hayvanlar üzerinde genetik hasarlara yol açtığı belirtilmektedir [15]. Endüstriyel kaynaklı tekstil atık suları doğrudan veya yeterli arıtım yapılmadan yüzey sularına karışarak sucul hayatın kalitesini ve çeşitliliğini olumsuz yönde etkileyebilir. Bu sebepten dolayı sucul ekosistemler için tehlikeli olabilecek tekstil atık suları direkt olarak alıcı ortamlara verilmemelidir.

Bir ekosistem ya da bir organizma üzerinde olumsuz etkilerin saptanabilmesi için, toksik maddelerin ilk olarak laboratuvar koşullarında çeşitli türden organizmalar için olası risk analizlerinin yapılması gerekmektedir. Bu organizmanın seçiminde toksik ajanın verildiği alıcı ortamda etkilenebilecek organizmaların seçilmesi ile kirlenici maddenin ekosistem üzerindeki olası etkilerinin saptanması mümkün olacaktır [16,17].

Çalışmamızda sucul ortamda madde etkisine maruz kalan organizmalara bir örnek olarak amfibiler kullanılmıştır. Amfibiler sucul ekosistemlerde çevresel kirlenicilere maruz kalan ve yüksek risk grubu içerisinde bulunan omurgalı hayvanların en başta gelenlerindedir [18]. Amfibi iribaşlarının, ergin bireylere göre toksik maddelere daha fazla duyarlı oldukları bilinmektedir. Buna bağlı olarak tüm dünyada son yıllarda amfibi populasyonlarında önemli düzeyde azalma olduğu rapor edilmektedir [19]. Ayrıca bir araştırmada iribaşların gelişim evresine bağlı olarak, ileri gelişim evrelerinde tekstil boyar maddelerine karşı duyarlılıkların daha fazla arttığı rapor edilmektedir [20]. Bununla birlikte bu duyarlılığın türe bağlı olarak değişebileceği çeşitli araştırmalar ile rapor edilmiş olup, *Xenopus* embriyolarının çoğunlukla ksenobiotiklere duyarlılığının daha yüksek olduğu bildirilmiştir [18]. Sahip oldukları bazı özelliklerden dolayı amfibilerin toksik maddelere maruz kalma riskleri oldukça yüksektir. Hem sucul hem de karasal hayat safhalarından dolayı her iki ortamda da toksik maddelere maruz kalabilirler. Birçok amfibi türünde yumurta ve larva gelişimi suda tamamlandığından, bu sularda birikmiş olan çeşitli kirlenicilerin yumurta gelişimi ile larvaların metamorfoz ve büyümeleri üzerinde yaptıkları etkiler türün neslinin

devamı için son derece önemlidir. Ayrıca amfibilerin yumurta, solungaç ve derileri yarı geçirgen özellikte olduğundan kirleticilerin alınma olasılığı daha yüksektir [21].

Bu araştırmada, tekstil sanayiinde yaygın olarak kullanılan iki farklı kimyasal gruba ait boyar maddelerden altı farklı tekstil boyasının toksik etkilerinin araştırılması ve olası risk değerlendirmesinin yapılması amaçlanmıştır. Buna bağlı olarak, astrazon, remazol ve cibacron boyalarından kırmızı ve mavi renk pigmentleri içeren ikişer boyar madde seçilmiştir. Boyar maddelerin olası toksik etkilerinin saptanması amacıyla, *Xenopus laevis* embriyoları ve iribaşları test materyali olarak kullanılmıştır. Sucul ekosistemlerde canlılar üzerinde oluşabilecek toksik etkilerinin saptanmasında standart yöntemlere göre, *Xenopus* ile yapılan testlerin kabul görmesi nedeniyle, bu tür tercih edilmiştir [22,23]. Boyar maddeler, hem *Xenopus* embriyolarının gelişimi sırasında ortaya çıkabilecek teratojenik etkinin belirlenmesinde, hem de embriyo gelişiminin farklı evrelerinde boya etkisine bağlı ortalama öldürücü konsantrasyon düzeyinin belirlenmesi amacıyla test edilmiştir. Test edilen boyar maddelerin sucul organizmalar için ayrıntılı risk analizleri, literatür bilgilerine göre ilk kez bu çalışmayla *Xenopus* üzerinde ortaya konulmaya çalışılmıştır.

1.1. Boyar Maddelerin Tanımı ve Sınıflandırılması

Sentetik boya maddeleri (anilin, bazik boyalar) William Henry Perkin tarafından 1856 da keşfedilmiştir [9]. Boyar Madde Üretim Endüstrisi Ekoloji ve Toksikoloji Birliği (ETAD), boyaları yoğun bir şekilde renkli ve ışığı seçici absorbe ederek bir substrata renk veren floresan organik maddeler olarak tanımlamaktadır [24]. Boyalar dokuma, deri, plastikler, mürekkep, vernikler ve bazı gıda maddelerinin renklendirmesinde kullanılır. Birçok endüstride kullanılan sentetik boyaların dünyada yıllık toplam üretiminin 8×10^5 ton olduğu rapor edilmiştir [25]. Günümüzde ticari olarak satılan 3000' den fazla boyar madde vardır ve bunlardan yarısından fazlası azo bileşikleridir [26]. Azo bağı (-N=N-) içeren boyalar azo boyalar olarak adlandırılırlar [27]. Azo boyalar tekstil boyar maddelerin %60-70' ini oluşturur [28].

Boyar maddeler birkaç şekilde sınıflandırılabilir. Sınıflandırmada çözünürlük, kimyasal yapı, boyama özellikleri, kullanım yerleri gibi çeşitli karakteristikler göz önüne alınabilir [29].

1.1.1. Boyar Maddelerin Çözünürlüklerine Göre Sınıflandırılması

1-Suda Çözünen Boyar Maddeler

Boyar madde molekülü en az bir tane tuz oluşturabilen grup taşır. Boyar maddenin sentezi sırasında kullanılan başlangıç maddeleri suda çözücü grup içermiyorsa, bu grubu boyar madde molekülüne sonradan eklemek suretiyle de çözünürlük sağlanabilir. Suda çözünebilen boyar maddeler tuz teşkil edebilen grubun karakterine göre üçe ayrılır.

- a) Anyonik suda çözünen boyar maddeler
- b) Katyonik suda çözünen boyar maddeler
- c) Zwitter iyon karakterli boyar maddeler

2-Suda Çözünmeyen Boyar Maddeler

Tekstilde ve diğer alanlarda kullanılan ve suda çözünmeyen boyar maddeleri çeşitli gruplara ayırmak mümkündür.

- a) Substratta çözünen boyar maddeler
- b) Organik çözücülerde çözünen boyar maddeler
- c) Geçici çözünürlüğü olan boyar maddeler
- d) Polikondensasyon boyar maddeleri
- e) Elyaf içinde oluşturulan boyar maddeler
- f) Pigmentler

1.1.2. Boyama Özelliklerine Göre Sınıflandırma

Genellikle boya uygulayıcıları, boyar maddenin kimyasal yapısı ile ilgilenmek yerine, onun hangi yöntemle elyafı boyayabildiğine bakarlar. Bu nedenle bu yöntemlere göre boyar maddeler aşağıdaki şekilde sınıflandırılmaktadır.

1. Bazik (katyonik) boyar maddeler
2. Asidik boyar maddeler
3. Direkt boyar maddeler (Substantif)
4. Mordan boyar maddeler
5. Reaktif boyar maddeler
6. İnkişaf boyar maddeleri
7. Metal-kompleks boyar maddeler
8. Dispersiyon boyar maddeleri

9. Pigment boyar maddeleri

1.1.3. Kimyasal Yapıya Göre Sınıflandırma

Boyar maddeleri yapısal olarak sınıflandırırken, molekülün temel yapısı esas alınabildiği gibi, molekülün kromojen ve renk verici özellikteki kısmı da esas olarak kabul edilebilir. En önemli organik boyalar ve pigmentler azo (-N=N-), karbonil (C=O), fitallosiyanin, aril karbonyum iyonu, sülfür, polimetin ve nitro kimyasallarıdır. Boyar madde içerisindeki en önemli renklendiriciler azo, karbonil, metin (-CH=) ve nitro (NO₂) gruplarıdır [9]. Şekil 1.1-5 bazı boyar maddelerin kimyasal yapı özelliklerini göstermektedir.

Ticari organik renklendiriciler içerisindeki en önemli kimyasal sınıf azo boyalarıdır. Azo grupları 2 aromatik halkayı sistemde birbirine bağlamaktadır. Ticari öneme sahip olan azo boyalarının çoğu tek bir azo grubu içerirler ve monoazo boyalar olarak adlandırılırlar. Azo boyalar yüksek boyama kapasitesine sahip oldukları için ticari olarak yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. Karbonil ve fitallosiyanin gibi boyalarla karşılaştırıldıklarında solgunluğa karşı daha dayanıklıdırlar [9].

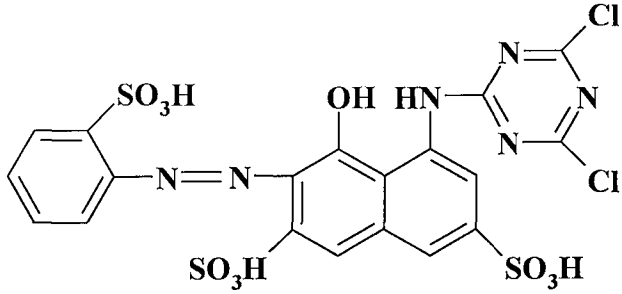
Birçok boyalara uygulamayı güçlendirmek amacıyla metal iyonları bağlanmaktadır. Metal grubu içeren bu boyalar metal kompleks azo boyası ya da mordan boyalar olarak bilinmektedir. 2 çeşit metal kompleks azo boyası bulunmaktadır. Bunlar azo grupları ile ya merkezden ya da uç kısımdan bağlanırlar. Bakır II, kobalt III, krom III metal kompleks azo boyalarının yapımında kullanılır. Bakır kompleksli azo boyaları sıklıkla hem reaktif hem de direkt boyalarda kullanılmaktadır [9].

Fitallosiyanin boyalar 20. yy' da geliştirilmiş olan en önemli renklendirici sistemlerdir. İlk kez 1928' de İskoçya' da bir boya şirketi tarafından üretilmiştir. Bunlar metal içermeyenler ve bir metal grubu bağlı olanlar olmak üzere 2'ye ayrılabilir. Metal grubu olarak merkezinde metal iyonu (çoğunlukla bakır iyonu) bulunmaktadır.

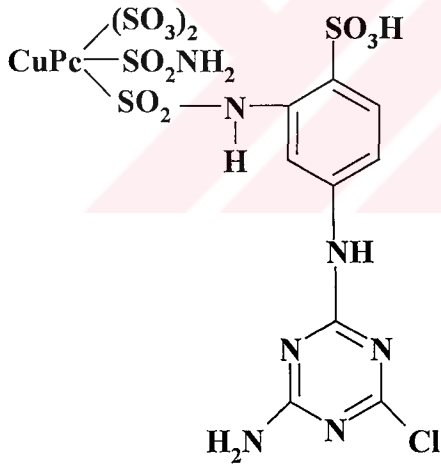
Reaktif boyalar, boya molekülünün bir C atomu ile polimerdeki bir hidroksiamino ya da tiol grubunun bir oksijen, nitrojen ya da sülfür atomu arasında kovalent bağla oluşturulur. Bu boyanın dirençliliğini arttırıcı bir işlemdir. Tüm boya çeşitleri (azo ve fitallosiyanin) reaktif özellik taşıyabilirler [9].

Reaktif boyalar, reaktif bir grubu taşıyan ve selüloz dokular ile reaksiyon veren boya maddeleridir. Bu boyalar taşıdıkları reaktif gruplarına göre sınıflandırılırlar.

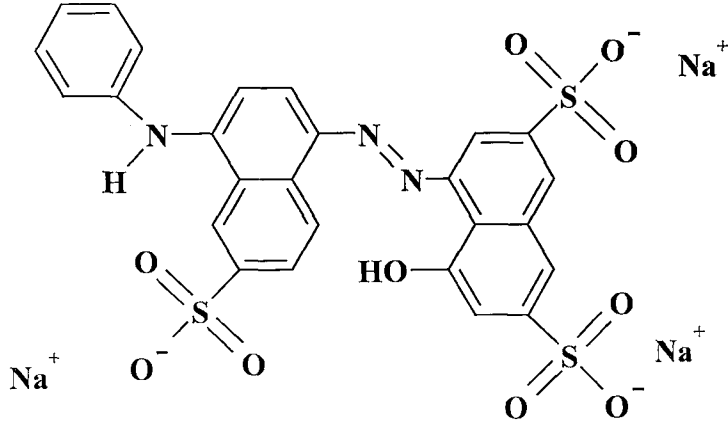
Reaktif boyaları siyanürük klorid türevleri boyanın Cl^2 atomunun reaktivitesini sağlar. Çünkü siyanürük klorid triazin halkasına sahip, oldukça reaktif bir bileşiktir [30].



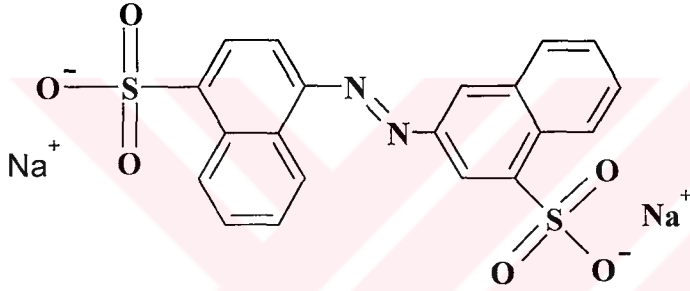
Şekil 1.1. Reaktif azo boyalardan reaktif kırmızı 17' nin kimyasal yapısı



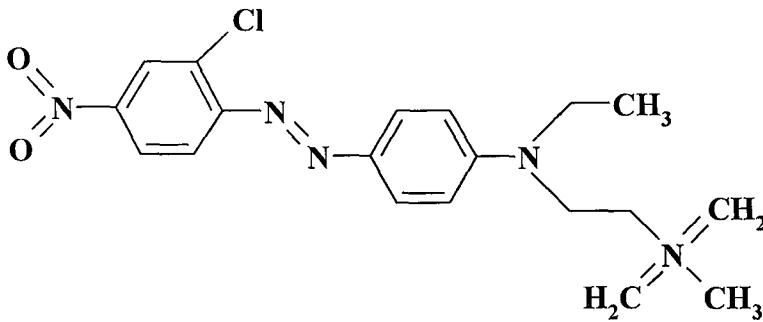
Şekil 1.2. Fitallosiyanın reaktif boyalardan reaktif mavi 7' nin kimyasal yapısı



Şekil 1.3. Azo grubu boyalardan asit mavi 92' nin kimyasal yapısı



Şekil 1.4. Azo grubu boyalardan asit kırmızı 14' ün kimyasal yapısı



Şekil 1.5. Azo grubu boyalardan bazik kırmızı 18' in kimyasal yapısı

1.2. *Xenopus laevis* Hakkında Genel Bilgi

Xenopus laevis, biyolojisi iyi bilinen ve dünyanın her yerinde laboratuvar koşullarına iyi adapte edilmiş olan bir amfibi türüdür. Genellikle embriyoları ve iribaşları ölüm oranı, teratojenite ve gelişim inhibisyonu ile ilgili toksikolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir test organizmasıdır [31].

Afrika su kurbağası (ya da Afrika tırnaklı kurbağası) olarak bilinen *Xenopus* ilk kez 1803 yılında Daudin tarafından keşfedilmiştir. Keşfinden bugüne kadar çeşitli adlar verilmiştir. Daudin derisinin yumuşak olması ve kara kurbağasına benzemesinden dolayı bu hayvana latince *Bufo laevis* adını takmıştır. *Xenopus* anatomisinde daha sonra yapılan araştırmalar, Pipidae ailesine mensup olduğunu göstermiştir. Sonuçta *Xenopus*' a genellikle Güney Afrika pençeli kara kurbağası adı verilirse de bunun kara veya su kurbağası olup olmadığı halen tartışmalıdır. Deri yapısından dolayı su kurbağasına, çiftleşme özelliğinden dolayı da kara kurbağasına benzetilmektedir [32].

Bu hayvana garip ayak anlamına gelen *Xenopus* adı ilk kez Wagler (1827) tarafından verilmiş, yaygın bir şekilde kullanımı ise bu hayvanı ilk kez doğal ortamında inceleyen Leslie (1890) tarafından yapılmıştır. *Xenopus*' da yumurta dökme ve iribaş oluşumu ilk kez Beddard (1894) tarafından gözlenmiştir [33].

Gerek ergin gerek larva *Xenopus* anatomisine ait ilk ayrıntılı inceleme Dreyer tarafından 1913 yılında yapılmıştır. Araştırmacı, *Xenopus*' un bazı özelliklerinin primitif olduğunu, bazı özelliklerinin ise bu hayvanın Anuralar yerine Urodellerle akraba olduğunu gösterdiğini bildirmiştir. Ancak 1931 yılında Noble, *Xenopus*' da Pipidae'nin birçok özelliğini ortaya çıkarmıştır (Şekil 1.6) [34].

Xenopus, diğer kurbağa türleri ile karşılaştırıldığında dorsaventral yassı olup, gövdesi başına göre çok geniştir. Arka bacaklar çok uzun olup, parmak aralarında zar bulunmaktadır. Daha kısa olan ön ayaklarda lateral bir açılım göstermektedir. Bu yassı biçim ve görünüm hayvanı suda yüzmeye uygun hale getirir. Bu özellik tamamen suda yaşayan *Xenopus* için avantajlı bir durumdur. Hayvanın derisi yumuşak ve sümüksü olup, küflü bir kokuya sahipse de, başka canlılar için toksik etki göstermez. *Xenopus*' un kafası gövdesi gibi yassı olup, gözler karada yaşayan diğer kurbağalara oranla daha küçük ve daha az belirgindir. Erkek ve dişilerin renkleri birbirine benzemekle beraber; dişi erkekten büyüktür ve kloakında papillalar bulunur [33].



Şekil 1.6. Dişi ve erkek *Xenopus* fotoğrafları (a: Dişi, b: Erkek).

Sırt yeşilimsi gri olup, hayvanın koyu ve açık renk zemine konması halinde; bu renk daha koyu veya daha açık bir hale gelebilir. Bu yüzden farklı *Xenopus* türlerinin rengini tanımlamada zorluklarla karşılaşmaktadır. Bu olay hipofiz bezinden salgılanan melanin uyarıcı hormonun (MSH) etkisine bağlanmaktadır [35,36].

Xenopus' da görülen diğer bir özellik, akciğerlerinin vücut büyüklüğüne oranının diğer amfibilerdeki orandan çok daha büyük olmasıdır. Akciğerler çok erken evrede, larva yumurtadan çıkar çıkmaz gelişmeye başlamaktadır. Bu durum larvanın dalacağı su derinliğinin düzenlenmesinde yardımcı olur. *Xenopus* hem larva hem de ergin dönemde solunum için diğer amfibilere oranla akciğerlere çok daha fazla bağımlılık gösterir. Bu da, deri ve solungaçların akciğerlere göre çok etkili solunum organı olmadıkları fikrini vermektedir [36].

Xenopus zamanının büyük bir çoğunluğunu suya gömülü halde geçirir. En büyük hareketliliği yemlerini yakalamada gösterirler ve bunu hızlı bir şekilde yaparlar. Kısa ve ince ön ayaklar hareket veya vücudun desteklenmesi için fazla kullanılmamakta, bunun yerine beslenme esnasında gıdanın ağıza götürülebilmesi için gereken hızlı çapraz hareketleri gerçekleştirmektedir [36].

Xenopus' da karada yaşayan formlarda olduğu gibi dıştan görünür bir kulak zarı yoktur. Kulak zarı hava yolu ile gelen ince sesleri almak için özgülleşmiş bir organ

olması ve yaşamını tümüyle suda geçiren omurgalılarda bulunmaması nedeniyle primitif bir karakteristik olarak kabul edilmektedir. Su içerisindeki hareketliliği lateral çizgi organları tarafından algılanmakta olup, bu organ diğer Anuralardan (kuyruksuz kurbağa) farklı olarak *Xenopus*' da başkalaşım esnasında kaybolmamakta ve erişkin yaşam boyunca da kalmaktadır. Lateral çizgi organları, dışarıdan gözle görülebilen ve hem dorsal hem de ventral komponentleri bulunan gelişmiş bir sistemdir [36].

Xenopus laevis' in sistematığı şöyledir ;

Alem	: Animalia
Şube	: Chordata
Altşube	: Vertebrata
Üst sınıf	: Tetrapoda
Sınıf	: Amphibia
Takım	: Anura
Aile	: Pipidae
Altaile	: Xenopodinae
Cins	: <i>Xenopus</i>
Tür	: <i>Xenopus laevis</i>

1.2.1. Bakım Yöntemleri ve Beslenme

Xenopus laevis laboratuvar ortamına iyi adapte edilmiş bir türdür. Tüm dünyada çeşitli laboratuvar çalışmaları için yaygın olarak tercih edilen bir omurgalıdır [37]. Amfibi embriyolarının erken evrelerinde bol miktarda yolk bulunmakta olup, bu yolk gelişmenin önemli bir dönemi boyunca hayvana gerekli tüm besinleri içerir. Anura larvaları yumurtadan çıktıktan sonra embriyonik barsak ile kalça ektodermi arasında yer alan bu yolku kullanarak günlerce hayatta kalırlar. Gelişmenin erken evrelerinde hayvanların yaşamasını belirleyen en önemli etmen sıcaklık, ikincisi ise kültür ortamıdır. Bunları beslenme, yaşanılan mekan, oksijen ve ışık faktörleri izler [38].

Çeşitli türlerin sıcaklık sınırları bazı formlarda daha yüksek, bazılarında ise düşüktür. Tüm amfibi larvaları için optimum sınır 12-25 °C'dir. Laboratuvarların büyük çoğunluğunda oda sıcaklığı 23-25 °C de tutulmakta olup bu sıcaklık anurular için uygundur [33]. Laboratuvar ortamında *Xenopus* için ideal su sıcaklığı 20-23 °C arasında olmalıdır. Daha yüksek sıcaklıklar bireylerin beslenmesini azaltıcı bir etmen olarak rol oynayabilir. Ayrıca su sıcaklığının idealden sapması metabolizmanın bozulmasına ve

immün sistemin baskılanmasına neden olabilir. Bu nedenle hem laboratuvar ortam sıcaklığının, hem de su sıcaklığının mümkün olduğunca değişmez tutulması ve ± 1 °C sıcaklık değişimlerini aşmaması önemlidir [37].

Bütün amfibiler yumurtalarını suya bırakırlar. Bunların içinde yaşadığı havuz suları çiftleşmeleri için ideal ortam oluşturur. Ancak bu havuz suyunu temin etmek zor olduğundan, bazı kimyasal karışımlar üretilmiştir. Genel olarak gözlenen bulgulardan bir tanesi hafifçe hipotonik ortamların tercih edilmekte olduğu ve hatta gelişmenin saf su içinde dahi belli bir limite kadar devam edebildiğidir. Büyük kentlerde kullanılan musluk suları çoğunlukla 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 kullanılabilir [39]. Akvaryumdaki embriyoların normal gelişimi için yüksek düzeyde Ca gereksinimi vardır. Kalsiyum iyonları larvanın solungaç ve derisinden alınır. Buna bağlı olarak, larvanın normal gelişimi için iyi beslenme ve yeteri derecede sert bir su ortamı gerekir [37].

Anuralarda 25. evreye kadar beslenme gereksinimi yoktur. Anura larvalarının en uygun besini hafifçe kaynatılmış ıspanak ve maruldur [40-42]. 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]. *Xenopus* larvaları için pişirilmiş, kurutulmuş ve ince toz haline getirilmiş sığır ciğeri, yeşillik ve algere sağlanacak en mükemmel takviyedir. Kullanılan diğer besinler arasında toz haline getirilmiş yumurta sarısı, kurutulup toz haline getirilmiş tam unla karıştırılmış bacto-beef ekstresi, kıyılmış çiğ karaciğer, algler ve protozoanlar vardır. Marulla beslenen larvaların ıspanakla beslenenlere oranla gelişmesinin biraz yavaş olduğu gözlenmiştir [32].

Başkalaşımın son evrelerinde iribaşlar tembelleşirler ve az beslenerek kabın dibinde kalırlar. Boğulmalarını önlemek için iribaşları sığ su tabakası bulunan kaplara aktarmak gerekir. Metamorfoz sonrası sindirim kanalı önemli bir değişikliğe uğradığından, gereksinim duydukları gıdaların türünde tüm amfibilerde bir değişim gösterir. Burada gıdanın sadece miktarı değil, çeşitliliği artar ve vitamin verilmesi zorunlu hale gelir. Bira mayası ve balık yağına daldırılmış balık etleri, memeli ve tavuk karaciğeri yeni metamorfozdan çıkmış kurbağalar için mükemmel besinlerdir [33]. *Xenopus* bu konuda farklı olup, karaciğer şeritleri ile beslenmekte ve gıdayı aldıktan

sonra suya tekrar dalıp günlerce hareketsiz kalabilmekte, ara sıra yüzeye çıkıp hava alabilmektedir [32].

Genel olarak hızla gelişen postmetamorfik hayvanların yetersiz beslenmelerinin önlenmesi gerekir. Aksi takdirde yetersiz beslenen hayvanlar, cinsel yönden olgunlaştıktan sonra bile, küçük boyda kalırlar. İskelet anomalileri ve kemiklerin gevrekleşmesine karşı yavru ve ergin hayvanlara düzenli aralıklarla gıdalarına eklenmiş D vitamini ve kalsiyum verilmelidir [32]. Gelişim hızını belirlemede yaşanan mekanın önemi büyüktür. Genel olarak larvalar diğer tüm faktörler sabit tutulduğunda, kalabalık olmayan topluluklarda daha hızlı gelişimleri tarafımızca da gözlenmiştir. Kaplarda kullanılacak suyun miktarı ise yaşamsal önem taşımamakla birlikte, yüzey alanları önemli olup 15x30x60cm.'lik bir tanka 200 iribaş su derinliği ancak 2,5 cm. olacak şekilde yerleştirilebilir. Bu tankta görülebilecek buharlaşmayı giderebilmek için haftada bir kez tanka su eklenir, ancak hiçbir şekilde iribaşlar derin sulara bırakılmamalıdır. Erişkin hayvanlara en azından belli bir yönde oldukça uzun mesafe yüzebileceği yeterli boyutta kap sağlanmalıdır. Su seviyesinin çok düşük olması da uygun değildir [32].

Amfibi embriyolarının tolere ettiği oksijen basıncı sınırları oldukça geniş ise de, bu hayvanlar anaerobik koşullara aşırı duyarlıdır [32].

Normal amfibi gelişimi için ışığın gerektiğini gösterir hiçbir kanıt yoktur. Öte yandan, doğada yaşayan larvalar gıdalarını alglerden sağladıklarından ve bu bitkilerde ışık gereksindiklerinden bu gıda kaynağının gelişmesi ve keza bu bitkilerin ortama oksijen ekleyebilmesi için normal ışık sağlanmalıdır. Güneş ışığının direkt verilmesi, sıcaklık faktörü nedeniyle tavsiye edilmemektedir [32]. Laboratuvarımızda üretilen ve yaşatılan bireyler sürekli olarak 12:12 saat aydınlık:karanlık fotoperiyodunda, floresans ışık altında barındırılmaktadır.

1.2.2. *Xenopus*' un Üremesi

1.2.2.a. Doğada *X. laevis*' in Üremesi

Güney Afrika' da *Xenopus*' un üreme mevsiminin Temmuz' dan Eylül' e kadar olduğu ve bu dönemde dişilerin 2-3 kez yumurta bıraktığı bildirilmiştir (Berk 1938). Başka bir araştırmacı, üremenin yağmur mevsimiyle birlikte başladığını ve Eylül' den Ocak' a kadar sürdüğünü belirtmektedir (Kalk 1960). Bu durum üremeyi kontrol eden çevresel faktörün sıcaklık yerine nem olduğunu gösterir [36].

Gerek ovaryumların gelişmesi ve gerek ovaryumdan hormon salınmasının sürdürülmesi hipofiz bezi tarafından sağlanan stimülasyona bağlıdır. Araştırmalar doğadan yeni tutulmuş dişi *Xenopus*' ta normal koşullarda ovulasyon için sadece LH' ın yeterli olmasına karşın, bir süre esarete yaşayan hayvanlarda ovülasyon için önce FSH ile üreme koşullarına getirilmesinin gerektiğini göstermiştir. Dodd (1971), esarete tutulan hem dişi hem de erkek hayvanlarda ticari olarak satılan serum gonadotropinin etkili olduğunu bulmuştur. Bu FSH preparatları sekonder eşey karakterlerini de uyardığından dişide nuptial yastığın oluşmasını, erkekte ise önkol ve parmakların kararmasını indükte etmektedir [36].

Araştırmalara göre, *Xenopus* dişileri yumurtalıklarındaki tüm yumurtaları tek bir dölllenme periyodunda dökmezler, fakat çiftleşmeden sonra yumurtalıklar yavaş yavaş gerilemektedir ve ovaryumlarda meydana gelen mevsimsel değişiklik hipofiz hormonları tarafından yönetilmektedir. Üreme mevsiminde erkek *Xenopus*' da en belirgin özellik çiftleşme sırasında dişinin kavranmasına rol oynayan ön kolların iç yüzeyinde siyah ve yapışkan kılların belirmesidir. Bu kılların görülmesi testiste sperm üretildiğinin bir işaretidir. Çiftleşmeye hazır erkek *Xenopus*' un dişiyi önkolları ile kavrama eğilimi bütünüyle refleks bir yanıtıdır [36].

Çiftleşme mevsiminde kurbağaların bazı günlerde yumurtlaması temel olarak bir önceki günün sıcaklığına bağlıdır. Bir gün önce öğleden sonraki yüzey sıcaklığı 21 °C üzerine çıkarsa ertesi gün bol miktarda yumurtlama görülür. Çiftleşme mevsimi başlarken sıcaklık düşecek olursa yumurtlama daha az görülmektedir [36].

Cinsel olgunluğa 2 yaşında ulaşırlar. Üreme zamanında binlerce yumurta üretilir fakat bu yumurtaların tümü döllenmez. Yumurtalar 1,5 mm çapta olup jel kılıfla beraber 3 mm kadardır [32].

1.2.2.b. Laboratuvar Ortamında *X. laevis*' in Üremesi

Laboratuvar koşullarında, *Xenopus* dişileri aylarca mükemmel bir üreme düzeyinde tutulabilmektedir. Araştırmacılar laboratuvar ortamında yaşatılan hayvanların aşırı kalabalıktan korunması gerektiğini savunmuşlardır. Üreme dönemlerinde etkili olan diğer bir unsur şehir sularında aşırı klor bulunmasıdır. Bunlara bağlı olarak, suyun iyice havalandırılması, hayvana bol gıda sağlanması ve aşırı kalabalıktan korunması laboratuvar ortamında üretim için büyük önem taşımaktadır.

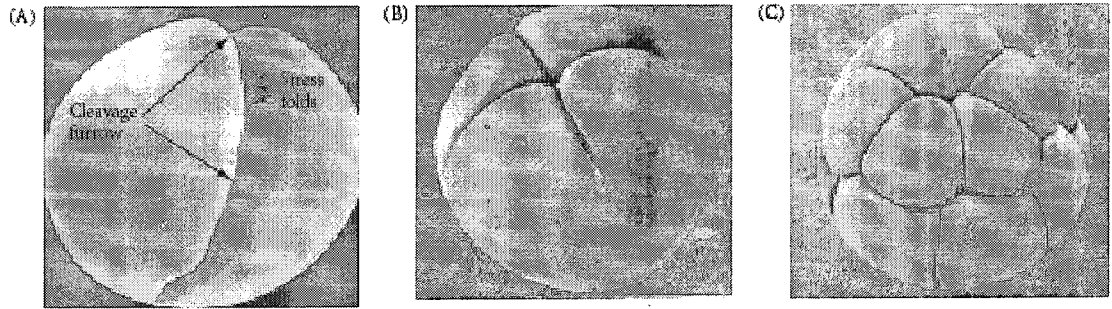
Xenopus laevis' de yumurtlama ve spermatogenez erkek ve dişiye dorsal lenf bezlerinden gonadotropik hormonu enjeksiyonu ile indüklenebilir. Araştırmacılar çeşitli dozlarda hormon enjeksiyonu ile çiftleşmenin indüklenebileceğini rapor etmektedir [31,43-47]. Çiftleştirilecek olan dişi ve erkek kurbağalar ayrı akvaryumlarda 48 saat bekletilir. Genel olarak, yumurta eldesi istenen günden 24-36 saat önce, erkeğe insan korionik gonadotropin hormonu (hCG) enjeksiyonu önerilmektedir [18,46,48]. Bunu takip eden 36 saat sonunda dişiye 250-1000 IU, erkeğe ise 100-500 IU hCG enjekte edilir. Enjeksiyon tamamlandıktan sonra erkek ve dişi kurbağalar aynı akvaryuma konup, karartma amacıyla akvaryumun üzeri örtülür ve sessiz bir ortam sağlanır. Ampleksus 2-6 saat sonra başlamaktadır. Erkek dişiyi pelvik bölgesinden sarmalayarak yumurta dökünceye kadar ampleksusta kalır. Erkek kurbağa belli aralıklarla sperm çıkarır ve bu spermeler yumurtalar dışarı atılır atılmaz ulaşmak için ileri doğru hareket ederler. Sperm yumurtaya animal kutuptan girer ve hemen yumurta pronukleosuna ulaşmaya çalışır. Sperm bölgesine girerken, sürüklediği pigment granüllerinden izlediği yol belli olur. Buna penetrasyon yolu denir. Yumurta ve sperm pronukleuslarının bileşmesiyle döllenme gerçekleşir [49].

Yumurtanın etrafı yumurta membranına bitişik, kendisi tarafından salgılanan jel membranla çevrilidir. Yumurta hafif telolesitaldir ve vitellus vegetatif yarıkürede toplanır [49]. Yumurta dökme 10-16 saate kadar devam edebilir. Yumurtalar akvaryumdan belirli aralıklarla toplanır. Yumurtlamayı takiben erginler alınır ve atıklar temizlenir. Larvalar kendi ciğerleri ile solumaya başlayıncaya kadar (bu durum su yüzeyinde kabarcıkların görülmesi ile anlaşılır) kaptaki suyun sürekli havalandırılması zorunludur. Larvalar ilk hafta kırılğan ve duyarlı oldukları için suyun değiştirilmesine gerek yoktur. Larvalar döllenmeden sonraki üç gün içinde yumurtadan çıkar ve uygun koşullar altında iki ayda başkalaşıma ulaşırlar [33].

1.2.3. *Xenopus laevis* Embriyo ve Larvaların Gelişimi

Xenopus gelişiminin belli evrelerinde diğer omurgalı embriyolarında olduğu gibi çeşitli adlandırmalar kullanılır. İlk kullanılan terim yarıklanma (segmentasyon) olup, bu evrede döllenmiş yumurta bir seri eş zamanlı bölünmelerden geçer ve 2, 4, 8, 16 vs. hücre veya blastomere ayrılır (Şekil 1.7). Bu evreyi daha az düzenli bir bölünme serisi izler ve bu hücrelerden oluşan yapı morula olarak adlandırılır. Morula bir iç kavisi kazanarak blastula adını alır. Daha sonra gelen faz gastrulasyon olup, bu evrede bir grup

hücre yüzeyin altına doğru göç ederek mezoderm ve endodermi oluşturur. Hücre yüzeyinde kalan hücreler embriyonun bütün yüzeyini kaplayarak ektodermi oluşturur. Hücre hareketleri ve bölünmeler devam eder ve ileride beyin, omurilik ve sinir sistemini oluşturacak hücrelerin belirginleştiği nörolasyon fazı başlar. Bölünmeler devam edip, evreler tamamlandıktan sonra larva, embriyo etrafındaki jel kapsülü kırarak yumurtadan çıkar. Bu süreç diğer amfibilere oranla oldukça hızlı olup 72 saat sürer [36].



Şekil 1.7. *Xenopus*' da zigot bölünmesinin elektron mikroskopik fotoğrafı
A: İlk bölünme, B: İkinci bölünme (4 hücre), C: Dördüncü bölünme (16 hücre)
(Beams and Kessel, 1976' dan).

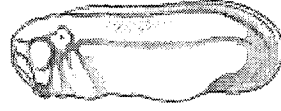
Yumurtadan yeni çıkmış *Xenopus* larvası yaklaşık 4 mm boy ve 1 mm ende olup, en geniş yeri göz hizasıdır. Larvanın sırt rengi, griden saydama kadar değişen biçimde olup, sadece gözler daha önceden melanin aldığı için siyah leke olarak görülür. Yumurtadan çıkışı izleyen ilk 16-24 saat içinde larva oldukça sakin ve suyun dibinde ya da su yüzüne asılı olarak kalır. Bu dönemde ağız gelişir ve larva aktif olarak yüzmeye başlar. Sonraki 2-7. gün arasındaki (45-49. evre) larvaya iribaşın 1. formu denmektedir. Bu evrede iki çift geçici dış solungaç gelişir, baş gövdeye göre orantısız bir şekilde büyür ve deride daha fazla pigmentasyon gelişir. Yumurtadan çıkışı izleyen 7. günde başlayan aktif beslenmeden yaklaşık 35. gün görülen arka bacak tomurcuklarının belirmesine (49-56. evre) kadar olan dönemdeki *Xenopus* larvasına iribaşın 2. formu adı verilmiştir. Yumurtadan çıktıktan sonraki 5-10. hafta arasında (56-60+ evreler) iribaşın 3. formudur. Bu evredeki esas değişiklik boyun büyümesi olup larva 30 mm' den 50-80 mm' ye kadar çıkar. Baş yine gövdeye göre daha büyüktür. Arka bacaklar hızla büyümeye devam eder ve bu dönemin sonuna doğru ön ayak belirir ve başkalaşım başlar. Başkalaşım evresi vücut biçiminde radikal değişiklikler

görülmesini içerir. Önyakların belirip kuyruğun kısaltmaya başladığı evreye genellikle başkalaşımın gündeğumu adı verilir. *Xenopus*' da bu olay 59-62. evrelerde görülür. Bu değışikliklere ileriki dönemlerde kafa iskeleti, vasküler sistem, farenks ve bağırsakta meydana gelen değışiklikler eklenir [36]. Şekil 1.8' de *Xenopus* yumurtasının döllelenmesini takiben, 46. evreye kadar bazı önemli aşamaları gösterilmiştir.



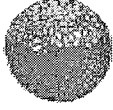


1. evre (yumurta)



27. evre / Lateral görünüm

1 gün 7 saat 15 dak



8. evre (blastula)

5. saat / Animal görünüm



35-36. evre / Lateral görünüm

2 gün 2 saat



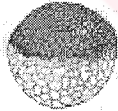
8. evre (blastula)

5. saat / Dorsal görünüm



42. evre / Lateral görünüm

3 gün 8 saat



8. evre (blastula)

5. saat / Ventral görünüm



42. evre / Ventral görünüm

3 gün 8 saat



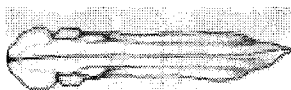
11. evre

11 saat 45 dak / Vejetal görünüm



45. evre / Lateral görünüm

4 gün 2 saat



27. evre/ Dorsal görünüm

1 gün 7 saat 15 dak



46. evre / Lateral görünüm

4 gün 10 saat

Şekil 1.8. *Xenopus laevis*' in bazı metamorfoz evreleri (Xenbase ve Nieuwkoop' dan)
[50,51]

1.2.4. FETAX Testi

Kurbağa (*Xenopus*) embriyogenesis teratojenite testi (FETAX), bir ksenobiyotik etkisine maruz bırakılan Güney Afrika tırnaklı kurbağası *Xenopus laevis*' in embriyonal gelişimini izleme üzerine düzenlenmiştir. FETAX, temel olarak bir organogenez testi olup, organogenez amfibilerde ve memelilerde yüksek oranda korunmuştur [31,45,46,52-54]. İnsan ve *Xenopus*' da ilk 96 saatlik süredeki embriyonik gelişim karşılaştırıldığında, birçok durumda organogenezin paralel geliştiği görülebilir [39,55]. Bu nedenle FETAX, insan embriyosu gelişimi sırasında etkili olabilecek toksik maddelerin ve teratojenik ajanların olası etkilerini, *Xenopus* embriyosu kullanarak göstermek bakımından oldukça kullanışlı bir yöntemdir [56]. Test süresi boyunca maddeye maruz kalma devam eder. Ölü embriyolar test boyunca 24 saatlik periyodun sonunda test solüsyonu değiştirilirken uzaklaştırılmak zorundadır. Şayet ölü embriyolar uzaklaştırılmaz ise, mikrobiyal gelişim yaşayan embriyoların ölümüne neden olacaktır [39].

FETAX, gelişimsel toksisite, ölüm, malformasyon ve büyüme inhibisyonu için konsantrasyon-yanıt verisini sağlar [39]. FETAX yöntemi kullanılarak gelişmenin hangi evresinin etkilendiğini saptamak mümkündür, çünkü gelişim mikroskop altında kolaylıkla izlenebilmektedir. Bundan dolayı ölüm ve malformasyon hızları zamana karşı gözlenebilir. Testin 96 saat sonra bitmesi testin hızını artırmaktadır ve iribaşlar 45-46. evreye geldiklerinde meydana gelen malformasyonlar kolayca belirlenebilmektedir. FETAX, örneklerin hızla taranması ve daha ileri memeli testleri için önceliğin belirlenmesinde yararlı bir test özelliğindedir. Testin değerlendirilmesi tamamlandığında, bu yöntem çeşitli maddelerin teratojenitesini belirlemek için yeterli bilgi sağlamaktadır [57]. Ayrıca yöntemin ucuz oluşu da önemli bir avantaj olarak değerlendirilebilir. Ancak, *Xenopus* embriyolarında karışık fonksiyonlu oksidaz-bağımlı metabolik aktivasyon enzimlerinin düzeyi yeterli değildir. Bu nedenle, bir ksenobiyotiğin sekonder metabolitlerinin oluşumuna bağlı etkilerinin saptanmasına yönelik araştırmalarda FETAX testi yeterli olmamaktadır. Bu amaca yönelik çalışmalarda ortama dışarıdan karışık fonksiyonlu oksidaz enzim siteminin eklenmesi ile bioaktivasyona bağlı olarak metabolitlerin teratojenik aktiviteyi indükleyip indüklediği saptanabilir [22,43,56].

1.2.5. *Xenopus laevis*' de Görülebilecek Bazı Enfeksiyon Tipleri

Xenopus ile ilgili çeşitli bakteriyel, fungal, paraziter ve viral hastalıklar bilinmektedir. Bunların bazıları son derece tehlikelidir [58].

Erişkin kurbağalarda en sık rastlanan enfeksiyon Kırmızı Bacak (Red-Leg) hastalığıdır [58]. Bu hastalığı yok etmek için en iyi yöntem enfekte hayvanların seyreltik potasyum permanganat çözeltisi ile muamelesidir.

Tedavisi bilinmeyen ve çok yüksek ölüm oranı gösteren bir diğer enfeksiyon Saprolegnia' dır. Hastalığın semptomları vücudun şişmesi ve su dolu bir manzara arz etmesidir. Enfekte hayvanlar derhal imha edilmeli ve tanklar permanganat ile sterilize edilmelidir. Pratik uygulamalarda kurbağa tanklarına birkaç tane bakır çubuk atılarak buradan suya geçen bakır iyonlarının bu enfeksiyonları önlenmesi sağlanır. Bu miktar bakır iyonu erginler için toksik değildir ancak, bakır, kurşun, çinko, civa ve bronzun çok düşük konsantrasyonları embriyolar için toksiktir [32].

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 hiçbir 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 [32].

1.3. *Xenopus* İribaşlarında Çalışılan Enzimler

1.3.1. Glutasyon S-Transferaz

Glutasyon S-transferaz (GST) (E.C. 2.5.1.18), tripeptid glutasyonun thiol grubu ile reaktif bir elektrofilik merkeze sahip organik moleküllerin konjugasyonunu katalize eden bir enzim grubudur [59]. GST, endojen nükleofil glutasyon ile birlikte ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar, GST' nin sitokrom P-450 tarafından üretilen reaktif ara ürünlerin detoksifikasyonunda rol oynadığını ortaya koymuştur. Bu ara ürünler hepatositlerde çeşitli makromoleküllere kovalent olarak bağlanabilir ya da glutasyon ile reaksiyona girerler [60].

Enzimin substrat özgülüğü oldukça geniştir. Balık karaciğer dokusunda GST için 1-kloro-2,4 dinitrobenzen (CDNB) iyi bilinen bir substrattır [61,62]. Bu enzim

aslında sitozolik bir enzim olmasına rağmen, membrana bağlı formlarının da bulunduğu bilinmektedir [63]. *Xenopus* ergin karaciğerinde aynı özellikleri taşıyan mu, alfa ve sigma sınıfına ait üç alt ünitesinin bulunduğu bu izozimlerin sucul çevreden karasal atmosfere geçişi kuvvetle desteklediği bildirilmektedir [64]. GST ile ilişkili olarak, glutasyon S-transferaz proteinleri 2 süper gen ailesi içerir. Sitozolik enzim 16 gen ailesi ile, mikrozomal enzim en az 6 gen ailesi ile temsil edilmektedir. Bu iki GST ailesinin oksidatif strese ve toksik kimyasallara karşı hücrel korunmada önemli bir rolü olduğuna inanılmaktadır [65,66].

1.3.2. Karboksil Esteraz

Karboksil esteraz (CaE) (E.C. 3.1.1.1), ester substratlarından alkol bağının hidrolizini katalizleyen, serin hidrolazlar sınıfındandır. Karboksil esteraz aktivitesi birçok omurgalı ve omurgasız türlerin dokularında vardır ve geniş substrat özgüllüğüne sahiptir [67]. CaE' ların fonksiyonları tam olarak belirgin olmamasına rağmen, spesifik lipidlerin taşınmasında ve depolanmasında, ksenobiyotik ve biyolojik esterlerin asimilasyonunda, özgül hormonların biyoinaktivasyonunda düzenleyici olarak işlev gördüğü belirtilmektedir [68]. Özgül olmayan esterazlar, organofosforlu bileşikler ve sentetik pretroidlerin detoksifikasyonunu içeren önemli bir role sahip olan hidrolitik enzim grubunu içerir [69,70]. Ayrıca, böceklerde gelişimi düzenleyen enzim olan juvenil hormon esteraz' da CaE aktivitesi gösteren bir enzimdir [71].

Son yıllarda, CaE aktivitesinin çevresel kirlenme belirteci olarak kullanılması önem kazanmıştır. Esterli bileşiklerden herbisit ve fitalat esterleri çoğunlukla CaE tarafından biotransforme edilirler. Esterli bileşiklerle ilgili araştırmalar, balıkların yüksek esteraz aktivitesine sahip olduklarını ve ester hidrolizinin, hidrofobik kirleticilerin biyolojik birikimini önemli oranda azalttığını göstermektedir [72,73]. Araştırmalar, CaE' ın memelileri ve balıkları organofosfat ve organofosforotioat insektisitlerinin toksik etkilere karşı koruyucu role sahip olduğunu göstermektedir [74,75].

Teorik olarak bütiril kolinesteraz (BChE) tarafından etkilenen bileşikler asetilkolinesteraza (AChE) göre, BChE ya da CaE için daha yüksek bir affiniteye sahiptirler. Diazooxon için plazma CaE' nın ve BChE' nın AChE' a göre 1000 kez daha fazla affinite gösterdiği buna karşın metil paraoxon ve aldicarbin gibi pestisitler için plazma AChE' ı için daha yüksek bir affiniteye sahip olduğu belirtilmektedir.

Araştırmaya göre, kuşlarda hem plazma hem de beyin CaE' ları ile ölüm arasında doğrudan doğruya bir ilişki saptanamamıştır [76].

Alabalık dokularında CaE aktivitesinin 2-40 °C sıcaklıklarda sınırlı bir varyasyon sergilediği ve optimum enzim aktivitesinin 22 °C sıcaklıkta olduğu bildirilmektedir. Ayrıca erişkin balıklardaki enzim aktivitesinin gençlerden farklı bir düzeyde olmadığı ve oldukça yüksek düzeyde CaE aktivitesine sahip oldukları ifade edilmektedir. Balıklardaki CaE aktivitesinin pestisit ve diğer esterlerin sucul ortamlarda bulunmasına bağlı olarak azalış göstereceği beklenmektedir [77]. *Gambusia affinis*' in çeşitli organofosfatlara maruz kalmasına bağlı olarak, karaciğer CaE' nın çok hızlı ve kuvvetle (4 saat içinde %70' den fazla) inhibe edildiği rapor edilmiştir. Bu maruz kalmadan sonraki 4 gün boyunca enzim aktivitesinin hiç madde etkisine maruz kalmasalar bile yeniden kazanılmadığı da bildirilmiştir [74].

Diğer bir araştırmada, paraoxon detoksifikasyonu için CaE' ın önemli bir rolünün olduğu rapor edilmiştir [75].

1.3.3. Laktat Dehidrogenaz

Laktat dehidrogenaz (LDH) (E.C. 1.1.1.28), sitoplazmada bulunur ve glikolizde aktif durumda piruvik asit üzerinden glukozu laktik asite dönüştürür [78]. LDH glikolizisin düzenlenmesinde önemli rol oynar ve bu nedenle normal hücresel fonksiyonlar için çok önemlidir. Organizmanın bütün dokularında bulunmasına karşın, böbrek, karaciğer ve kastaki aktivitesi oldukça yüksektir [79]. Araştırmalara göre, toksik bir bileşikten dolayı, doku hasarının olduğu durumlarda ve hastalık durumlarında LDH aktivitesi önemli oranda etkilenmektedir [80]. Enfeksiyon, şok, zehirlenme nedeniyle hücre membran hasarları ya da doku nekrozlarının oluşması; karaciğer, iskelet ve kalp kasında meydana gelen hasarlar özellikle memelilerde plazma LDH aktivitesinin önemli düzeyde artmasına neden olmaktadır [81]. Bu nedenle LDH aktivitesi değişimi klinikte önemli bir toksisite göstergesi olarak da kabul edilebilir [82]. Enzimin amfibi iribaşlarında türe özgü bir LDH izozim şekli bulunduğu *Rana temporaria* ve *Xenopus laevis* ile yapılan çalışmalarda rapor edilmektedir. Bu izozimlerin iribaşlarda 5 gruba ayrıldığı ve her iki türde de farklılaşmamış dokularda en çok bulunan izozimin LDH-1 olduğu bulunmuştur [83].

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Boyar maddelerin çok çeşitli yapılarda olması, çoğunun ticari olarak gizli formülasyonlara sahip olması ve ticari adlandırma sisteminin karmaşık olması gibi nedenlerle, boyar maddelerin toksik etkilerini çalışmak bakımından önemli güçlükler bulunmaktadır. Toksik etkilerin belirlenmesine yönelik araştırmaların çoğu, tekstil fabrikası atık suları ile ilişkilidir. Ayrıca bu çalışmaların çoğu kimyasal ya da biyolojik arıtım yöntemlerini takiben, özellikle ortamda bulunan mikroorganizmalar üzerine toksik etkilerin saptanmasına yönelik araştırmalardır. Oysa ki, boyar maddeler ya da boyar madde atık suları endüstriyel kullanımı takiben su kaynaklarına deşarş edildiğinden, bu ortamlarda bulunan organizmalar için toksik etkilerinin bilinmesi büyük önem taşımaktadır. Bu bölümde tekstil boyar maddelerinden bazılarının toksik etkileri ile ilgili kaynaklarda yer alan sınırlı sayıda araştırmanın bir özeti sunulmaktadır.

Avrupa Birliği' nin tehlikeli maddeler sınıflandırma kriterine göre, azo boyaları akut toksisite değerlerine bağılı olarak, düşük toksisiteli maddeler grubuna dahil edilmektedir. Az sayıdaki azo boyaları için akut LD50 değerinin 250 mg/kg düzeyinin altında bulunduğu rapor edilmektedir. Çoğunluğu için ise sıçanlarda saptanmış oral akut LD50 değerinin 250-2000 mg/kg düzeyinde olduğu iddia edilmektedir [84].

Epidemiyolojik çalışmalara göre, 1921-1951 yılları arasında mesane kanseri nedeniyle ölen 127 insanın dördünün azo boyası üretim tesislerinde çalıştığı saptanmıştır [85]. Ayrıca azo boyaların mutajenik olduğu da rapor edilmektedir [86-88].

Sucul organizmalarda reaktif siyah 5 boyasının düşük toksik potansiyel gösterdiği bildirilmesine karşın, azo boyalarının sucul organizmalar üzerindeki toksik etkileri hakkında kaynak bilgisi çok azdır. Asidik mavi 9 ve asidik sarı 23 boyası karışımına (1 mg/L) 5 gün süre ile maruz kalan balıklarda (*Orconectes propinquus*) toksik bir etki gözlenmediği bildirilmiştir. Elde edilen verilere göre, LC50 düzeyinin test edilen azo boyaların %59' u için 100 mg/L' den yüksek, %49' u için ise %1-100 mg/L olarak bildirilmiş olup, ikinci grup boyaların toksik potansiyele sahip olduğu rapor edilmektedir [84,89].

Sazan balıklarının (*Cyprinus carpio*) 8 hafta boyunca 10 mg/L düzeyinde maruz bırakıldığı 30 iyonik ve 12 disperse boya için, olumsuz bir etki saptanmadığı rapor edilmiştir [90].

Singh vd. [91], azo grubu bir boya olan Orange II nin sıçanlar üzerindeki etkisini araştırmışlar ve sıçan dalağında büyüme gözlemişlerdir. Bunun yanısıra sıçanların

kırmızı kan hücrelerinin sayısı ve hemoglobinlerinde azalma gözlemiştir. Araştırma bulgularına göre, dişi ve erkek sıçanlar için hesaplanmış akut oral LD50 değeri 10,56 gr/kg düzeyindedir. Bu çalışmada incelenen enzim aktiviteleri bakımından, boyar maddeye maruz kalma sonucunda önemli düzeyde bir değişim olmadığı da rapor edilmiştir.

Amerikan Boya Üreticileri Enstitüsü (ADMI)' nün yürüttüğü bir çalışmada, 56 çeşit boyar maddenin *Selenastrum capricornutum* (yeşil alg) üzerine toksik etkileri araştırılmıştır. 7 ve 14 günlük testler ile, 1,0 ve 10 mg/L düzeyinde dozlarda uygulanan boyaların, %27' sinin 7 günlük uygulama sonunda 1 mg/L boyar madde ile alg gelişimini kuvvetle inhibe ettiği bildirilmektedir [92].

Yapılan bir çalışma ile reaktif azo boyası olan Reaktif Siyah 5 için, sıçanda akut oral LD50 değerinin 14000 mg/kg düzeyinde olduğu, ayrıca boyar maddenin ne deride ne de gözde tahrişe yol açmadığı iddia edilmektedir [93].

Yine başka bir araştırmacı, tekstil atık sularının balıklar üzerine yaptığı histopatolojik ve histokimyasal değişiklikleri test etmiş ve önemli değişimlere yol açtığını göstermiştir. Ovaryum üzerine yapılan bu çalışmada, araştırmacı oogeneze başlangıcında oogoniyum nükleuslarının karyolize uğradığını, çekirdekçiklerinin kaybolduğunu, oositlerde RNA ve protein miktarının azaldığını gözlemiştir [94].

ETAD (1992) tarafından yayınlanan bir raporda, 11 asidik karakterli boyanın zebra balıklarına (*Brachydanio rerio*) toksik etkisi saptanmış olup, LC50 değerleri 2 boya için 1-10 ppm, 3 boya için 10-100 ppm ve 6 boya için 100 ppm' den büyük olarak rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, bazik karakterli 6 boyanın toksik dozları ile ilgili veride; 3 tanesi için 1-10 ppm ve 3 tanesi için 10-100 ppm dozlarında 96 saatlik LC50 değerleri verilmektedir. Reaktif boyalar için LC50 değerleri 96 saatlik periyotta 8 boya için 100 ppm' den büyüktür. Bu çalışmaya göre, zebra balıklarında toksik etkilerine göre boyar maddeler sıralandığında, bazik boyalar >asidik boyalar >disperse boyalar için duyarlılığın belirtilen sıra ile yüksek olduğu ifade edilmektedir. Karsinojenik özellik gösteren ve endüstriyel önemi olan azo boyaları anilin, toluene, benzidin ve naftalen içermektedir. Azo bağlarının enzimatik olarak parçalanmasını takiben, içerdiği aromatik aminler bağırsaktan absorbe edilmekte ve idrar ile atılmaktadır.

C¹⁴ ile işaretlenmiş olan boyar maddelerin vücutta dağılımı izlenmiş olup, Direkt Blue 15 boyasının ve Direkt Red 2' nin sıçanlarda karaciğer, böbrek ve akciğerde biriktiği, oral yolla uygulamasına bağlı olarak, maruz kalan hayvanlarda uygulamadan 72 saat sonra saptanmıştır [96].

Orange-II ve metanil sarı boyaları ve bunların karışımlarının sıçanlarda etoksiresorufin-O-deetilaz, anilin hidroksilaz, aril hidrokarbon hidroksilaz ve aminopirin N-dimetilaz aktivitelerinde artışa neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada sitozolik quinon redüktaz ve GST aktivitesinin de orange-II uygulamasına bağlı olarak önemli düzeyde arttığı, glutatyon düzeyinin azaldığı ve lipid peroksit oluşumunda artış gösterdiği bulunmuştur. Toksikite sonuçlarına göre, metanil sarısı ve orange-II boyasının bir karışım halinde (1:1) kullanılması, bu maddelerin tek başına test edildiğinde elde edilen bulgulara göre, daha toksik olabileceğini göstermektedir [97].

Memelilerde azo boyaları enzimatik olarak kolaylıkla yıkılmaktadır. Azo boyalarının enzimatik yıkımı indirgenme ve parçalanma yolu ile gerçekleşir [98].

Kimyasal boyalar arasında azo grubuna sahip olanlar en çok kullanılan gruptur. Özellikle tekstil ve kağıt endüstrisinde, plastik ve kozmetik sanayiinde ürünleri renklendirmek amacıyla yaygın olarak kullanılırlar. Kullanımını takiben su kaynaklarına verilen endüstriyel atıklar suyun kalitesini etkileyip, çevre sağlığını tehdit edebilir. Çünkü bazı azo boyaları ve onların metabolitlerinin (ör. aromatik aminler) yüksek oranda toksik ve potansiyel karsinojenik maddeler olabileceği bildirilmiştir. Bir azo boyası olan asit sarı 36' nın test balıklarında ölümün yanısıra, vücut ağırlığında kayba, vücut renginde değişime neden olduğu saptanmıştır [99,100].

Ancak, mutajenite testleri ve karsinojenite ile ilgili verilere bağlı olarak, deney hayvanlarında azo boyalarının zayıf mutajen ve karsinojen maddeler olduğu rapor edilmiştir [98].

Hichcock vd. [101]' nin yaptıkları bir çalışmaya göre, çeşitli kimyasal yapılarda boya maddelerinin ozonlanması sonrasında ya da bu işleme tabi tutulmaksızın test organizmalarında %100 ölüme neden olmaktadır.

Beydilli vd. [102] altı reaktif azo boyasının bakteriler üzerindeki etkisini araştırmışlar ve 300 mg/L' ye kadar toksik etki gözlemediklerini bildirmişlerdir. Fakat azo boyalarından kırmızı II' nin yüksek konsantrasyonlarda (500, 1000 ve 2000 mg/L) metanojen bakteriler üzerine toksik etkisi bulunduğu da rapor edilmektedir.

Walthall ve Stark [103], farklı iki ksantin boyasının *Daphnia pulex* üzerine toksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu iki boyanın birlikte kullanılması sinerjistik etki göstererek *Daphnia*' daki ölüm oranını artırmıştır.

Rana ve Raizada [104,105] tekstil fabrikası atık sularının balıklarda karaciğer ve böbrek dokusunda histopatolojik değişimlere yol açtığını rapor etmektedir.

Reaktif azo kırmızı 120 tekstil boyasıyla yapılan çalışmalarda bu boyanın genotoksik etkisi olduğu bildirilmiştir. Araştırmacı üç farklı ve düşük dozda madde uygulanmasına bağlı, eritrositlerde mikronükleus oluşumunun indüklendiğini bildirmektedir. Bu artışın sadece boyar madde konsantrasyonuna bağlı olmayıp, madde ile maruz kalma süresi de mikronükleus oluşumunu arttırmıştır [26].

Moreas vd [106], tekstil atık sularının renk kirliliğini, toksik etki düzeyini ve potansiyel karsinojenik etkilerini azaltmak için, fotokimyasal uygulama ve ozonlama işlemlerinin etkinliği ve bunların kombinasyonu ile oluşacak etkileri değerlendirmişlerdir. Fotokimyasal uygulama ve ozonlama işlemlerinin aynı zamanda uygulandığında renk giderimi neredeyse tamamen olmakta ve total organik karbon içeriğinin (TOC) indirgenmesi %60' dan daha fazla oranda meydana gelmektedir. Araştırmacılar, bütün uygulamaların *E. coli* solunum inhibisyonunu ve dolayısıyla akut toksisiteyi %50 oranında azalttığını da iddia etmişlerdir.

Gouvea vd. [107] tarafından yapılan bir araştırmada, remazol brilliant mavisi R, remazol siyahı B, reaktif mavi 221 ve reaktif mavisi 222 boyalarının fotokatalitik yıkımı ile ilgili çalışmalarda, bu maddelerin toksik etkileri de saptanmıştır. Akut toksisite çalışmalarında *E. coli* kültürleri kullanılmıştır. Remazol siyahı B için toksik etki düzeyinin azalması ile reaksiyon süresi arasında bir ilişki olduğu ve toksisite düzeyinin %50 oranında azaltılması için 120 dak reaksiyon gerektiği bulunmuştur. Remazol brilliant mavisi R için 30 dak süreli bir fotokimyasal reaksiyon süresinin toksik etkiyi tamamen ortadan kaldırdığı da iddia edilmektedir.

Villegas-Navarro vd. [108], tekstil endüstrisinin farklı dönemlerindeki atıksu örneklerinin test organizmalarında LC50 değerini belirlemek için *Daphnia* kullanmış, çalışmalar sonunda bütün atıksu örneklerinin toksik olduğu ve tüm işlem basamaklarında boyanın toksisitesini artırıcı bir etkisinin olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar beş ayrı tekstil fabrikasından sağladıkları örneklerin akut düzeyde çok yüksek toksik etkiye sahip olduğunu ve bu fabrikaların toksik atık materyal ürettiğini rapor etmektedir. Yine başka bir çalışmada da uygulamadan geçmiş ve uygulamadan geçmemiş tekstil atık sularının toksisitesini ve LC50 değerlerini ölçmek için *Daphnia magna* kullanılmıştır. İşlem görmemiş ve işlem görmüş beş tekstil atık suyunun toksik olduğu bulunmuştur ve arıtım sistemlerinin toksik etkiyi gidermede tamamen etkili olmadığı bildirilmiştir [109].

Smuthi vd. [110], tekstil boyası atık sularının çok düşük konsantrasyonlarda bile balık karaciğer hücreleri ve eritrositlerinde DNA hasarını indüklediğini belirtmişlerdir.

Araştırmacılar boyar madde etkisine bağlı olarak 3. günden 9. güne değin DNA uzunluğunda bir azalış gözlemiş, aynı durumun kan hücre sayısında da gözlendiği saptanmıştır. Araştırma sonuçlarına göre, Comet analizinin boyar maddelerinin genotoksik etkilerin belirlenmesinde kullanışlı bir yöntem olabileceği de bildirilmektedir.

Tehlikeli Maddeler Veri Bankasında (HSDB) yapılan incelemelere göre, 223 farklı tekstil boyası üzerindeki yapılan araştırmalar, bu maddelerin çoğunun memeli hayvanlarda karsinojenik etkilere de sahip olduğunu göstermektedir [111].

Wang vd [112] tekstil atık suyundaki reaktif boyar maddelerin, seçilmiş atık sularının ve katkı maddelerinin *Vibrio fisheri* üzerine toksik etkisini çalışmışlardır. Seçilen 17 atık su arasında bir örneğin yüksek toksik etkiye (GL-100), yedi tanesinin orta düzeyde toksik etkiye (GL-12 32) ve dokuz tanesinin de düşük düzeyde toksik etkiye sahip olduğu ya da toksik etkisinin bulunmadığı (GL <10) gözlenmiştir.

Chen [113] tarafından yapılan bir çalışmada, reaktif azo boyalarının *Pseudomonas luteola* üzerine toksik etkileri incelenmiştir. Araştırmacı kullandığı üç farklı azo boyasından reaktif asit sarının en yüksek toksik etkiye sahip olduğunu, reaktif kırmızı 22 boyasının ise daha az düzeyde toksik olduğunu bildirmiştir. Elde edilen bulgulara göre, orta düzeyde toksik etkiye sahip olan reaktif siyah B için, 1 gece süreli statik ortamda renk giderimine yönelik çalışmalar sırasında ortamda bulunan başlangıçtaki hücre konsantrasyonunun %50 azaldığı saptanmıştır. Bu etkinin boyanın sahip olduğu iki azo bağından kaynaklandığı bildirilmektedir. Ayrıca reaktif siyah B boyasının metabolize edilmesi sırasında oluşan ara ürünlerinde daha fazla toksik olabileceği iddia edilmektedir .

Gottlieb vd. [114], tekstil atık suyundaki reaktif siyah 5 ve 3 procion boyasının toksisitesini lüminesent bakteri *Vibrio fischeri* kullanarak çalışmışlar. Hidroliz edilmiş reaktif siyahın renk gideriminden sonra toksik etkinin arttığı, hidroliz edilmemiş reaktif siyah 5' in aerobik şartlar altında toksik etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Rengi giderilmiş asit orange 7' nin 1-amino-2 naftol ürününden dolayı toksik ve genotoksik olduğu belirtilmiştir.

1970' li yıllardan bugüne amfibi populasyonları üzerinde yapılan gözlemler, özellikle kuyruksuz kurbağaların (Anura) tüm dünyadaki çeşitli sulak alanlarda sayılarının hızla azaldığını göstermektedir [40,115-118]. Ayrıca kurbağalar üzerindeki gözlemler bu organizmalarda bazı önemli deformasyonların da ortaya çıktığına işaret etmektedir [119]. Bu nedenle son yıllarda amfibiler üzerinde yürütülen toksikolojik

araştırmalar ile, bu organizmaların çevresel kirleticilere karşı gösterdikleri tepkimelerin mekanizması ve sonuçlarının saptanması amaçlanmaktadır [39,56,120]. Bu yöntemler kullanılarak, amfibi iribaşları ve embriyolarında çeşitli ksenobiotiklerin etkileri araştırılmıştır. Yapılan literatür çalışmalarında amfibi iribaşlarına boyar maddelerin etkisi üzerinde yapılmış oldukça sınırlı sayıda araştırmaya rastlanmıştır. Ancak çeşitli ksenobiotiklerin etkileri hakkında çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birisinde tekstil boyalarının *Bufo viridis* (kara kurbağası) iribaşları üzerine toksik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, astrazon mavisi, kırmızı, siyahı ve sarısı boya ile çalışılmıştır. Araştırmacılar, bu boya iribaşlarda toksik etkiye sahip olduğunu ve *Bufo* iribaşlarına en yüksek toksik etkiye sahip boyanın astrazon mavisi ve en az toksik etkili boyanın ise astrazon kırmızı olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca, iribaşların gelişim evresine bağlı olarak, 20. gelişim evresine göre 24. gelişim evresinde toksik etkinin daha fazla olduğu da rapor edilmektedir [121].

Xenopus' un test organizması olarak kullanıldığı çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu araştırmalara ilişkin son yıllardaki bazı literatür bilgileri de aşağıda özetle sunulmaktadır.

Boğa vd. [122], lityumun *Xenopus* embriyoları üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve yaptıkları FETAX testi sonucunda, lityumun çeşitli tiplerde malformasyonlara yol açtığını gözlemişlerdir. Ayrıca çalışmalar sonucunda lityumun orta şiddetli teratojen madde olduğu bulunmuştur.

Amfibiler özellikle çevresel östrojenler (ya da endokrin bozucular) olarak adlandırılan maddelerin etki mekanizmasının anlaşılmasında da kullanışlı organizmalardır [19,123-127].

Vismara vd. [45], etkili bir herbisit olan paraquatın *Xenopus laevis*' in gelişimi üzerine etkisini FETAX testi ile araştırmışlar ve paraquatın amfibi gelişiminde yüksek embriyotoksik etkisi olduğunu ve zararlılarla kontrol programlarında ciddi bir şekilde denetim altına alınması gerektiğini rapor etmişlerdir.

Yapılan çeşitli çalışmalar kurbağa embriyonik teratojenite testinin (FETAX), dört gün gibi kısa süreli bir test olması nedeniyle alternatif bir gelişim toksisite ölçüm yöntemi olarak önemini vurgulamakta ve çeşitli çevresel kirleticileri etki mekanizmasını belirlemede yöntem büyük kabul görmektedir [128-131].

Lienesch vd. [132], kadmiyumun *Xenopus laevis*' in oosit gelişimi üzerine etkileri çalışılmıştır. CdCl₂ dişi *Xenopus*' a 21 günde bir enjekte edilmiştir. Sonuçta, oogenezin her evresindeki oosit düzeyi yüzdesi azalırken, atretik oosit popülasyonu

önemli düzeyde artmıştır. Kadmiyum oogenezi ayırmaktadır ve gamet gelişimindeki incelemeler çevresel kontaminasyonun üreme kapasitesindeki etkilerini belirlemede kullanılabilir bir parametre olduğunu belirtmektedirler.

Anguiano vd. [133], *Xenopus* embriyolarının gelişim süresinde paratyon, malatyon, lindan ve dieldrin insektisitlerine maruz kalmasına bağlı olarak redükte glutatyon (GSH) ve GST aktivitesini incelemişlerdir. İnsektisite maruz kalmaya bağlı olarak 96 saat sonunda GSH düzeyinin malatyon ve lindan ile azaldığını, paratyon ve dieldrinin herhangi bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. İribaşların ileri gelişim evresinde (6 günlük) bu değişim sadece malatyona bağlı olarak ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte iribaşlardaki GSH düzeyindeki azalış ile ölüm ve morfolojik anomaliler arasında bir ilişki saptanmamıştır. Dört insektisit uygulamasının da GST aktivitesini önemli düzeyde arttırdığı bildirilmektedir. Bu durum erken gelişim evrelerinde iribaşlarda kimyasal strese karşı bir toleransın düzenlendiğini de göstermektedir.

Berzins vd. [134] tarafından *Xenopus* iribaşlarında, sudan ve sedimentten geçen kurşunun birikip birikmediği araştırılmış ve maruz kalma süresi arttıkça iribaşların gelişimlerinin inhibe olduğu gözlenmiştir. İribaşlardaki gelişim inhibisyonundaki artışın, vücuttaki kurşun birikimiyle doğru orantılı olarak arttığı belirtilmiştir.

Garber [135] tarafından yapılan bir çalışmada, *Xenopus* embriyo gelişimi ile bazı minerallerin (Sodyum, Potasyum) konsantrasyonu arasındaki bir ilişki araştırılmış ve düşük potasyum konsantrasyonunun *Xenopus laevis* gelişimini etkilediği saptanmıştır. Araştırmacı mineral bakımından fakir bazı sulak alan kaynaklarının embriyonik gelişimi baskıladığını, sodyum ve potasyum konsantrasyonunun 5 ppm' den daha az olması durumunda *Xenopus laevis* gelişiminin azaldığını ve bu tür sularda 96 saat süreyle kaldığında teratojenik etkilerin ortaya çıktığını bildirmektedir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışmalarda Kullanılan Deney Hayvanı

Çalışmada deney hayvanı olarak *Xenopus laevis* türü kurbağalar kullanıldı. Araştırmalarda kullanılan tüm yumurtalar laboratuvar koşullarında üretildi. Bunun için araştırmanın ön çalışmaları 2000 yılında başlatılmış olup, anaç kurbağalar Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında, Prof. Dr. Tuncay Özgüven' in laboratuvarından hediye olarak temin edildi. Kurbağaların laboratuvar koşullarına adaptasyonunu sağlamak amacı ile erkek ve dişi bireyler 6 ay süre ile ayrı tanklarda tutuldu ve bu süre içerisinde sadece günlük bakımları yapıldı. Kurbağaların yetiştirilmesi amacıyla kurulan klimatize laboratuvarda oda sıcaklığı 23 °C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$)' de tutulmakta ve kurbağalar 12:12 saat aydınlık/karanlık fotoperiyodunda yetiştirilmektedir.

Anaç kurbağaların laboratuvar koşullarımıza adaptasyonunu sağladıktan sonra, bu bireyler hem kendi laboratuvar popülasyonumuzun oluşturulması için, hem de deneysel çalışmalarımız için gerekli iribaşların eldesi için kullanıldı.

Xenopus laevis embriyoları sucul toksisite testleri ve FETAX testi için büyük avantajlara sahiptir. Herhangi bir fazdaki malformasyon mikroskopta kolayca tespit edilir. Bu nedenle araştırmamızda sucul toksikolojik çalışmalar için standart model deney hayvanlarından biri olarak kabul edilen bu türe ait embriyo ve iribaşlar kullanılmıştır. Araştırmada, testlerin yürütülmesi aşamasında EPA [136] ve ASTM [39] tarafından önerilen standart test yöntemleri kullanıldı. Çalışmanın tüm aşamalarında NICEATM [56] tarafından öngörülen kriterlerin uygunluğu denetlendi.

3.1.1. Bakım ve Beslenme

Xenopus laevis türünden, erkekleri en azından iki yaşında ve 7,5-10 cm uzunlukta, dişileri üç yaşında ve 10-12,5 cm uzunlukta olan kurbağalar 120x70x35 cm boyutlarındaki camdan yapılmış akvaryumlarda yaşatıldı. Üstleri aynı büyüklükteki tel kapakla örtüldü. Laboratuvar stoklarımız ve deneysel çalışmalarımız için kullanılan çeşme suyu 3-4 gün ağzı açık kaplarda akvaryum pompasıyla havalandırıldıktan sonra kullanıldı. Akvaryumlardaki su seviyesinin yaklaşık 5 cm seviyede olmasına ve kurbağaların sırtlarının suyla örtülmesine özen gösterildi [33].

Laboratuvar stokları standart beslenme yöntemleri ile beslenmektedir [39]. Yem olarak kullanılan tavuk karaciğeri 0.5 cm kadar boyutlarda kıyılarak haftada iki kez kurbağalara verilmekte ve yem verildikten 1 saat sonra suları temizlenmektedir. Ayrıca 3-4 haftada bir olmak üzere, ciğerlere 2-3 damla multivitamin karıştırılmakta ve böylece vitamin takviyesi de sağlanmaktadır. Tanklarda bulunan kirli su, her beslenme periyodunun ardından, tankların taban kısmında bulunan musluk yardımı ile tahliye edilmekte ve tanklara taze su konularak yenilenmektedir.

Hormonal indüksiyonu takiben, döllenmiş yumurtalardan elde edilen ve laboratuvar kolonisi oluşturmak için yaşatılan iribaşlar 5. günden itibaren beslenmeye başlandı. İribaşlar herbivor olup, en uygun besin maddesi ıspanaktır [40-42]. Ispanaklar insektisit olarak kullanılan arsenik, kurşun gibi toksik maddelerden arındırılmak için iyice yıkandı. Temizlendikten sonra haşlanıp püre haline getirilen ıspanakların suyu süzüldü. Hazırlanan ıspanak püresi her gün iribaşlara verildi. İribaşlar 35x25x15 cm olan üstü tel kapakla örtülü polietilen propilen kaplarda büyütüldü. Ispanakla beslenen iribaşların suları haftada bir değiştirilerek yenilendi.

Metamorfoz sonunda sindirim kanalının histolojisi değişikliğe uğradığından gerek duyulan gıdaların hem türü hem de miktarı değişim gösterir [36]. Bu nedenle başkalaşımdan sonra yavrular tavuk ciğeri ezmesi ile beslenmeye başlandı ve haftada 3 kez beslendiler. Ciğer ezmesi konulan kaplar 30 dakika sonra temizlendi. 4 haftada bir yavrular yumurta sarısı ciğer ezmesine karıştırılarak hazırlanan yemler ile beslendiler [33].

3.1.2. Deney Hayvanlarının İndüklenmesi

FETAX testi ve toksisite testleri için gereksinim duyulan yumurtaların elde edilmesi amacıyla çiftleştirilecek olan dişi ve erkek kurbağalar, ayrı akvaryumlara alınarak 48 saat bekletildiler. Yumurta eldesi istenen günden 36 saat önce, her seferinde bir erkek kurbağaya 200 IU insan korionik gonadotropin hormonu (hCG) dorsal lenf bezlerinden enjekte edildi. 36 saat sonunda bir dişiye 600 IU, önceden hormon uygulanmış olan erkeğe ise 300 IU hCG enjekte edildi. Bu amaçla Türkiye' de ticari olarak üretilen Pregnyl (5000 IU) (Organon) kullanıldı. Enjeksiyon için 1 ml' lik insülin enjektörleri (0,30x8 mm) (Becton Dickinson) kullanıldı. Enjeksiyon tamamlandıktan sonra erkek ve dişi kurbağalar aynı akvaryuma konup, karartma amacıyla akvaryumun üzeri örtüldü ve sessiz bir ortam sağlandı. Erkek kurbağanın döllenmeye hazır olduğu

ön ayak parmaklarında siyah yapışkan kılların belirmesi ile (Nuptial yastık); dişinin ise pupillasının kızarmasıyla tespit edildi.

Ampleksus 2-6 saat sonra başladı ve yumurta dökme ise 10-16 saat devam etti. Ampleksus' un bilinen bir saatte başlaması ve döllenmiş yumurtanın sabah saatlerinde toplanmaya başlaması için, hCG enjeksiyonunun her seferinde ve 23:00-24:00 saatleri arasında yapılmasına özen gösterildi. Yumurtalar, akvaryumdan birer saat aralıklarla, geniş uçlu plastik pipet yardımı ile zedelemekten alınarak, içinde FETAX solüsyonu bulunan cam petri kaplarına aktarıldı. Stereo mikroskop altında incelenerek, döllenmiş ve normal gelişim gösteren embriyolar FETAX testinde kullanılmak üzere ayrıldı. Segmentasyon devam ederken, kısa bir periyotta normal gelişim gösterenlerin seçilmesi için, embriyolar ikinci kez dikkatle incelendi ve bu embriyolar deneysel çalışmalar için ayrıldı.

Embriyolar, gelişimlerinin 8.evresi ve 11.evresi arasındaki gelişim döneminde FETAX' ı başlamak üzere kullanılmak zorundadır. 8. evreden önce seçilen embriyolarda sonradan anormal bölünmeler gerçekleşebilir. Ayrıca 11. evreden sonra seçilen embriyolar organogenezise başlamaktadır [39].

Çalışmalarımızda stok boya çözeltilerinin hazırlanması amacıyla ve farklı boya konsantrasyonlarını hazırlamak için FETAX çözeltisi olarak bilinen tuz çözeltisi karışımı kullanıldı. Ayrıca kontrol grubu olarak kullanılacak embriyolarda test boyunca FETAX çözeltisinde tutuldular. Bu çözelti, 1000 ml distile suda 625 mg NaCl, 96 mg NaHCO₃, 30 mg KCl, 15 mg CaCl₂, 60 mg CaSO₄2H₂O, 75 mg MgSO₄ olacak şekilde hazırlandı [39]. Stok boya çözeltileri FETAX çözeltisi kullanılarak hazırlandıktan sonra, uygulanan testler süresince +4 °C' de ve ışıktan korunarak muhafaza edildi. Bu stok boya çözeltisinden ön doz tarama sonuçlarına göre, her boya için farklı uygulama dozları hazırlandı.

3.2. Toksikite Testlerinin Uygulanması

3.2.1. FETAX Testi

FETAX 96 saat süren ve test materyalinin gelişimsel toksisitesini belirlemede kullanılabilen bir embriyo teratojenite saptama deneyidir. Uygulanan maddenin etkisine maruz kalma, test süresi boyunca devam eder [39]. FETAX testi için cam petri kapları (100 mm) kullanıldı. Her kaba 25 ml boya çözeltisi ve 8-11. gelişim evresinde olan 20

adet embriyo konuldu. Her doz için testler 4 tekrarlı olarak uygulandı. Embriyoların bulunduğu petri kapları 24., 48., 72. ve 96. saatlerde kontrol edilerek, ölü olan embriyolar saptandı ve sayıları kaydedildikten sonra boya çözeltileri değiştirildi. Böylece araştırmada statik yenilemeli test sistemi kullanıldı. 24. saatteki (27.evre) ölüm, embriyoların deri pigmentasyonu, yapısal tamamlık ve tahrişin bulunup bulunmamasına bakılmak suretiyle belirlendi. 48. saatte (35.evre), 72. saatte (42.evre) ve 96.saatte (46.evre) ise ölüm kalp atışının durması ile belirlendi. Ortamdaki boyar madde çözeltilisinin yenilendiği her 24 saatte bir ve 96 saat sonunda ölü embriyolar uzaklaştırıldı. Hayatta kalan tüm embriyolar deney sonucunda %3' lük formaldehit içinde tespit edilerek, cam tüplerde ağzı kapalı olarak +4 °C' da mikroskobik incelemeleri yapılanaya kadar saklandı. Formaldehit içerisinde buzdolabında saklanmakta olan iribaşlar daha sonra bir disseksiyon mikroskop altında incelenerek, her bir örnekte bulunan malformasyonlar saptandı ve kaydedildi. Bu amaçla, 46. gelişim evresine ulaşmış olan iribaşlarda kaydedilen gelişimsel anomaliler baş ödemi, yolk ödemi, gözün ortada olması, mikroftalmi (küçük gözlülük), siklopi (tek gözlülük), mikrosefali (küçük başlılık), depigmentasyon ve kuyruk eğriliğidir.

3.2.2. *Xenopus laevis* İribaşlarında (46. evre) Yapılan Çalışmalar

Araştırmada, *Xenopus laevis* iribaşları 46. gelişim evresinde de tekstil boya maddelerinin çeşitli dozlarına maruz bırakıldı. Bu amaçla 250 ml kapasiteli plastik küvetler kullanıldı ve her bir çalışma kabına 50 ml boya çözeltilisi konuldu. Her kaptaki 15 adet iribaş bulunacak şekilde, toksisite testleri her doz için 4 tekrarlı yapıldı. Boyar madde etkisine 7 gün süre ile statik yenilemeli test ortamında maruz kalan iribaşlar, 24., 48., 72., 96., 120., 144. ve 168. saatlerde kontrol edildi. Ölü olan iribaşlar ortamdan alındıktan ve sayıları kaydedildikten sonra, boyar madde çözeltileri değiştirildi. 7. gün sonunda ölü sayısı belirlendikten sonra test sonlandırıldı. Kontrol grubu iribaşlar için FETAX çözeltilisi kullanıldı. Stok boyar maddelerden toksisite testleri için kullanılan dozların hazırlanması amacıyla da FETAX çözeltilisi kullanıldı. Test süresi boyunca iribaşlara herhangi bir besin maddesi verilmedi.

3.2.3. FETAX Testi Sonunda Hayatta Kalan İribaşların Baş-Kuyruk Uzunluk Ölçümü

FETAX testi için 96 saat boyunca boyar madde etkisine maruz kalan embriyolardan hayatta kalan ve formaldehit içinde saklananlar daha sonra baş-kuyruk uzunluğu ölçümü için kullanıldı. Bu amaçla petri kaplarına alınan örneklerin bir fotokopi cihazında %150 büyütme ile resimleri alındı. Elde edilen kopya resimler üzerinde milimetrik cetvel ile baş-kuyruk uzunluk değerleri ölçülüp kaydedildi. Elde edilen veriler, büyütme değeri göz önüne alınarak, sonuçlar normalize edilerek hesaplandı. Böylece 96 saat sonunda madde etkisine bağlı büyüme inhibisyonu değerlerinin saptanması amaçlandı.

3.3. Çalışmalarda Kullanılan Tekstil Boya Maddeleri

Araştırmalarda tekstil sanayiinde yaygın olarak kullanılan altı boyar madde test edilmiştir. Kullanılan boyar maddeler 2 farklı kimyasal gruba aittir. Bu gruplar azo boyaları ve fitallosiyanin boyaları olarak bilinmektedir. Seçilen boyar maddeler Astrazon kırmızı FBL, Astrazon mavi FGRL, Remazol kırmızı RR, Remazol Turkuaz mavisi G-A, Cibacron kırmızı FN-3G, Cibacron mavi FN-R boyalarıdır. Ticari karakterdeki bu boyar maddeler İPAŞ Tekstil AŞ (Malatya)' den temin edilmiştir. Kimyasal yapısı ve boyar madde özelliği ile bu iki temel gruba ait tekstil boyasının özellikleri Tablo 3.1' de verilmiştir. Buna göre, azo grubu boyaların 3' ü kırmızı renk pigmenti ve biri mavi renk pigmentine sahiptir. Bu boyaların ikisi (remazol kırmızısı, cibacron mavisi) reaktif özelliktedir. Bunlardan cibacron mavisi metal kompleksi (%3,8 bakır) içermektedir. Ayrıca diğer iki azo boyasından astrazon kırmızısı iyonik çinko (%11,2) içermektedir. Kullanılan iki fitallosiyanin boyası (astrazon mavisi ve remazol mavisi) ise sırasıyla çinko (%4,1) ve bakır (%2.3) içeren boyalardır.

Tablo 3.1. Toksikite testlerinde kullanılan boyalar ve özellikleri

Ticari Boya Adı	Kimyasal Grubu-Colour Index (C.I.) no	Kimyasal İçerik	Literatürdeki Toksikite Bilgileri	Kaynak
Astrazon kırmızı FBL	Azo boya C.I. Basic red 46 (%80-90)	%11.2 Zn (iyonik) Nitrojen (-) Fosfor (-)	Siçan Toksikite Testi Akut oral: LD50 1400 mg/kg <i>Brachydanio rerio</i> NOEC 1-10 mg/L (96 h)	Dystar Safety Data Sheet 1.1/D/EN
Astrazon mavi FGRL	Fitallosiyanin (Azasiyanin ve oxazin karışımı) C.I. Basic blue 159 (%30-40) C.I. Basic blue 3 (%5-10)	%4.1 iyonik Zn Nitrojen (-) Fosfor (-)	Siçan Toksikite Testi Akut oral: LD50 206 mg/kg <i>Brachydanio rerio</i> NOEC 10-100 mg/L	Dystar Safety Data Sheet 131559/06
Remazol kırmızı RR	Reaktif azo boya	Ağır metal (-) Nitrojen (-) Fosfor (-)	Siçan Toksikite Testi Akut oral: LD50 >2000 mg/kg <i>Leiciscus idus</i> NOEC >500 mg/L (48 h) Micronucleus mutajen (-) Salmonella mutajen (-)	Dystar Safety Data Sheet 1.1/D/EN
Remazol Turkuaz mavi G-A	Fitallosiyanin bakır kompleksi, Reaktif boya C.I Reaktif Blue 21 (%33.38)	%2.3 bağlı bakır(+) P yada OP (-)	Siçan Toksikite Testi Akut oral >2000 mg/kg <i>Leiciscus idus</i> NOEC 100-500 mg/L	Dystar Safety Data Sheet 253972
Cibacron kırmızı FN-3G	Azo boya	%10.8 nitrojen (+) %1.1 fosfat (+)	Siçan Toksikite Testi Akut oral: LD50 >2000 mg/kg Balık Toksikite Testi LC50 >100 mg/L (96h)	Ciba Safety Data Sheet (91/155/EC)
Cibacron mavi FN-R	Reaktif azo boya	Formazane metal kompleks %3.8 bakır (+) %0.9 fosfat (+)	Siçan Toksikite Testi Akut oral: LD50 >5000 mg/kg Subakut oral (NOEL) 200 mg/kg/28 gün Balık Toksikite Testi NOEC 560 mg/L LC50 >1000 mg/L	Ciba Safety Data Sheet (91/155/EC)

3.4. Çözelti pH' sının Saptanması

Deneyleerde statik yenilemeli test sistemi kullanıldığından, embriyo ya da iribaşların maruz kaldıkları ortamın pH değerleri de ölçüldü. Bu amaçla düşük, orta ve yüksek madde konsantrasyonu bulunan kaplar için 0. saat ve 24. saatlerdeki pH değerleri periyodik olarak kaydedildi. Böylece toksik etkinin ortamdaki pH değişimine bağlı olarak ortaya çıkıp çıkmadığının saptanması amaçlandı.

3.5. Enzimatik Çalışmalar

3.5.1. Enzim Aktivitelerinin Saptanması İle İlgili Çalışmalar

Araştırmada, çeşitli konsantrasyonda boyar madde etkisine maruz bırakılan iribaşlar için seçilen enzim aktivitelerinde ortaya çıkan değişimlerde biyobelirteç olarak kullanıldı. Bu amaçla, içinde 50 ml boyar madde içeren 250 ml' lik plastik küvetlere 30 iribaş konulmak suretiyle, 5 tekrarlı bir düzenek hazırlandı. Her uygulama dozu için iribaşlar, 24 saat süre ile boyar maddeye maruz bırakıldı. 24. saat sonunda hayatta kalan iribaşlar toplanarak, eppendorf tüplerine alındı. Tüp içindeki iribaşlar enzimatik analiz çalışmalarına kadar -80°C ' de derin dondurucuda saklandı.

Oda sıcaklığında çözülen örnekler buz kapları içinde korundu ve örnekler homojenizasyona hazırlandı. İribaşlar tartıldıktan sonra, ağırlıklarının 7 katı hacimde (w/v), fosfat tamponu (0,05 M KH_2PO_4 ; 0,15 M KCl; 1 μM EDTA; 1 μM DTT pH 7,4) eklenerek, cam-teflon homojenizatörde (2000 rpm devirde) 10-15 vuruş ile parçalandı. Çalışmanın her aşamasında örnekler buz içerisinde korundu. Homojenat eppendorf tüplerine alınarak, 4°C ' de 16000 xg' de 20 dak. santrifüj (Dich Instrumentmarkers, Microcentrifuge) edildi. Elde edilen supernatant mikropipet yardımı ile temiz eppendorf tüplerine aktarıldıktan sonra -80°C ' de derin dondurucuda enzim aktiviteleri spektrofotometrik yöntem ile ölçülene kadar saklandı.

3.5.2. *Xenopus* İribaşlarında Enzim Aktiviteleri

Daha önce hazırlanmış supernatantlar kullanılarak, glutatyon S-transferaz (GST) (EC 2.5.1.18), laktat dehidrogenaz (LDH) (EC 1.1.1.28) ve karboksilesteraz (CaE) (EC 3.1.1.1) aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Bu amaçla bir mikrolaka okuyucu sistemi (Molecular Devices, Versa Max, USA) kullanıldı. Tüm enzim aktiviteleri 25°C sıcaklıkta ölçüldü. Her örnek için en az üç tekrarlı olarak çalışıldı. Enzim aktivitesi ölçümü amacıyla düz-tabanlı 96 çukurlu mikrolakalar kullanıldı. Her çukura okunacak enzime bağlı olarak, ön çalışmalar ile belirlenen optimum miktarda süpernatant, tampon, substrat pipetlenerek yapıldı.

3.5.2.1. Glutasyon S-transferaz Aktivitesi

Glutasyon S-transferaz aktivitesinin ölçülmesi amacıyla Habig ve arkadaşları [137] tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı. %96'lık etanol içerisinde hazırlanmış (0,15 M) 1-kloro, 2-4 dinitrobenzen (CDNB) substrat olarak hazırlandı. Enzim aktivitesinin ölçümü sırasında potasyum fosfat tamponu (pH: 6.5; 0,1 M) ve kofaktör olarak redükte glutasyon (0,002 M) kullanıldı. Enzim aktivitesinin saptanması için mikroluka çukurlarına sırasıyla 10 µl supernatant, 100 µl fosfat tamponu+100 µl GSH karışımı pipetlenerek 25 °C' de 3 dak. inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, çukurlara 10 µl CDNB pipetlenerek, karışım 15 s süre ile mikroluka okuyucuda karıştırıldı. Absorbans değişimi 344 nm' de 2 dak. süresince okunarak kaydedildi. Her örnek için en az üç tekrarlı okuma yapıldı. Örnekler arasında elde edilen sonuçların %10' dan fazla sapma göstermesi durumunda, aynı örnek için okuma tekrarlandı.

3.5.2.2. Karboksilesteraz Aktivitesi

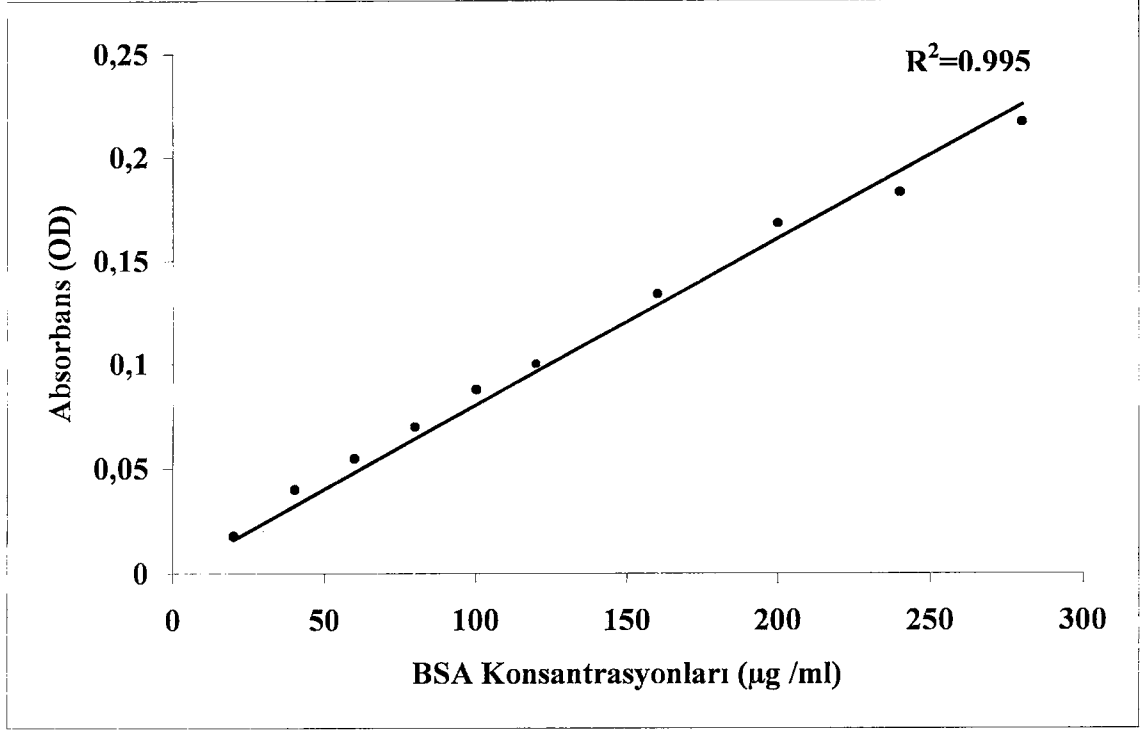
Karboksilesteraz aktivitesi için kullanılan substrat paranitrofenil asetat (p-NPA) olup, bu madde literatürde karboksilesteraz için yaygın olarak kullanılan substratlardan birisidir [138]. Enzim aktivitesinin p-NPA' a bağlı olarak ölçümü için Tris-HCl tamponu (pH 7.6; 0,05 M) kullanıldı. Substrat (0,5 µM) %96'lık etanol içerisinde hazırlandı. 20 µl supernatant ve 250 µl Tris-HCl tamponu mikroluka çukurlarına pipetlenerek, 25 °C' de 3 dak süre ile mikroluka sisteminde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 20 µl p-NPA pipetlenerek, 15 s süre ile cihazda çalkalandı. 405 nm dalga boyunda 2 dak süreyle absorbans değişimi okundu. Her örnek için üç tekrarlı okuma yapıldı. Enzim aktivitesi ölçümü için elde edilen absorbans değişimi cihaz programı tarafından otomatik olarak 1 dak süre için hesaplanarak kaydedildi. Örneklerdeki absorbans değişim değerlerinin aynı örnek için aralarında %10' dan daha yüksek bir düzeyde sapma göstermesi durumunda okuma işlemi yinelenildi.

3.5.2.3. Laktat Dehidrogenaz Aktivitesi

LDH enzim aktivitesi ölçümünde, LDH diagnostik kiti (Sigma Corp., USA) Güngördü [139] ve Özmen ve ark. [140] tarafından önerilen şekilde kullanıldı. LDH reagent A; hazır kite 20 ml distile su, reagent B; hazır kite 5 ml distile su eklenerek hazırlandı. Enzim aktivitesinin ölçülmesi için mikrolpaka çukurlarına 10 µl supernatant, 250 µl reagent A pipetlenerek 25 °C' de 1 dak inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde 10 µl reagent B pipetlendikten sonra karışım 30 s inkübe edildi. Karışım 10 s süre ile mikrolpaka okuyucu sisteminde karıştırıldıktan sonra, 340 nm dalga boyunda 2 dak süre ile absorbans değişimi okundu. Enzim aktivitesine bağlı hesaplanan absorbans değişim değeri kaydedildi. Her örnek için en az üç tekrarlı okuma yapıldı. Örnekler arasında elde edilen sonuçların %10' dan fazla sapma göstermesi durumunda aynı örnek için okuma tekrarlandı.

3.5.2.4. Total Protein Tayini

Xenopus iribaşlarından enzim aktivitesi ölçümü amacı ile hazırlanan supernatant örneklerinde total protein miktarı Lowry ve arkadaşlarının [141] yöntemine göre, mikrolpaka okuyucu sistemi için modifiye edilerek saptandı. Bunun için, 0,1 M NaOH çözeltisinde, %2 Na₂CO₃ : 100 ml; %2 NaK Tartarat: 1 ml; %1 CuSO₄ : 1 ml hazırlandı (A karışımı). Folin fenol reagent (Merck Corp, Germany) (1/1 v/v reagent: distile su) hazırlandı (B karışımı). 20 µl 1/10 oranında sulandırılmış supernatant örnekleri mikrolpakalara pipetlendi ve üzerine 40 µl distile su, 200 µl A çözeltisi eklenerek, oda sıcaklığında 10 dak inkübe edildi. Daha sonra 20 µl B çözeltisi ilave edilerek 30 dak karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 750 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçüldü. Elde edilen değerler mikrolpaka okuyucu sisteminde 750 nm dalga boyunda okunarak hazırlanmış olan BSA standart eğrisi (Şekil 3.1) değerleri ile karşılaştırılarak, örnekteki total protein değerleri, Slide programı ile hesaplandı. Sulandırma faktörüne bağlı olarak, daha sonra supernatanttaki total protein değeri saptandı.



Şekil 3.1. BSA Standart Eğrisi

3.5.2.5. Enzim Spesifik Aktivitesi

Xenopus laevis iribaşlarının supernatant örneklerinde ölçülen GST, CaE ve LDH enzimlerinin aktiviteleri hesaplandıktan sonra, her örnek için total protein değerine bağlı olarak, enzimlerin spesifik aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen tüm aktivite değerleri spesifik aktivite cinsinden $\mu\text{M}/\mu\text{g t.p/ml}$ olarak ifade edildi.

3.6. İstatistiksel Analiz ve Hesaplamalar

Elde edilen bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla istatistiksel paket programları kullanıldı. FETAX testi, iribaşlarda öldürücü konsantrasyon (LC50) değerleri ve enzimatik analiz sonucunda elde edilen bulguların analizi için SPSS programı (SPSS Inc., USA) kullanıldı. LC50 (ortalama öldürücü konsantrasyon) ve EC50 (ortalama etkili konsantrasyon) değerlerinin saptanması için probit regresyon analizi yöntemi uygulandı [45,128]. Enzim aktivitelerinin uygulama gruplarına bağlı olarak test edilmesi amacıyla varyans analizi (ANOVA) yöntemi uygulandı. Gruplar arası farklılık düzeyi en az %95 olasılık ile ($p < 0,05$ için) önemli olarak değerlendirildi. Buna bağlı olarak, gruplar arası farklılığın önemli olup olmadığı $p < 0,05$ düzeyinde

önemlilik derecesine göre saptandı. Gruplar arası farklılığın önemli olduğu saptandığında, örnekler ikili karşılaştırma ile Mann Whitney-U testine göre kontrol grubu verileri ile karşılaştırıldı. Grup içi farklılığın $p<0,05$ düzeyinde önemli bulunduğu gruplar saptandı. FETAX testi sonucunda hayatta kalan iribaşlarda görülen malformasyonların istatistiksel değerlendirmesi Microsta programı kullanılarak yapıldı. Uygulama gruplarında görülen malformasyon oranları kontrol grubuyla karşılaştırılarak, farklılığın $p<0,05$ düzeyinde önemli bulunduğu gruplar saptandı. Baş-kuyruk uzunluklarının istatistiksel değerlendirilmesi SPSS paket programı ile yapıldı ve gruplar arası farklılık olup olmadığı varyans analizi ile test edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre, grup içi farklılığın önemli düzeyde çıktığı ilk konsantrasyon, gelişimi inhibe eden en düşük konsantrasyon değeri (MCİG) olarak belirtildi [18].

Bir maddenin teratojenite riskinin tahmininde kullanılan teratojenite indeksi (Tİ), 96. saate ait LC50 değerinin aynı süre içindeki EC50 değerine oranlanmasıyla hesaplandı. Tİ değeri 1,3-2; 2,0-3,0 ve 3,0' den büyük olan maddeler sırası ile zayıf, orta şiddetli ve şiddetli teratojenler olarak adlandırıldı [142]. Ayrıca ASTM yöntemine göre de, teratojenite indeksi 1,5' den büyük olanlar teratojen madde olarak nitelendirildi [39].

4. BULGULAR

4.1. Astrazon Boyalarının Toksik Etkileri

4.1.1. Astrazon Kırmızısı İle İlgili Embriyonal Toksikite Testleri

Xenopus laevis embriyoları gelişimin 8. evresinden itibaren astrazon kırmızısının 0,1-26,49 ppm dozları arasında boyar maddeye maruz bırakıldı. 96 saat süreyle, embriyonal gelişimin 46. evresine kadar boyar madde etkisine maruz bırakılan toplam 1600 embriyonun 787' sinin ölümü kaydedildi. Tablo 4.1 farklı dozlarda astrazon kırmızısı uygulamasına bağlı olarak boyar maddelerin *Xenopus* embriyolarında ölüm oranları üzerine etkilerini göstermektedir.

96 saat süren FETAX testi sonucunda, 0,1 ppm' de %26,25 oranında ölüm gözlenirken, 26,49 ppm' de %100 ölüm gözlendi. Kontrol grubunda ise %8,75 oranında ölüm kaydedildi (Tablo 4.1). Bulgularımıza göre, düşük doz uygulamalarında doz-yanıt ilişkisi bakımından lineer bir ilişki gözlenmezken, 3,25 ppm ve üzerindeki dozlara maruz kalan kurbağa embriyolarında doz ile orantılı olarak ölüm oranlarında artış gözlenmiştir.

Kontrol grubu ile diğer uygulama grupları arasında doz-yanıt ilişkisine bağlı bir farklılık olup olmadığı test edildiğinde; kontrol grubuna göre, 0,68 ppm, 1,14 ppm, 1,92 ppm ve 3,25 ppm' deki ölüm oranları için istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmazken, diğer bütün dozlardaki farklılıklar önemli düzeyde bulundu ($p < 0.05$).

Tablo 4.1. Çeşitli dozlardaki astrazon kırmızısına maruz kalan *Xenopus* embriyolarında saptanan ölüm oranları

Doz (ppm)	n	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)
Kontrol	80	7	8,75
0,1*	80	21	26,25
0,2*	80	22	27,5
0,4*	80	22	27,5
0,52*	80	23	28,75
0,68	80	18	22,5
0,88*	80	26	32,5
1,14	80	18	22,5
1,48*	80	20	25
1,92	80	21	26,25
2,50*	80	19	23,75
3,25	80	22	27,5
4,22*	80	27	33,75
5,49*	80	50	62,5
7,14*	80	74	92,5
9,28*	80	79	98,75
12,06*	80	78	97,5
15,68*	80	80	100
20,38*	80	80	100
26,49*	80	80	100

* kontrol grubu ile uygulama grupları karşılaştırıldığında farklılık önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.1.2. Astrazon Kırmızısının 46. Evredeki İribaşlar Üzerine Toksik Etkileri

Boyar madde etkisine 7 gün süre ile maruz kalan iribaşların %82' sinin test periyodunda ölümü kaydedildi. Test sonucunda 0,1 ppm' de ölüm oranı %78,3 iken 0,8 ppm' de %100 ölüm saptandı. Kontrol grubunda ise iribaşların %3,33 oranında öldüğü gözlemlendi (Tablo 4.2).

Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre, kontrol grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında 0,28 ppm ve 0,37 ppm' deki ölüm oranları önemli bulunmazken, diğer bütün dozlardaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).

Tablo 4.2. Yedi gün süre ile astrazon kırmızısı etkisine maruz bırakılan 46. evredeki iribaşlarda gözlenen ölüm oranları

Doz (ppm)	n	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)
Kontrol	60	2	3,33
0,025*	60	51	85
0,05*	60	47	78,3
0,1*	60	47	78,3
0,13*	60	49	81,6
0,16*	60	46	76,6
0,22*	60	44	73,3
0,28	60	32	53,3
0,37	60	33	55
0,48*	60	42	70
0,62*	60	53	88,3
0,80*	60	60	100
1,05*	60	60	100
1,36*	60	60	100
1,76*	60	60	100
2,28*	60	60	100
2,96*	60	60	100
3,84*	60	60	100
4,99*	60	60	100
6,48*	60	60	100

* kontrol grubu ile uygulama grupları karşılaştırıldığında farklılık önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

4.1.3. Astrazon Mavisi İle İlgili Embriyonal Toksikite Testleri

Astrazon mavisiyle yapılan toksisite testinde embriyolar gelişimlerinin 8. evresinde 0,05-12 ppm dozları arasında boyar maddeye maruz bırakıldı. 96 saat süreyle statik yenilemeli koşullarda uygulanan testlerde 1520 embriyo kullanıldı ve test boyunca çeşitli doz gruplarında toplam 625 embriyonun ölümü kaydedildi. Buna göre toplam ölüm oranı %41 olarak hesaplandı.

Tablo 4.3. Çeşitli dozlardaki astrazon mavisine maruz kalan *Xenopus* embriyolarında 96 saatlik test sonunda saptanan ölüm oranları

Doz (ppm)	n	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)
Kontrol	80	4	5
0,05	80	5	6,25
0,10	80	9	11,25
0,14	80	12	15
0,28	80	16	20
0,39*	80	16	20
0,55	80	15	18,75
0,77	80	11	13,75
1,08	80	12	15
1,51*	80	21	26,25
2,11*	80	30	37,5
2,95*	80	29	36,25
4,13*	80	27	33,75
5,78*	80	34	42,5
6,94*	80	69	86,25
8,09*	80	75	93,75
8,33*	80	80	100
10*	80	80	100
12*	80	80	100

* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farklılık $p < 0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Test sonucunda, 0,05 ppm' deki ölüm oranı %6,25 iken, 12 ppm' de ölüm oranı %100 olarak belirlendi. Kontrol grubunda ise %5 oranında ölüm kaydedildi (Tablo 4.3).

İstatistiksel analizler sonucunda kontrol grubu ile diğer doz grupları karşılaştırıldığında, 0,39 ppm uygulaması haricindeki düşük doz uygulamaları ile (0,05-1,08 ppm) ölüm oranları bakımından farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmazken, 1,51 ppm ve daha yüksek dozlarda boyar madde etkisine maruz kalan embriyo ölümleri için farklılık kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli bulundu ($p < 0.05$).

Astrazon mavisini ile yapılan embriyonal toksisite testlerinde düşük dozda uygulamalar sonucunda doz-yanıt ilişkisi bakımından doğrusal bir ilişki saptanmazken, özellikle 1,51 ppm ve daha yüksek boyar madde konsantrasyonları için doğrusal bir doz-yanıt ilişkisi gözlemlendi.

4.1.4. Astrazon Mavisinin 46. Evredeki İribaşlar Üzerine Etkileri

Gelişimlerinin 46. evresinde astrazon mavisini etkisine maruz bırakılan *Xenopus laevis* iribaşları için 7 gün boyunca statik yenilemeli test sisteminde kaydedilen ölüm

oranları Tablo 4.4' de verilmiştir. Elde edilen verilere göre, uygulanan boyar madde konsantrasyonu ile ölüm oranı arasında doğrusal bir doz-yanıt ilişkisi görülmemektedir. Genel olarak 0,05-0,20 ppm arası uygulama konsantrasyonlarında saptanan ortalama ölüm oranı %50 düzeyinde iken, 0,3 ppm ve daha yüksek dozlarda %75' den fazla ölüm gözlenmektedir.

Madde uygulamasına bağlı olarak gözlenen ortalama ölüm oranı %81 olarak hesaplandı. 0,1 ppm' de ölüm oranı %40 iken, 1,08 ppm ve üzerindeki konsantrasyonlarda iribaşlar için gözlenen ölüm oranı %100 olarak bulunmuştur (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Yedi gün süre ile astrazon mavisi etkisine maruz bırakılan 46. evredeki iribaşlarda gözlenen ölüm oranları

Doz (ppm)	n	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)
Kontrol	60	17	28,3
0,05	60	28	46,6
0,07*	60	31	51,6
0,10	60	24	40
0,14*	60	39	65
0,20*	60	33	55
0,28*	60	48	80
0,39*	60	47	78,3
0,55*	60	45	75
0,77	60	45	75
1,08*	60	60	100
1,51*	60	58	96,6
2,11*	60	60	100
2,95*	60	60	100
4,13*	60	60	100
5,78*	60	60	100
6,94*	60	60	100
8,09*	60	60	100
8,33*	60	60	100
10*	60	60	100
12*	60	60	100
14,4*	60	60	100

* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel farklılık $p < 0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

İstatistiksel analiz sonuçlarına göre, kontrol grubu ile iribaşların maruz kaldığı boyar madde konsantrasyonları karşılaştırıldığında, 0,05 ppm ve 0,77 ppm için ölüm oranları bakımından önemli düzeyde farklılık bulunmadı. Bu dozlar haricindeki diğer

bütün uygulama konsantrasyonlarında 7 günlük test sonucunda saptanan ölüm oranları için farklılık önemli düzeyde bulundu ($p<0.05$).

4.2. Remazol Boyalarının Toksik Etkileri

4.2.1. Remazol Kırmızısı ile İlgili Embriyonal Toksikite Testleri

Xenopus laevis embriyoları gelişimin 8.evresinden itibaren remazol kırmızısının 3,33-2190 ppm dozları arasında boyar maddeye maruz bırakıldı.

Tablo 4.5. Çeşitli dozlardaki remazol kırmızısına maruz kalan *Xenopus* embriyolarında saptanan ölüm oranları

Doz (ppm)	n	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)
Kontrol	80	0	0
3,33*	80	4	5
5	80	2	2,5
7,5*	80	4	5
11,25*	80	5	6,25
16,87*	80	3	3,75
25,31	80	3	3,75
37,96*	80	4	5
56,94	80	3	3,75
85,41*	80	10	12,5
128,12*	80	7	8,75
192,18*	80	6	7,5
288,27*	80	8	10
432,41*	80	11	13,75
648,62*	80	23	28,75
972,93*	80	22	26,25
1460*	80	26	32,5
2190*	80	66	82,5

* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel farklılık $p<0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur

96 saat süreyle, embriyonal gelişimin 46. evresine kadar statik yenilemeli test kaplarında çeşitli dozlarda boyar madde etkisine maruz bırakılan toplam 1440 embriyonun %14,38' sinin ölümü kaydedildi. 3,33 ppm' de ölüm oranı %5 iken, 2190 ppm' de %82,5 oranında ölüm gözlemlendi. Kontrol grubundaki iribaşlarda ölüm gözlenmemiştir (Tablo 4.5).

Yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre, kontrol grubu ile diğer uygulama grupları arasında doz-yanıt ilişkisine bağlı bir farklılık olup olmadığı test edildi. Buna göre, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 5 ppm, 25,31 ppm ve 56,94 ppm' deki ölüm oranları için önemli bir farklılık bulunmazken, diğer doz gruplarındaki ölüm oranları için farklılık istatistiksel açıdan önemli düzeyde bulundu ($p<0.05$).

4.2.2. Remazol Kırmızısının 46. Evredeki İribaşlar Üzerine Etkileri

Remazol kırmızısının 7,96 ppm ile 2428 ppm arasında toplam 23 uygulama grubunda boyar madde etkisine maruz bırakılan iribaşlar için ortalama %60 oranında ölüm kaydedildi.

Çalışmada 7,96 ppm de kaydedilen ölüm oranı %25 iken, 2428 ppm' de %100 ölüm gözlemlendi (Tablo 4.6).

Kontrol grubu ile diğer uygulama grupları karşılaştırıldığında, istatistiksel açıdan 7,96 ppm, 10,35 ppm, 13,46 ppm, 50 ppm, 84,5 ppm, 185,64 ppm ve 407,85 ppm' deki ölüm oranları için farklılık önemli bulunmadı. Diğer doz grupları arasındaki farklılık ise önemli bulundu ($p<0.05$).

Tablo 4.6. Yedi gün süre ile remazol kırmızısı etkisine maruz bırakılan 46. evredeki iribaşlarda gözlenen ölüm oranları

Doz (ppm)	n	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)
Kontrol	60	7	11,66
7,96	60	15	25
10,35	60	19	31,66
13,46	60	25	41,66
17,5*	60	28	46,66
22,75*	60	41	68,33
29,58*	60	32	53,33
38,47*	60	33	55
50	60	31	51,6
65*	60	40	66,6
84,5	60	36	60
109,85*	60	36	60
142,80*	60	30	50
185,64	60	34	56,6
241,33*	60	37	61,6
313,73*	60	32	53,3
407,85	60	36	60
503,20*	60	52	86,6
654,16*	60	43	71,6
850,41*	60	43	71,6
1105*	60	53	88,3
1437*	60	54	90
1868*	60	60	100
2428*	60	60	100

* Kontrol grubu ile uygulama grupları karşılaştırıldığında, istatistiksel farklılık $p < 0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

4.2.3. Remazol Mavisi İle İlgili Embriyonal Toksikite Testleri

Remazol mavisi etkisine maruz kalan embriyolar için, FETAX testinde 5 ppm ile 555,6 ppm arasındaki çeşitli dozlarla çalışıldı. 96 saat süreyle statik yenilemeli test kaplarında madde etkisine maruz bırakılan toplam 1280 embriyonun 402' si öldü. Çalışmada 5 ppm' deki ölüm oranı %5 ve 555,6 ppm' de ise %100 olarak kaydedildi. Kontrol grubunda ise FETAX testi boyunca hiç ölüm görülmemiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Çeşitli dozlardaki remazol mavisine maruz kalan *Xenopus* embriyolarında saptanan ölüm oranları

Doz (ppm)	n	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)
Kontrol	80	0	0
5*	80	4	5
7	80	3	3,75
9,8*	80	7	8,75
13,72*	80	8	10
19,21*	80	7	8,75
26,89*	80	5	6,25
37,65*	80	8	10
52,71*	80	14	17,5
73,79	80	5	6,25
103,31*	80	9	11,25
144,63*	80	12	15
202,48*	80	80	100
283,47*	80	80	100
396,86*	80	80	100
555,6*	80	80	100

* Kontrol grubu ile uygulama grupları karşılaştırıldığında $p < 0.05$ düzeyinde farklılık önemli bulunmuştur.

Varyans analizi uygulaması ile, kontrol grubuyla uygulama grupları arasındaki farklılığın önemli olup olmadığı belirlendi. 7 ppm ve 103,31 ppm' deki ölüm oranları için istatistiksel farklılık kontrol grubuna göre önemli bulunmazken, diğer bütün dozlardaki ölüm oranları bakımından farklılığın önemli düzeyde olduğu saptandı ($p < 0.05$).

4.2.4. Remazol Mavisinin 46. Evredeki İribaşlar Üzerine Etkileri

Xenopus iribaşlarının gelişimlerinin 46. evresinde remazol mavisine 7 gün boyunca maruz bırakılmaları sonucunda kaydedilen ölüm oranları Tablo 4.8' de verilmektedir. Bulgularımıza göre, iribaşlar için kaydedilen ortalama ölüm oranı test periyodu sonucunda %63,11 olarak hesaplanmıştır. Buna bağlı olarak, 1,97 ppm' de gözlenen ölüm oranı %11,66 iken, 384,53 ppm' de ise %100 olarak kaydedildi (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Yedi gün süre ile remazol mavisi etkisine maruz bırakılan 46. evredeki iribaşlarda gözlenen ölüm oranları

Doz (ppm)	n	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)
Kontrol	60	2	3,33
1,97	60	7	11,66
2,96	60	11	18,33
4,44*	60	13	21,66
6,66*	60	23	38,33
10*	60	33	55
15*	60	37	61,6
22,5*	60	32	53,3
33,75*	60	51	85
50,63*	60	60	100
75,95*	60	59	98,5
113,93*	60	60	100
170,90*	60	60	100
256,35*	60	60	100
384,53*	60	60	100

* Kontrol grubu ile uygulama grupları karşılaştırıldığında, $p < 0.05$ düzeyinde farklılık önemli bulunmuştur.

İstatistiksel analiz sonuçlarına göre, kontrol grubu ile iribaşların maruz kaldığı boyar madde konsantrasyonları karşılaştırıldığında, 1,97 ppm ve 2,96 ppm' deki ölüm oranları istatistiksel açıdan önemli düzeyde bulunmadı. Diğer uygulama grupları için saptanan ölüm oranları istatistiksel olarak önemli düzeyde bulundu ($p < 0.05$).

4.3. Cibacron Boyalarının Toksik Etkileri

4.3.1. Cibacron Kırmızısı İle İlgili Embriyonal Toksikite Testleri

Cibacron kırmızısında *Xenopus* embriyoları, gelişimlerinin 8. evresinde 6,66 ppm ile 1945 ppm arasında çeşitli uygulama gruplarına maruz bırakıldı. FETAX testi için toplam 1280 embriyo kullanıldı ve test süresince 413 embriyonun ölümü kaydedildi. 96 saat süreyle, embriyonal gelişimin 46. evresine kadar farklı dozlarda boyar madde etkisine maruz bırakılan iribaşların 6,66 ppm' deki ölüm oranı %8,75 iken, 1945 ppm de %100 ölüm görüldü. Tablo 4.9 cibacron kırmızısı uygulamasına bağlı olarak farklı dozlarda boya maddelerin *Xenopus* embriyolarında ölüm oranları üzerine etkilerini göstermektedir. Doz-yanıt ilişkisi bakımından sonuçlar incelendiğinde, 384,36 ppm uygulamasına kadar olan boya konsantrasyonlarında doğrusal bir doz-yanıt ilişkisi

saptanamadı. Yüksek boyar madde konsantrasyonlarına bağlı olarak ise ölüm oranında önemli düzeyde artış kaydedildi.

Varyans analizi sonucuna göre, 6,66 ppm, 10 ppm, 22,5 ppm, 33,75 ppm ve 256,24 ppm' deki ölüm oranları ile kontrol grubu arasındaki farklılık önemli düzeyde bulunmazken, diğer uygulama gruplarının ölüm oranlarındaki farklılığın kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan önemli düzeyde olduğu bulundu ($p<0.05$).

Tablo 4.9. Çeşitli dozlardaki cibacron kırmızısına maruz kalan *Xenopus* embriyolarında saptanan ölüm oranları

Doz (ppm)	n	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)
Kontrol	80	4	5
6,66	80	7	8,75
10	80	14	17,5
15*	80	17	21,25
22,5	80	11	13,75
33,75	80	9	11,25
50,62*	80	12	15
75,93*	80	17	21,25
113,89*	80	11	13,75
170,83*	80	13	16,25
256,24	80	10	12,5
384,36*	80	16	20
576,54*	80	46	57,5
864,81*	80	66	82,5
1297*	80	80	100
1945*	80	80	100

* Kontrol grubu ile uygulama grupları karşılaştırıldığında farklılık istatistiksel olarak önemli düzeydedir ($p<0.05$).

4.3.2. Cibacron Kırmızısının 46. Evredeki İribaşlar Üzerine Etkileri

Xenopus iribaşları gelişimlerinin 46. evresinde iken cibacron kırmızısının çeşitli dozlarına 7 gün süre ile maruz bırakıldı. Test için toplam 900 iribaş kullanıldı ve 281' inin ölümü kaydedildi. Buna göre, ortalama ölüm oranı %31 olarak hesaplandı. En düşük doz olan 10 ppm' de test sonunda ölüm oranı %8,33 iken, en yüksek doz olan 1945 ppm' de ise %91,66 düzeyinde ölüm saptandı (Tablo 4.10).

Kontrol grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında, 10 ppm, 15 ppm, 22,5 ppm, 50,62 ppm ve 75,93 ppm' deki ölüm oranlarının istatistiksel olarak önemli düzeyde

bulunmadığı, diğer uygulama gruplarındaki ölüm oranlarının istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlendi ($p<0.05$).

Tablo 4.10. Yedi gün süre ile cibacron kırmızısının etkisine maruz bırakılan 46. evredeki iribaşlarda gözlenen ölüm oranları

Doz (ppm)	n	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)
Kontrol	60	2	3,33
10	60	5	8,33
15	60	5	8,33
22,5	60	9	15
33,75*	60	8	13,33
50,62	60	13	21,66
75,93	60	12	20
113,89*	60	14	23,33
170,83*	60	16	26,66
256,24*	60	17	28,33
384,36*	60	28	46,66
576,54*	60	30	50
864,81*	60	29	48,33
1297*	60	38	63,33
1945*	60	55	91,66

* Kontrol grubu ile uygulama grupları karşılaştırıldığında, farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$).

4.3.3. Cibacron Mavisini İle İlgili Embriyonal Toksikite Testleri

Embriyolar gelişimlerinin 8. evresinden itibaren 3,33-1459 ppm arasındaki farklı dozlarda cibacron mavisine maruz bırakıldı. Gelişimin 46. evresine kadar boyar madde etkisine maruz kalan embriyolar için %35,5 oranında ölüm kaydedildi. 3,33 ppm uygulamasında %13,75 oranında ve 1459 ppm' de %100 oranında ölüm gözlemlendi (Tablo 4.11).

Yapılan istatistiksel analizler ile kontrol grubunun uygulama gruplarıyla karşılaştırılması sonucunda, 3,33 ppm, 16,87 ppm ve 25,31 ppm konsantrasyonlarda boyar maddeye maruz kalan embriyolar için ölüm oranları istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmadı. Buna karşın, diğer uygulama gruplarındaki ölüm oranları istatistiksel olarak önemli düzeyde bulundu ($p<0.05$).

Tablo 4.11. Çeşitli dozlardaki cibacron mavisine maruz kalan *Xenopus* embriyolarında saptanan ölüm oranları

Doz (ppm)	n	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)
Kontrol	80	6	7,5
3,33	80	11	13,75
5*	80	18	22,5
7,5*	80	18	22,5
11,25*	80	20	25
16,87	80	13	16,25
25,31	80	11	13,75
37,96*	80	22	27,5
56,94*	80	16	20
85,41*	80	19	23,75
128,12*	80	18	22,5
192,18*	80	20	25
288,27*	80	23	28,75
432,41*	80	41	51,25
648,62*	80	68	85
972,93*	80	80	100
1459*	80	80	100

* Kontrol grubu ile uygulama grupları karşılaştırıldığında, farklılık önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

4.3.4. Cibacron Mavisinin 46. Evredeki İribaşlar Üzerine Etkileri

Xenopus iribaşları 46. gelişim evresinde cibacron mavisinin 5 ppm ile 972,93 ppm arasındaki farklı dozlara bırakıldığında toplam 900 iribaştan 488' inin ölümü kaydedildi. Testler sonucunda 5 ppm' de %16,6 ölüm saptandı. 972,93 ppm madde uygulaması sonucunda ise %91,6 oranında ölüm gözlemlendi (Tablo 4.12).

Kontrol grubu ile diğer uygulama grupları karşılaştırılarak, ölüm oranları arasındaki farklılığın önemli olup olmadığı belirlendi. Buna bağlı olarak, 5 ppm, 7,5 ppm, 11,25 ppm, 16,87 ppm, 25,31 ppm, 37,96 ppm ve 85,41 ppm' deki ölüm oranları kontrol grubuna göre önemli düzeyde bulunmazken, diğer uygulama gruplarındaki ölüm oranları istatistiksel açıdan önemli bulundu ($p<0.05$).

Tablo 4.12. Yedi gün süre ile cibacron mavisinin etkisine maruz bırakılan 46. evredeki iribaşlarda gözlenen ölüm oranları

Doz (ppm)	n	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)
Kontrol	60	7	11,6
5	60	10	16,6
7,5	60	11	18,3
11,25	60	22	36,6
16,87	60	20	33,3
25,31	60	32	53,3
37,96	60	30	50
56,94*	60	37	61,6
85,41	60	33	55
128,12*	60	38	63,3
192,18*	60	44	73,3
288,27*	60	52	86,6
432,41*	60	46	76,6
648,62*	60	51	85
972,93*	60	55	91,6

* Kontrol grubu ile uygulama grupları karşılaştırıldığında, $p < 0.05$ düzeyinde farklılık önemli bulunmuştur.

4.4. FETAX Testi Sonucu Hesaplanan LC50, EC50, Tİ ve MCİG Değerleri

Bu çalışma için seçilmiş bulunan üç farklı ticari gruptan toplam altı tekstil boyasının *Xenopus* iribaşlarında akut etkisini saptamak amacıyla kurulan test düzeneği ile ortalama letal konsantrasyon değerleri (LC50), ortalama etkili konsantrasyon değerleri (EC50), teratojenite indeksi (Tİ) ve gelişimi inhibe eden en düşük konsantrasyon değerleri (MCİG) de hesaplandı (Tablo 4.13).

Astrazon kırmızısı ve astrazon mavisi boyaları için LC50 değerlerinin birbirine benzer dozlarda olduğu bulundu. Buna göre astrazon kırmızısı için hesaplanan LC50 değeri 4,736 ppm iken, astrazon mavisi için LC50 değeri 4,968 ppm' dir. Remazol boyalara bakıldığında ise, remazol kırmızısı için LC50 değeri 1462 ppm ve remazol mavisi için LC50 değeri 421,61 ppm düzeyinde bulundu. Cibacron boyaları için yapılan hesaplamalarda, LC50 değeri cibacron kırmızısı boyası için 558,32 ppm ve cibacron mavisi boyası için ise 404,72 ppm olarak saptandı.

FETAX testi için 8. gelişim evresinden itibaren çeşitli boyar madde konsantrasyonlarına maruz bırakılan embriyoların 96 saat sonunda hayatta kalış oranlarına ve uygulama dozlarına bağlı olarak yapılan hesaplamalara göre EC50 düzeyi astrazon kırmızısı ve mavisi için 2,361 ve 1,252 ppm; remazol kırmızısı ve mavisi için

903,15 ve 142,52 ppm; cibacron kırmızısı ve mavisi için ise 335,52 ve 220,22 ppm olarak hesaplandı (Tablo 4.13).

Elde edilen LC50 değerlerinin EC50 değerlerine oranlanması sonucunda, test edilen her boyar madde için ASTM standartlarına göre Teratojenite İndeksi (Tİ) de hesaplandı. Boyar maddelerin embriyonal teratojenite risk değerlerinin bu yolla gösterilmesi amaçlandı. Dawson [142] tarafından önerilen Tİ değerlerine bağlı olarak, astrazon kırmızısının 2,005' lik bir değerle zayıf teratojen grubuna girdiği, astrazon mavisinin ise 3,965' lik bir değerle şiddetli teratojen grubuna girdiği görülmektedir. Teratojenite indeksi bakımından, remazol kırmızısının 1,619 ile zayıf teratojen iken, remazol mavisinin 2,958 ile orta şiddetli teratojen bir madde olduğu anlaşılmaktadır. Teratojenite indeksi bakımından cibacron kırmızısı 1,664 ve cibacron mavisinde 1,838 ile zayıf teratojen maddeler olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca ASTM yöntemine göre de teratojenite sınıflandırması yapıldığında çalışılan bütün boyalar teratojen olarak belirlenmiştir (Tablo 4.13) [39].

Embriyonal gelişimi inhibe eden en düşük madde konsantrasyonu (MCİG) düzeyleri de araştırmada her boya için ayrı ayrı hesaplandığında, bu değerlerin sırasıyla astrazon kırmızısı ve mavisi için 0,1 ppm ve 0,28 ppm; remazol kırmızısı ve mavisi için 3,33 ppm ve 5,0 ppm olduğu bulundu. Cibacron kırmızısı ve mavisi için ise MCİG değerleri sırası ile 6,66 ppm ve 3,33 ppm olarak hesaplandı.

Tablo 4.13. FETAX testi sonucunda boyar maddelere maruz bırakılan ve hayatta kalan embriyolar için hesaplanan LC50, EC50, Tİ ve MCİG değerleri

Boya/ Renk	LC50 (ppm)	EC50 (ppm)	Tİ	MCİG (ppm)
Astrazon				
Kırmızı	4,736	2,361	2,005 ^{a,d}	0,1
Mavi	4,968	1,252	3,965 ^{c,d}	0,28
Remazol				
Kırmızı	1462,66	903,15	1,619 ^{a,d}	3,33
Mavi	421,612	142,52	2,958 ^{b,d}	5,0
Cibacron				
Kırmızı	558,325	335,52	1,664 ^{a,d}	6,66
Mavi	404,726	220,22	1,838 ^{a,d}	3,33

Dawson Tİ sınıflandırmasına göre; ^azayıf, ^borta şiddetli, ^cşiddetli teratojen
ASTM Tİ sınıflandırmasına göre; ^dmadde teratojeniktir

4.5. Tekstil Boyalarının 46. Evredeki İribaşlar İçin Hesaplanan Ortalama Öldürücü Konsantrasyon Değerleri

Araştırmada 7 gün süren uygulama süresinde 46. gelişim evresindeki iribaşlar için 24., 72. ve 168. saatlerde LC 50 değerleri de ayrı ayrı hesaplanmıştır (Tablo 4.14). Kullanılan bütün tekstil boya için LC50, klasik doz-yanıt ilişkisi sonucuna göre beklenildiği gibi 24. saatten 168. saate doğru azalan konsantrasyon değerlerinde bulundu.

Astrazon kırmızısı için 24. saatte LC50 değeri 8,42 ppm iken, 168. saatte 0,35 ppm' dir. Astrazon mavisi için 24. ve 168. saatlerde sırasıyla 1,90 ppm ve 0,13 ppm düzeyindedir.

Remazol kırmızısı için 24., 72. ve 168. saatlerde LC50 değerleri sırasıyla 2989 ppm, 1720 ppm ve 111,65 ppm olarak belirlenmiştir. Remazol mavisi için hesaplanan LC50 değerleri ise 24. saatte 747,79 ppm, 168. saatte ise 6,97 ppm' dir.

Cibacron kırmızısı ve mavisi için 168. saatte saptanan LC50 değeri ise 358,96 ppm ve 15,76 ppm olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.14. Tekstil boyaalarının *Xenopus laevis* iribaşlarında LC50 değişimleri

Boya/Renk	24.saat (ppm)	72.saat (ppm)	168.saat (ppm)
Astrazon			
Kırmızı	8,42	1,57	0,35
Mavi	1,90	0,76	0,13
Remazol			
Kırmızı	2989,38	1720,89	111,65
Mavi	747,79	286,65	6,97
Cibacron			
Kırmızı	6406,18	1494,17	358,96
Mavi	1144,36	404,22	15,76

4.6. Astrazon Boyalarının Malformasyon Oranlarına ve Malformasyon Tipleri Üzerine Etkileri (FETAX Testi)

4.6.1. Astrazon Kırmızısının Malformasyon Oranları ve Tiplerine Etkisi

8. evreden itibaren astrazon kırmızısı etkisine 96 saat süreyle statik yenilemeli test sisteminde maruz bırakılan *Xenopus laevis* embriyolarından test sonucunda hayatta kalanlar %3' lük formaldehit çözeltisine konduktan sonra, bu embriyolardaki malformasyon tipleri ve oranları mikroskop altında belirlendi. Boyar madde uygulaması sonucunda, kontrol grubu hariç, diğer uygulama dozlarında toplam 740 embriyonun hayatta kaldığı saptanmış olup, bu embriyolarda FETAX testi sonucu %22,97 oranında çeşitli tiplerde malformasyon gözlemlendi. Diğer taraftan, yaşayan iribaşlar arasında farklı tiplerde malformasyonların ortaya çıkması ile boyar madde konsantrasyonunun artışı arasında doğrusal bir ilişki olduğu bulundu. Ayrıca embriyoların ölümüne neden olmayan yüksek konsantrasyonlarda malforme birey sayısında önemli bir artış olduğu ve bunun istatistiksel olarak da önemli olduğu saptandı. 0,1 ppm' de %15,25 oranında malformasyon görülürken, 12,06 ppm' de %100 oranında malformasyon belirlendi (Tablo 4.15).

İstatistiksel analizler sonucunda kontrol grubu ile diğer uygulama dozları karşılaştırıldığında, başta gözlenen ödem bakımından 1,92, 2,50 ve 12,06 ppm boyar madde uygulamasına maruz kalan embriyolarda kontrole göre önemli oranda malformasyon bulundu ($p < 0.05$). Yine 3,25, 4,22 ve 5,49 ppm madde uygulamasına bağlı olarak, baş ödemi görülme oranı kontrol grubuna göre önemli bulundu ($p < 0.005$).

Bireylerin yolk ödemi bakımından değerlendirilmesi ile, 3,25 ppm ve 9,28 ppm boyar madde uygulamalarının kontrol grubuna göre önemli düzeyde malformasyona yol açtığı gözlemlendi ($p < 0.05$). 4,22 ppm boya uygulamasının 1 iribaşta gözün ortada gelişmesine neden olduğu saptandı. Aynı şekilde 0,2 ppm madde ile maruz kalan 1 iribaşta siklopi (tek gözlülük) görüldü. Her iki durumda da kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmadı. Çalışmamızda görülen mikroftalmi (küçük gözlülük) ve depigmentasyon bulguları da kontrol bireyleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık göstermedi.

Tablo 4.15. Astrazon kırmızı boyasının FETAX testi sonucunda malformasyon oranlarına ve malformasyon tiplerinin dağılımı üzerine etkisi

Doz(ppm)	n	nm	%m	bö	yö	go	mf	sk	ms	dp	ke
Kontrol	73	2	2,74	-	2	-	-	-	-	-	-
0,1	59	9	15,25	2	1	-	2	-	3	-	1
0,2	58	7	12,07	1	3	-	2	1	-	-	-
0,4	58	5	8,62	2	2	-	-	-	1	-	-
0,52	57	5	8,77	1	-	-	-	-	1	-	3
0,68	62	6	9,67	1	2	-	-	-	-	-	3
0,88	54	8	14,81	2	3	-	1	-	1	-	1
1,14	62	4	6,45	2	1	-	-	-	1	-	-
1,48	60	12	20	2	2	-	2	-	2	-	4*
1,92	59	13	22,03	4*	2	-	3	-	1	1	2
2,50	61	16	26,23	4*	3	-	3	-	2	-	4*
3,25	58	28	48,27	9**	7*	-	2	-	6*	1	3
4,22	53	29	54,72	6**	5	1	3	-	6**	3	5*
5,49	30	21	70	4**	-	-	1	-	8**	2	6**
7,14	6	4	66,67	-	-	-	-	-	3**	-	1
9,28	1	1	100	-	1*	-	-	-	-	-	-
12,06	2	2	100	1*	1	-	-	-	-	-	-

n: Yaşayan İribaş Sayısı, nm: Malformasyon Sayısı, bö: Başta Ödem, yö: Yolcta Ödem go: Göz Ortada, mf: Mikroftalmi, sk: Siklopiya, ms: Mikrosefali, dp: Depigmentasyon, ke: Kuyruk Eğriliği, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * p<0,05, ** p<0,005 düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemlidir.

Çeşitli dozlarda görülen mikrosefali (küçük başlılık) oranları değerlendirildiğinde, 3,25 ppm için p<0.05 düzeyinde, 4,22 ppm, 5,49 ppm ve 7,14 ppm için p<0,005 düzeyinde uygulama dozlarının kontrole göre istatistiksel olarak önemli farklılığa neden olduğu bulundu. Gözlenen diğer malformasyon tipi kuyruk eğriliğidir. Kuyruk eğriliği değerleri için kontrol grubu ile uygulama grupları karşılaştırıldığında 1,48 ppm, 2,50 ppm, 4,22 ppm için p<0.05 düzeyinde ve 5,49 ppm için p<0,005 düzeyinde istatistiksel farklılığın önemli olduğu belirlendi (Ek 1).

4.6.2. Astrazon Mavisinin Malformasyon Oranları ve Tiplerine Etkisi

Astrazon mavisiyle yapılan FETAX testi sonucunda tüm dozlarda hayatta kalan iribaş sayısı 819' dur ve bu bireylerin %39,07' sinde malformasyon görülmüştür. Çalışmamızda 0,05 ppm' de %17,33 oranında, 8,09 ppm' de ise %100 oranında malformasyon belirlenmiştir (Tablo 4.16).

Başta ödem oranı bakımından uygulama grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, 0,39 ppm, 0,55 ppm ve 6,94 ppm için p<0.05 düzeyinde ve 4,13

ppm için $p<0,005$ düzeyinde istatistiksel olarak farklılık önemli bulundu. Yolıda ödem değerleri bakımından kontrol ile uygulama grupları karşılaştırıldığında 0,55 ppm ve 1,51 ppm için $p<0,05$ ve 4,13 ppm, 5,78 ppm, 6,94 ppm için $p<0,005$ düzeyinde istatistiksel açıdan önemli farklılık bulundu.

Yapılan çalışmalarda sikloopia, ortadaki göz, depigmentasyon ve kuyruk eğriliği tipi çeşitli malformasyonlar farklı uygulama dozlarında görülmüştür fakat istatistiksel açıdan kontrol grubu ile uygulama grubu arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır. Mikroftalmi tipi malformasyon kontrol ile karşılaştırıldığında, 0,14 ppm, 0,28 ppm, 1,5 ppm için $p<0,05$ ve 0,55 ppm için $p<0,005$ düzeyinde önemli farklılık gösterdi.

Mikrosefali görülme oranı için 0,05 ppm uygulama dozunda $p<0,05$ düzeyinde istatistiksel bakımdan farklılık önemli bulunurken, 0,55 ppm, 4,13 ppm, 5,78 ppm ve 8,09 ppm uygulamalarında ise kontrole göre $p<0,005$ düzeyinde önemli bir farklılık gösterdi (Ek 2).

Tablo 4.16. Astrazon mavi boyasının FETAX testi sonucunda malformasyon oranlarına ve malformasyon tiplerinin üzerine etkisi

Doz(ppm)	n	nm	%m	bö	yö	go	mf	sk	ms	dp	ke
Kontrol	76	5	6,57	2	1	-	-	-	-	2	1
0,05	75	13	17,33	3	1	-	1	-	5*	-	3
0,10	71	9	12,68	2	4	-	2	-	1	-	-
0,14	68	21	30,88	5	5	-	4*	-	1	-	6
0,28	64	23	35,94	5	5	-	5*	-	3	1	4
0,39	64	23	35,94	7*	4	-	3	1	3	1	4
0,55	65	43	66,15	8*	6*	-	8**	-	11**	5	5
0,77	69	20	28,99	3	3	2	3	-	3	2	4
1,08	68	15	22,06	4	2	-	2	-	1	1	5
1,51	59	29	49,15	8*	7*	1	5*	-	2	2	4
2,11	50	14	28	4	3	-	2	-	-	1	4
2,95	51	15	29,41	4	3	-	3	-	2	2	1
4,13	53	37	69,81	9**	8**	-	3	1	10**	5	1
5,78	46	44	95,65	4	9**	-	-	-	29**	2	-
6,94	11	9	81,81	3*	4**	-	-	-	-	1	1
8,09	5	5	100	-	-	-	-	-	5**	-	-

n: Yaşayan İribaş Sayısı, nm: Malformasyon Sayısı, bö: Başta Ödem, yö: Yolıda Ödem go: Göz Ortada, mf: Mikroftalmi, sk: Sikloopia, ms: Mikrosefali, dp: Depigmentasyon, ke: Kuyruk Eğriliği, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p<0,05$, ** $p<0,005$ düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemlidir.

4.7. Remazol Boyalarının Malformasyon Oranları ve Malformasyon Tipleri Üzerine Etkileri (FETAX Testi)

4.7.1. Remazol Kırmızısının Malformasyon Oranları ve Tiplerine Etkisi

Remazol kırmızısı ile yapılan FETAX testi sonucunda hayatta kalan toplam 1153 iribaşda, %16,12 oranında malformasyon gözlemlendi. Remazol kırmızısının 3,33 ppm dozunda %6,58 oranında malformasyon görülürken, 2190 ppm' de ise %100 oranında malformasyon görüldü (Tablo 4.17).

Tablo 4.17. Remazol kırmızı boyasının FETAX testi sonucunda malformasyon oranlarına ve malformasyon tiplerinin dağılımı üzerine etkisi

Doz(ppm)	n	nm	%m	bö	yö	go	mf	sk	ms	dp	ke
Kontrol	80	3	3,75	1	1	-	-	-	-	-	1
3,33	76	5	6,58	1	1	-	1	-	1	-	1
5,00	78	5	6,41	1	1	-	1	-	-	-	2
7,50	76	9	11,84	2	2	-	2	1	1	-	1
11,25	75	13	17,33	3	3	-	2	-	2	1	2
16,88	77	18	23,38	4	3	-	4	-	2	1	4
25,32	77	5	6,49	1	1	-	-	-	2	-	1
37,98	76	4	5,26	1	1	-	2	-	-	-	-
56,97	77	11	14,29	3	2	-	2	-	2	-	2
85,46	70	9	12,86	2	2	-	2	-	1	1	1
128,19	73	11	15,07	1	2	-	2	-	3	1	2
192,29	74	4	5,41	-	-	-	-	-	3	-	1
288,44	72	4	5,55	-	2	-	-	-	2	-	-
432,66	69	10	14,49	1	-	-	2	1	2	2	2
648,99	57	21	36,84	4	2	-	2	2	6	3	2
973,49	59	27	45,76	4	1	-	4*	3	8**	5*	2
1460	54	16	29,63	4	5*	-	-	1	2	-	4
2190	14	14	100,00	6**	5**	-	-	-	2*	-	1

n: Yaşayan İribaş Sayısı, nm: Malformasyon Sayısı, bö: Başta Ödem, yö: Yolcta Ödem, go: Göz Ortada, mf: Mikroftalmi, sk: Siklopiya, ms: Mikrocefali, dp: Depigmentasyon, ke: Kuyruk Eğriliği, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * p<0,05, ** p<0,005 düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemlidir.

İribaşların baş ödemi bakımından 2190 ppm uygulama grubunun kontrol grubuna göre önemli düzeyde malformasyona neden olduğu gözlemlendi (p<0,005). Yolcta ödem değerleri bakımından 1460 ppm için p<0,05 ve 2190 ppm için p<0,005 düzeyinde istatistiksel açıdan farklılık önemli bulundu. Gözün ortada olma durumu ise remazol kırmızısının hiçbir uygulama dozunda görülmemiştir. Mikroftalmi tipi malformasyon

kontrol ile karşılaştırıldığında, 973,49 ppm için $p<0,05$ düzeyinde farklılık önemli bulundu. Siklopiya FETAX testi sonucunda bazı uygulama gruplarında görülmüştür, fakat elde edilen bulgular kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bir farklılık göstermedi.

Mikrosefali görülme oranı 973,49 ppm uygulama dozunda $p<0,005$ ve 2190 ppm' de ise $p<0,05$ düzeyinde önemli bulundu. Depigmentasyon değerlerine bakıldığında 973,49 ppm uygulama dozundaki oranı kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli düzeyde bulundu ($p<0,05$).

Malformasyon tiplerinden biri olan kuyruk eğriliği ise remazol kırmızısının çeşitli uygulama gruplarında görüldü fakat elde edilen bulgular kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel açıdan önemli bir farklılık göstermedi (Ek 3).

4.7.2. Remazol Mavisinin Malformasyon Oranları ve Tiplerine Etkisi

Remazol mavisıyla yapılan FETAX testi sonunda 46. gelişim evresine ulaşan toplam 798 iribaş hayatta kaldı ve iribaşlarda %26,06 oranında malformasyon görüldü. 5 ppm' de malformasyon görülme oranı %14,47 iken, 144,63 ppm' de bu oran %100 olarak belirlendi (Tablo 4.18).

Baş ödemi görülen farklı uygulama gruplarından 103,31 ppm ve 144,63 ppm' deki oranı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel açıdan önemli düzeyde bulundu ($p<0,005$). Yolk ödemi 103,31 ppm uygulama dozunda $p<0,05$ düzeyinde önemli bulunurken, 144,63 ppm' de $p<0,005$ düzeyinde önemli bulundu. Her iki uygulama grubunda baş ve yolk ödeminin yüksek oranda görüldüğü belirlendi.

Remazol mavisinin bazı dozlarında gözün ortada olma durumu görülmüştür fakat, elde edilen bulgular kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel açıdan önemli bir farklılık göstermedi. Bazı uygulama dozlarında mikroftalmi görülmüş olup bunlardan 144,63 ppm çalışma grubundaki değeri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel açıdan önemli bulundu ($p<0,05$).

Siklopiya sadece 103,31 ppm uygulama grubunda görülmüş olup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. Mikrosefalinin görüldüğü uygulama dozlarından 9,8 ppm, 13,72 ppm, 37,65 ppm, 52,71 ppm, 73,79 ppm, 103,31 ppm' deki oranları, kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak farklılığın önemli olduğu belirlendi ($p<0,05$). Depigmentasyon ve kuyruk eğriliği remazol

mavisinin çeşitli dozlarında görülmüş ancak istatistiksel açıdan kontrol grubu ile uygulama grupları arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır (Ek 4).

Tablo 4.18. Remazol mavi boyasının FETAX testi sonucunda malformasyon oranlarına ve malformasyon tiplerinin dağılımı üzerinde etkisi

Doz(ppm)	n	nm	%m	bö	yö	go	mf	sk	ms	dp	ke
Kontrol	80	4	5	-	2	-	-	-	-	1	1
5	76	11	14,47	1	3	-	2	-	3	-	2
7	77	13	16,88	3	2	2	-	-	1	1	4
9,8	73	19	26,03	2	4	1	1	-	4*	3	4
13,72	72	8	11,11	-	-	-	-	-	4*	2	2
19,21	73	15	20,55	2	4	1	3	-	-	2	3
26,89	75	10	13,33	1	1	-	1	-	3	2	2
37,65	72	15	20,83	3	3	-	2	-	5*	-	2
52,71	66	10	15,15	2	1	-	-	-	4*	1	2
73,79	75	12	16	1	2	-	-	-	7*	1	1
103,31	71	27	38,03	9**	9*	-	-	2	5*	-	2
144,63	68	68	100	31**	31**	-	4*	-	-	-	2

n:Yaşayan İribaş Sayısı, nm: Malformasyon Sayısı, bö: Başta Ödem, yö: Yolcta Ödem go: Göz Ortada, mf: Mikroftalmi, sk: Siklopiya, ms: Mikrosefali, dp: Depigmentasyon, ke: Kuyruk Eğriliği, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * p<0,05, ** p<0,005 düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemlidir.

4.8. Cibacron Boyalarının Malformasyon Oranları ve Malformasyon Tipleri Üzerine Etkileri (FETAX Testi)

4.8.1. Cibacron Kırmızısının Malformasyon Oranları ve Tiplerine Etkisi

Cibacron kırmızısıyla yapılan FETAX testi sonucunda hayatta kalan toplam 795 iribaşta %40,12 oranında malformasyon gözlemlendi. En düşük çalışma dozu olan 6,66 ppm' de %39,73 oranında malformasyon görülürken, en yüksek doz olan 864,81 ppm' de ise %66,67 oranında malformasyon görüldü (Tablo 4.19).

Baş ödemi bütün uygulama dozlarında görüldü. Üç uygulama grubu hariç, diğer dozlardaki değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklı düzeylerde önemli bulunmuştur. Bunlardan, 6,66, 15, 22,5, 50,62, 113,89, 170,83, 384,36 ve 576,34 ppm için p<0,05 düzeyinde; 10 ve 864,81 ppm için ise p<0,005 düzeyinde istatistiksel olarak farklılık kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli düzeyde bulundu.

Yolkda ödem cibacron kırmızısının bütün uygulama gruplarında gözlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 22,5 ppm, 576,54 ppm ve 864,81 ppm madde uygulamasına bağlı olarak, yolk ödemi görülme oranı istatistiksel açıdan önemli bulundu ($p<0,05$).

Gözün ortada olma durumu çeşitli uygulama dozlarında görülmüştür ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece 864,81 ppm' deki oranı istatistiksel olarak önemli çıkmıştır ($p<0,05$). Mikroftalmi tipi malformasyon ile kontrol grubu karşılaştırıldığında 15 ppm ve 33,75 ppm uygulama gruplarındaki oranlarının istatistiksel olarak farklılığın önemli olduğu gözlendi ($p<0,05$). Mikrocefali cibacron kırmızısının bütün çalışma dozlarında görülmüştür. Elde edilen bulgular kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 10 ppm, 15 ppm, 22,5 ppm, 33,75 ppm, 75,93 ppm, 113,89 ppm, 170,83 ppm, 384,36 ppm için $p<0,05$ düzeyinde; 6,66 ppm, 256,24 ppm ve 576,54 ppm için ise $p<0,005$ düzeyinde önemli farklılık gösterdi.

Depigmentasyon yine birçok uygulama konsantrasyonunda görülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 15 ppm ve 113,89 ppm için $p<0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak farklılık önemli bulundu.

Tablo 4.19. Cibacron kırmızı boyasının FETAX testi sonucunda malformasyon oranlarına ve malformasyon tiplerinin dağılımı üzerine etkisi

Doz(ppm)	n	nm	%m	bö	yö	go	mf	sk	ms	dp	ke
Kontrol	76	4	5,26	1	3	-	-	-	-	-	-
6,66	73	29	39,73	7*	6	-	3	-	9**	2	2
10	66	25	37,88	11**	7	-	-	-	4*	2	1
15	63	31	49,21	8*	7	-	5*	-	6*	4*	1
22,5	69	33	47,83	9*	11*	2	1	-	4*	2	4*
33,75	71	27	38,03	4	7	-	5*	-	6*	1	4
50,62	68	22	32,35	6*	6	2	2	-	2	1	3
75,93	63	19	30,16	5	4	1	1	-	4*	-	4*
113,89	69	31	44,93	9*	8	-	2	-	4*	4*	4*
170,83	67	21	31,34	7*	3	-	2	-	5*	1	3
256,24	70	21	30	3	4	1	1	-	8**	2	2
384,36	64	24	37,5	6*	5	2	2	-	4*	-	5*
576,54	34	24	70,59	5*	5*	1	2	-	8**	1	2
864,81	18	12	66,67	4**	3*	2*	-	-	1	-	2*

n: Yaşayan İribaş Sayısı, nm: Malformasyon Sayısı, bö: Başta Ödem, yö: Yolkta Ödem go: Göz Ortada, mf: Mikroftalmi, sk: Siklopiya, ms: Mikrocefali, dp: Depigmentasyon, ke: Kuyruk Eğriliği, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p<0,05$, ** $p<0,005$ düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemlidir.

Kuyruk eğriliği tipi malformasyon çalışılan bütün dozlarda görülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 22,5 ppm, 75,93 ppm, 113,89 ppm, 384,36 ppm ve 864,81 ppm uygulama gruplarındaki farklılık istatistiksel olarak önemli düzeyde bulundu ($p<0,05$) (Ek 5).

4.8.2. Cibacron Mavisinin Malformasyon Oranları ve Tiplerine Etkisi

Cibacron mavisinin 96 saat süren FETAX testi sonucunda hayatta kalan 802 iribaşa %49,50 oranında çeşitli tiplerde malformasyona yol açtığı gözlemlendi. Uygulama gruplarından 3,33 ppm' de %37,68 oranında, 648,62 ppm' de ise %83,33 oranında malformasyon görülmüştür (Tablo 4.20).

Baş ödemi cibacron mavisinin bütün dozlarında görülen bir malformasyon tipidir. İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde, 7,5 ppm, 11,25 ppm, 25,31 ppm, 25,31 ppm, 37,96 ppm, 85,41 ppm, 192,18 ppm, 648,62 ppm için $p<0,05$ düzeyinde ve 16,87 ppm, 56,94 ppm için $p<0,005$ düzeyinde farklılık kontrol grubuna göre önemli bulundu.

Tablo 4.20. Cibacron mavi boyasının FETAX testi sonucunda malformasyon oranlarına ve malformasyon tiplerinin dağılımı üzerine etkisi

Doz(ppm)	n	nm	%m	bö	yö	go	mf	sk	ms	dp	ke
Kontrol	74	5	6,76	2	2	-	-	-	-	1	-
3,33	69	26	37,68	7	8*	-	3	-	5*	1	2
5	62	23	37,10	5	4	1	3	-	5*	3	2
7,5	62	26	41,94	8*	4	-	2	-	9**	1	2
11,25	60	24	40	7*	7*	3	4*	-	1	2	-
16,87	67	35	52,24	11**	9*	2	5*	-	7**	1	-
25,31	69	35	50,72	10*	8	-	1	-	11**	3	2
37,96	58	33	56,90	9*	9*	2	2	-	6*	2	3
56,94	64	44	68,75	11**	11**	2	2	-	8**	2	8**
85,41	61	26	42,62	7*	8*	1	1	1	4*	1	3
128,12	62	32	51,61	6	12**	-	1	-	6*	1	6*
192,18	60	30	50	7*	9*	-	3	-	4*	2	5*
288,27	57	27	47,37	4	4	1	3	1	12**	1	1
432,41	39	26	66,67	3	4	-	-	-	15**	1	3*
648,62	12	10	83,33	3*	3*	-	-	1	3**	-	-

n: Yaşayan İribaş Sayısı, nm: Malformasyon Sayısı, bö: Başta Ödem, yö: Yolkta Ödem
go: Göz Ortada, mf: Mikroftalmi, sk: Siklopiya, ms: Mikrosefali, dp: Depigmentasyon,
ke: Kuyruk Eğriliği, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p<0,05$, ** $p<0,005$
düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemlidir.

Yolk ödemi çalışılan bütün uygulama dozlarında gözlemlendi. Elde edilen bulgular istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde, 3,33 ppm, 11,25 ppm, 16,87 ppm, 37,96 ppm, 85,41 ppm, 192,18 ppm, 648,62 ppm için $p<0,05$ düzeyinde ve 56,94 ppm, 128,12 ppm için $p<0,005$ düzeyinde farklılık, kontrol grubuna göre önemli bulundu. Cibacron mavisinin bazı dozlarında gözün ortada olma durumu görülmüştür, ancak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan farklılık önemli görülmedi.

Mikroftalmi tipi malformasyonun görüldüğü çeşitli uygulama dozları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 11,25 ppm ve 16,87 ppm için $p<0,05$ düzeyinde istatistiksel açıdan farklılık önemli bulundu. Sikloopia ve depigmentasyon tipi malformasyonlar çeşitli uygulama gruplarında görülmüştür, fakat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan farklılık önemli bulunmamıştır.

Mikrosefali cibacron mavisinin bütün dozlarında görülmüştür. Kontrol grubu ile uygulama dozları karşılaştırıldığında, 3,33 ppm, 5 ppm, 37,96 ppm, 85,41 ppm, 128,12 ppm, 192,18 ppm için $p<0,05$ düzeyinde önemli bulunurken, 7,5 ppm, 16,87 ppm, 25,31 ppm, 56,94 ppm, 288,27 ppm, 432,41 ppm, 648,62 ppm için $p<0,005$ düzeyinde istatistiksel açıdan farklılık önemli bulundu.

Kuyruk eğriliği görülen uygulama dozları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 128,12 ppm, 192,18 ppm, 432,41 ppm için $p<0,05$ düzeyinde önemli bulunurken, 56,94 ppm için $p<0,005$ düzeyinde farklılık önemli bulundu (Ek 6).

4.9. FETAX Testi Sonucunda Hayatta Kalan İribaşlar İçin Saptanan Baş-Kuyruk Uzunluk Değerleri

4.9.1. Astrazon Boyaları

4.9.1.1. Astrazon Kırmızısının İribaşların Baş-Kuyruk Uzunluk Değerlerine Etkisi

Astrazon kırmızısı ile 0,1-12,06 ppm dozları arasında çalışılan FETAX testi sonunda hayatta kalan 813 iribaşın baş-kuyruk uzunluğu ölçüldü. Bu ölçümlere göre iribaşların en az 4 mm, en çok 10,6 mm uzunluklara eriştiği saptandı. Ortalama baş-kuyruk arası uzunluklarına bakıldığında, kontrol grubu için ortalama uzunluk 9,5 mm iken, en düşük boyar madde uygulama dozu olan 0,1 ppm grubunda ortalama uzunluk 9,4 mm ve en yüksek boyar madde dozu olan 12,06 ppm uygulamasında ise 6,5 mm

olarak saptandı (Tablo 4.21). Buna göre, boyar madde uygulamasına maruz kalınan doz ile iribaşların vücut uzunluğu arasında önemli bir negatif ilişki olduğu gözlenmektedir.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda da kontrol grubunun vücut uzunluk değerleri ile diğer doz gruplarının uzunluk değerleri karşılaştırıldığında, tüm dozlar için farklılığın önemli düzeyde olduğu görülmektedir. Buna göre, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 0,1 ppm, 0,2 ppm, 0,4 ppm, 0,88 ppm uygulamaları için $p<0,05$ düzeyinde ve 0,52 ppm, 0,68 ppm, 1,48 ppm, 1,92 ppm, 2,50 ppm, 3,25 ppm, 4,22 ppm, 5,49 ppm, 7,14 ppm, 9,28 ppm, 12,06 ppm uygulamaları için ise $p<0,001$ düzeyinde farklılığın önemli düzeyde olduğu görülmektedir.

Tablo 4.21. Astrazon kırmızı uygulaması sonucunda hayatta kalan FETAX test grubu iribaşların baş-kuyruk uzunluk değerleri

Doz(ppm)	n	Minimum uzunluk(mm)	Maximum uzunluk(mm)	Ortalama uzunluk(mm)	SEM	SD
Kontrol	73	8,0	10,6	9,5	0,0552	0,4719
0,1	59	7,6	10,3	9,4*	0,0710	0,5459
0,2	58	7,6	10,3	9,3*	0,0744	0,5666
0,4	58	7,3	10,0	9,3*	0,0660	0,5032
0,52	57	7,3	10,0	9,2**	0,0641	0,4846
0,68	62	7,3	10,0	9,2**	0,0702	0,5535
0,88	54	7,3	10,0	9,3*	0,0728	0,5354
1,14	62	7,3	10,3	9,4	0,0625	0,4927
1,48	60	6,0	10,0	9,0**	0,0878	0,6806
1,92	59	7,3	10,0	9,2**	0,0713	0,5412
2,50	61	6,0	10,0	9,0**	0,1050	0,8203
3,25	58	7,3	9,6	8,9**	0,0686	0,5227
4,22	53	5,3	9,3	8,3**	0,1259	0,9166
5,49	30	4,0	9,3	7,2**	0,2184	1,1963
7,14	6	6,0	8,0	7,1**	0,2948	0,7223
9,28	1	6,0	6,0	6,0**	0,0000	0,0000
12,06	2	6,0	7,0	6,5**	0,5000	0,7071

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p<0,05$, ** $p<0,005$ düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemlidir.

4.9.1.2. Astrazon Mavisinin İribaşların Baş-Kuyruk Uzunluk Değerlerine Etkisi

Astrazon mavisi ile 0,05-8,09 ppm dozları arasında çalışılan FETAX testi sonucunda hayatta kalan kontrol dahil olmak üzere toplam 895 iribaşın baş-kuyruk uzunluğu ölçüldü. Baş-kuyruk uzunluğu ölçülen iribaşların en az 5,6 mm, en çok 10,6 mm olduğu belirlendi (Tablo 4.22).

Çalışılan bütün doz gruplarındaki iribaşların ortalama baş-kuyruk uzunluk değerleri hesaplandı. Kontrol grubunun ortalama uzunluğu 9,6 mm iken, boyar madde uygulaması yapılan gruplardan 0,05 ppm' de ortalama uzunluk 9,5 mm, 8,09 ppm' de ise iribaşların ortalama uzunluğu 7,8 mm olarak belirlendi.

Tablo 4.22. Astrazon mavi uygulaması sonucunda hayatta kalan FETAX test grubu iribaşların baş-kuyruk uzunluk değerleri

Doz(ppm)	n	Minimum uzunluk(mm)	Maximum uzunluk(mm)	Ortalama uzunluk(mm)	SEM	SD
Kontrol	76	8,0	10,6	9,6	0,0561	0,4896
0,05	75	7,6	10,6	9,5	0,0617	0,5348
0,10	71	7,6	10,6	9,5	0,0693	0,5846
0,14	68	6,0	10,3	9,5	0,0858	0,7077
0,28	64	6,6	10,3	9,3*	0,0881	0,7053
0,39	64	6,6	10,6	9,4	0,0924	0,7392
0,55	65	5,6	10,6	9,2*	0,1121	0,9046
0,77	69	6,0	10,6	9,5	0,0905	0,7525
1,08	68	6,3	10,6	9,4	0,0895	0,7388
1,51	59	7,0	10,0	9,0**	0,0838	0,6441
2,11	50	5,6	10,0	8,9**	0,1154	0,8166
2,95	51	7,6	10,0	8,9**	0,0644	0,4601
4,13	53	6,6	9,3	8,5**	0,0881	0,6414
5,78	46	6,6	8,7	8,2**	0,0781	0,5297
6,94	11	7,0	9,0	8,2**	0,1611	0,5343
8,09	5	6,6	8,3	7,8**	0,2896	0,6476

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * p<0,05, ** p<0,005 düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemlidir.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda da kontrol grubunun vücut uzunluk değerleri ile diğer doz gruplarının uzunluk değerleri karşılaştırıldığında 0,28 ppm ve 0,55 ppm için p<0,05 düzeyinde, 1,51 ppm, 2,11 ppm, 2,95 ppm, 4,13 ppm, 5,78 ppm, 6,94 ppm ve 8,09 ppm için ise p<0,001 düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemli bulundu.

4.9.2. Remazol Boyaları

4.9.2.1. Remazol Kırmızısının İribaşların Baş-Kuyruk Uzunluk Değerlerine Etkisi

Remazol kırmızısı ile yapılan FETAX testi sonucunda hayatta kalan 1233 iribaşın baş-kuyruk uzunlukları ölçüldü. Bu ölçümlerdeki en az 5,3 mm, en çok 10,3 mm uzunluklara eriştiği saptandı (Tablo 4.23). Çalışılan bütün dozlardaki ölçümlerin

ortalama değerlerine bakıldığında, kontrol grubunun ortalama baş-kuyruk uzunluk değeri 9,4 mm iken, 2190 ppm uygulama grubunda ortalama değer 6,9 mm olarak belirlendi.

Kontrol grubu ile doz grupları istatistiksel analizlerle karşılaştırılmış ve fark olup olmadığı belirlenmiştir. Buna göre 3,33 ppm ile 2190 ppm arasında çalışılan bütün dozlardaki vücut uzunluk değerlerindeki farklılığın, kontrol grubuna göre önemli düzeyde olduğu bulundu ($p < 0,001$).

Tablo 4.23. Remazol kırmızısı uygulaması sonucunda hayatta kalan FETAX test grubu iribaşların baş-kuyruk uzunluk değerleri

Doz(ppm)	n	Minimum uzunluk(mm)	Maximum uzunluk(mm)	Ortalama uzunluk(mm)	SEM	SD
Kontrol	80	7,6	10,3	9,4	0,0620	0,5551
3,33	76	7,0	10,0	9,0**	0,0640	0,5587
5	78	7,3	10,0	9,1**	0,0599	0,5297
7,5	76	6,0	10,0	8,8**	0,0760	0,6634
11,25	75	6,6	10,0	8,9**	0,0758	0,6572
16,87	77	6,6	10,0	9,1**	0,0732	0,6425
25,31	77	7,3	10,0	9,1**	0,0520	0,4563
37,96	76	6,3	10,0	9,0**	0,0556	0,4939
56,94	77	7,6	10,0	9,1**	0,0488	0,4287
85,41	70	7,0	10,0	8,9**	0,0670	0,5609
128,12	73	7,3	9,6	8,9**	0,0619	0,5291
192,18	74	7,0	9,6	8,8**	0,0514	0,4430
288,27	72	6,3	9,6	8,8**	0,0638	0,5414
432,41	69	6,6	9,6	8,7**	0,0562	0,4672
648,62	57	5,3	9,6	8,5**	0,0996	0,7522
972,93	58	5,6	9,3	8,3**	0,0835	0,6366
1460	54	7,0	8,6	8,3**	0,0496	0,3647
2190	14	5,3	7,3	6,9**	0,1513	0,5665

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemlidir.

4.9.2.2. Remazol Mavisinin İribaşların Baş-Kuyruk Uzunluk Değerlerine Etkisi

Remazol mavisile yapılan test sonucunda yaşayan toplam 878 iribaşın baş-kuyruk uzunlukları ölçüldü. Bu ölçümler sonunda en düşük değer 5,3 mm, en yüksek değerde 10,6 mm olarak belirlendi (Tablo 4.24). 5 ppm ile 144,63 ppm arasındaki ölçümlerin ortalama değerlerine bakıldığında kontrol grubunun ortalama uzunluk değeri 9,5 mm iken, 5 ppm grubunda 9,3 mm, 144,63 ppm uygulama grubunda ise ortalama uzunluk değeri 6,7 mm olarak saptandı.

Tablo 4.24. Remazol mavi uygulaması sonucunda hayatta kalan FETAX test grubu iribaşların baş-kuyruk uzunluk değerleri

Doz(ppm)	n	Minimum uzunluk(mm)	Maximum uzunluk(mm)	Ortalama uzunluk(mm)	SEM	SD
Kontrol	80	8,0	10,6	9,5	0,0609	0,5449
5	76	6,6	10,0	9,3*	0,0637	0,5558
7	77	5,3	10,3	9,3	0,0757	0,6650
9,8	73	6,6	10,0	9,1**	0,0662	0,5660
13,72	72	7,0	10,0	9,3*	0,0589	0,5004
19,21	73	5,3	10,3	9,3	0,0773	0,6610
26,89	75	7,0	10,0	9,2**	0,0549	0,4761
37,65	72	7,0	10,0	9,0**	0,0607	0,5159
52,71	66	7,0	10,0	8,9**	0,0674	0,5481
73,79	75	6,3	9,3	8,5**	0,0596	0,5162
103,31	71	5,3	9,3	8,1**	0,0733	0,6179
144,63	68	5,6	7,6	6,7**	0,0565	0,4663

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p<0,05$, ** $p<0,005$ düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemlidir.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda kontrol grubunun vücut uzunluk değerleri ile diğer doz gruplarının uzunluk değerleri karşılaştırıldığında 5 ppm, 13,72 ppm için $p<0,05$ düzeyinde ve 9,8 ppm, 26,89 ppm, 37,65 ppm, 52,71 ppm, 73,79 ppm, 103,31 ppm ve 144,63 ppm için $p<0,001$ düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemli bulundu.

4.9.3. Cibacron Boyaları

4.9.3.1. Cibacron Kırmızısının İribaşların Baş-Kuyruk Uzunluk Değerlerine Etkisi

Cibacron kırmızısıyla yapılan FETAX testi sonucunda yaşayan 867 iribaşın baş-kuyruk ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümlerden en düşük uzunluk değeri 5,3 mm, en yüksek değer ise 10,3 mm olarak saptandı (Tablo 4.25).

6,66 ppm ve 864,81 ppm dozları arasında belirlenen bütün uzunluk değerlerinin ortalamaları hesaplandı. Buna göre kontrol grubunun ortalama uzunluk değeri 9,5 mm iken, 864,81 ppm uygulama grubunun ortalama uzunluk değeri 9,0 mm olarak belirlendi.

İstatistiksel analizler sonucunda kontrol grubunun vücut uzunluk değerleri ile diğer doz gruplarının uzunluk değerleri karşılaştırıldığında tüm dozlar için farklılığın önemli düzeyde olduğu görüldü. Uygulama gruplarından 50,62 ppm için $p<0,05$

düzeyinde, diğer doz grupları için $p<0,001$ düzeyinde farklılığın önemli olduğu bulundu.

Tablo 4.25. Cibacron kırmızı uygulaması sonucunda hayatta kalan FETAX test grubu iribaşların baş-kuyruk uzunluk değerleri

Doz(ppm)	n	Minimum uzunluk(mm)	Maximum uzunluk(mm)	Ortalama uzunluk(mm)	SEM	SD
Kontrol	76	7,6	10,3	9,5	0,0736	0,6420
6,66	73	6,6	10,0	8,7**	0,0706	0,6037
10	66	6,6	10,0	9,1**	0,0648	0,5272
15	63	6,6	10,0	9,1**	0,0949	0,7539
22,5	69	6,0	10,0	9,1**	0,0871	0,7241
33,75	71	6,0	10,0	9,1**	0,0852	0,7180
50,62	68	7,0	10,3	9,3*	0,0745	0,6147
75,93	63	6,6	10,0	9,2**	0,0713	0,5667
113,89	69	5,3	10,0	9,0**	0,1023	0,8500
170,83	67	7,0	10,0	9,2**	0,0752	0,6162
256,24	70	6,6	10,0	9,2**	0,0575	0,4816
384,36	64	7,0	10,0	9,1**	0,0684	0,5480
576,54	34	6,0	10,0	9,0**	0,1162	0,6780
864,81	14	7,0	9,6	9,0**	0,1760	0,6586

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p<0,05$, ** $p<0,005$ düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemlidir.

4.9.3.2. Cibacron Mavisinin İribaşların Baş-Kuyruk Uzunluk Değerlerine Etkisi

Cibacron mavisıyla yapılan letalite testi sonucunda hayatta kalan 876 iribaşın baş-kuyruk uzunluk ölçümleri yapıldı. Buna göre iribaşların en az 4 mm, en çok 10,3 mm uzunluklarda olduğu saptandı (Tablo 4.26).

3,33 ppm ve 648,62 ppm arasındaki doz gruplarında ölçümler yapıldı ve bu ölçümlerin ortalama değerleri hesaplandı. Buna göre kontrol grubunun ortalama uzunluk değeri 9,4 mm, 3,33 ppm için ortalama uzunluk 9,0 mm, 648,62 ppm için ise 8,5 mm olarak belirlendi.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, kontrol grubu ile diğer uygulama gruplarının vücut uzunluk değerleri karşılaştırıldığında bütün dozlar için farklılığın istatistiksel açıdan önemli düzeyde olduğu bulundu ($p<0,001$).

Tablo 4.26. Cibacron mavi uygulaması sonucunda hayatta kalan FETAX test grubu iribaşların baş-kuyruk uzunluk değerleri

Doz(ppm)	n	Minimum uzunluk(mm)	Maximum uzunluk(mm)	Ortalama uzunluk(mm)	SEM	SD
Kontrol	74	7,6	10,3	9,4	0,0670	0,5764
3,33	69	7,3	10,0	9,0**	0,0676	0,5621
5	62	4,6	9,6	8,7**	0,1187	0,9348
7,5	62	5,3	9,6	8,6**	0,0994	0,7831
11,25	60	6,0	10,0	8,5**	0,1006	0,7797
16,87	67	4,0	9,3	8,6**	0,1005	0,8226
25,31	69	6,6	9,3	8,7**	0,0544	0,4522
37,96	58	5,3	10,0	8,8**	0,1052	0,8013
56,94	64	4,6	9,6	8,6**	0,1161	0,9290
85,41	61	5,0	9,6	8,7**	0,0982	0,7671
128,12	62	7,0	10,0	8,6**	0,0792	0,6243
192,18	60	6,0	10,0	8,6**	0,0831	0,6440
288,27	57	6,0	9,3	8,4**	0,0643	0,4862
432,41	39	6,0	9,3	8,3**	0,0937	0,5858
648,62	12	7,0	9,0	8,5**	0,0151	0,5231

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemlidir.

4.10. Kullanılan Tekstil Boyalarının Ortalama pH Değerleri

Araştırma süresince statik yenilemeli test düzeneği kurulmak suretiyle tekstil boyar maddelerinin *Xenopus* embriyo ve iribaşlarına etkilerinin saptanması amaçlanmış ve bu sürede iribaşlar beslenmemişlerdir. Ayrıca toksik etki ile boyar madde arasındaki ilişkinin saptanmasını amaçlayan çalışmamızda, ortamda bir pH değişiminin olup olmadığının saptanması önemlidir. Çünkü 24 saatlik aralıklarla kaplardaki boyar maddeler yenilediğinden, ortamın pH değişimi toksisiteyi etkileyen bir faktör olabilir. Bu nedenle iribaşların petriye konulmasından önce (0.saat) ve 24. saat sonunda kaplardaki madde yenilenmeden önce ortam pH' sı günlük olarak, belli aralıklardaki konsantrasyonlar için ölçülerek kaydedildi. Tablo 4.27 boyar maddeler için çeşitli doz aralıklarındaki ortalama pH değerleri ile kaplarda saptanan en düşük pH ve en yüksek pH değer aralıklarını göstermektedir. Kontrol grupları için kullanılan FETAX çözeltisinin ortalama pH değerleri 7,8 (7,76-7,84) olarak belirlenmiştir. Test edilen boyar madde konsantrasyonuna bağlı olarak, düşük ve yüksek dozlar arasında önemli düzeyde bir pH değişimi saptanmamıştır. Ayrıca 0. ve 24. saatlerde ölçülen pH değerlerine göre, statik yenilemeli ortamda pH değişiminin önemli düzeyde olmadığı da saptanmıştır. Kullanılan tüm boyar maddeler için, kontrol grubu ortamına yakın pH

değerleri ölçülmüş iken, sadece remazol mavisini için bazik bir ortamda testler yürütülmüştür.

Tablo 4.27. Araştırmada test edilen iki farklı gruptaki altı boyar madde için saptanan ortalama pH değerleri

a. Astrazon kırmızısının ortalama pH değerleri

Doz (ppm)	Ortalama pH
0,4	7,73 (7,69-7,79)
1,14	7,68 (7,65-7,74)
2,50	7,65 (7,46-7,82)
5,49	7,66 (7,58-7,75)
9,28	7,66 (7,57-7,80)
15,68	7,70 (7,58-7,87)
26,49	7,63 (7,46-7,84)

b. Astrazon mavisinin ortalama pH değerleri

Doz (ppm)	Ortalama pH
0,1	7,72 (7,69-7,75)
0,39	7,71 (7,69-7,74)
1,08	7,66 (7,55-7,80)
2,95	7,63 (7,58-7,70)
6,94	7,67 (7,62-7,75)
10	7,69 (7,58-7,83)

c. Remazol kırmızısının ortalama pH değerleri

Doz (ppm)	Ortalama pH
50	7,68 (7,60-7,75)
84,5	7,84 (7,74-8,04)
142,80	7,60 (7,52-7,71)
241,33	7,58 (7,44-7,70)
407,85	7,36 (7,27-7,47)
654,16	7,36 (7,30-7,40)
1105,53	7,09 (7,03-7,20)
1868,35	6,99 (6,91-7,10)

d. Remazol mavisinin ortalama pH değerleri

Doz (ppm)	Ortalama pH
5	8,57 (8,47-8,65)
9,8	8,54 (8,40-8,69)
19,21	8,44 (8,20-8,61)
37,65	8,54 (8,45-8,63)
73,79	8,45 (8,22-8,60)
144,63	8,49 (8,35-8,62)
283,47	8,46 (8,31-8,55)
555,6	8,2 (8,04-8,35)

e. cibacron kırmızısının ortalama pH değerleri

Doz (ppm)	Ortalama pH
10	7,78 (7,60-7,88)
22,5	7,92 (7,78-8)
50,62	7,85 (7,60-8,05)
113,89	7,76 (7,51-8,09)
256,24	7,71 (7,40-8,01)
576,54	7,75 (7,50-7,88)
1297,21	7,61 (7,39-7,90)

f. cibacron mavisinin ortalama pH değerleri

Doz (ppm)	Ortalama pH
5	7,68 (7,60-7,78)
11,25	7,83 (7,67-8,06)
25,31	7,83 (7,65-7,92)
56,94	7,77 (7,70-7,85)
128,12	7,73 (7,65-7,84)
288,27	7,83 (7,61-8,12)
648,62	7,81 (7,61-8,12)

4.11. Tekstil Boyar Maddelerine Maruz Kalan İribaşlarda Enzimatik Bulgular

4.11.1. Astrazon Boyaları

4.11.1.1. Astrazon Kırmızısı Uygulaması ile İlgili Enzimatik Bulgular

24 saat süreyle astrazon kırmızısının çeşitli dozlarına maruz kalan iribaşlar için saptanan spesifik enzim aktiviteleri Tablo 4.28' de gösterilmiştir. Çalışılan bütün dozlara bakıldığında, yüksek dozlarda çeşitli enzim aktivitesi değerlerinin kontrol grubuna göre önemli düzeyde değişim gösterdiği gözlemlendi. Varyans analizi sonuçlarına göre, kontrol grubu ile uygulama grubu karşılaştırıldığında, GST için 6 uygulama dozunda enzim aktivitesinin önemli düzeyde arttığı görülmektedir ($p<0,05$; $p<0,005$).

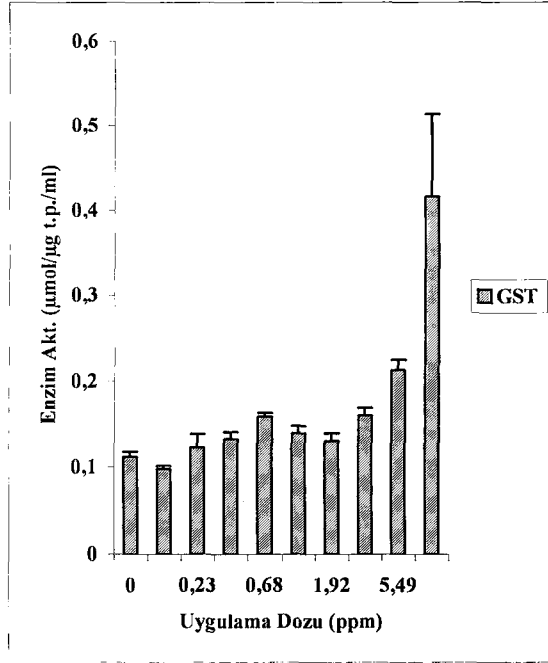
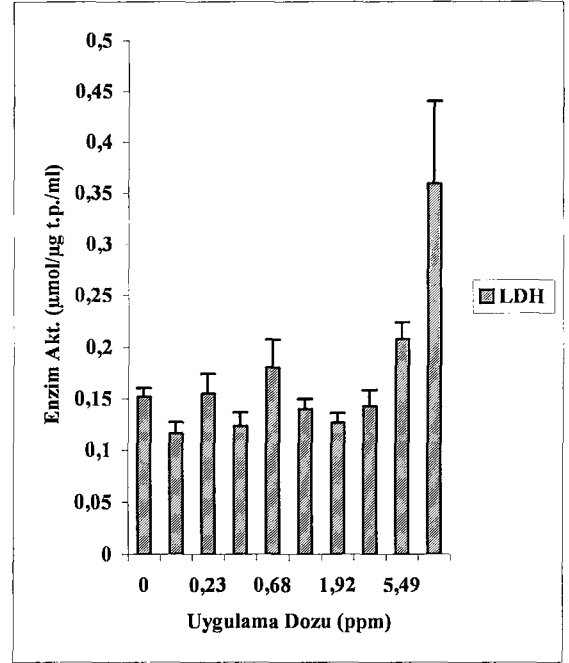
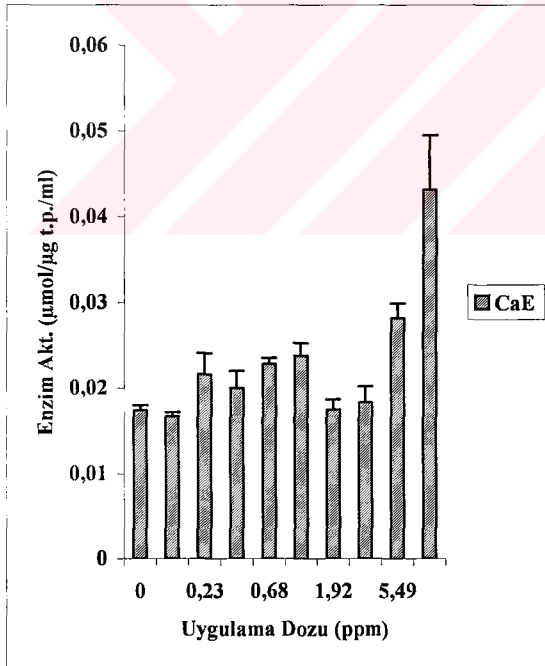
Tablo 4.28. Astrazon kırmızısı uygulamasına bağlı olarak iribaşlarda saptanan spesifik enzim aktiviteleri

Uygulama Dozu (ppm)	n	Enzim Aktivitesi ($\mu\text{mol}/\mu\text{g t.p./ml}$)		
		GST($\pm\text{SEM}$)	LDH($\pm\text{SEM}$)	CaE($\pm\text{SEM}$)
Kontrol	6	0,1122 \pm 0,0060	0,1514 \pm 0,0092	0,0174 \pm 0,0006
0,1	6	0,0981 \pm 0,0041	0,1164 \pm 0,0110*	0,0167 \pm 0,0005
0,23	6	0,1231 \pm 0,0152	0,1545 \pm 0,0198	0,0216 \pm 0,0025
0,4	6	0,1329 \pm 0,0081*	0,1235 \pm 0,0129	0,0200 \pm 0,0020
0,68	6	0,1588 \pm 0,0048**	0,1805 \pm 0,0268	0,0228 \pm 0,0007**
1,14	6	0,1391 \pm 0,0089*	0,1400 \pm 0,0101	0,0238 \pm 0,0015*
1,92	6	0,1300 \pm 0,0090	0,1269 \pm 0,0092	0,0175 \pm 0,0012
3,25	6	0,1606 \pm 0,0089**	0,1432 \pm 0,0151	0,0183 \pm 0,0019
5,49	6	0,2133 \pm 0,0119**	0,2078 \pm 0,0162**	0,0282 \pm 0,0017**
7,14	6	0,4167 \pm 0,0968**	0,3593 \pm 0,0812**	0,0431 \pm 0,0064**

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p<0,05$, ** $p<0,005$ düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemlidir.

Laktat dehidrogenaz aktivitesi için gruplar arasında uygulanan varyans analizi sonuçlarına göre, üç farklı dozdaki enzim aktivitesinin kontrol grubu iribaşlara göre önemli düzeyde farklılık gösterdiği saptandı ($p<0,05$; $p<0,005$).

CaE enziminin spesifik aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırılmış olup, 0,68, 5,49 ve 7,14 ppm dozlarında $p<0,005$ düzeyinde, 1,14 ppm uygulamasında ise $p<0,05$ düzeyinde artışın önemli olduğu bulundu (Şekil 4.1).

A**B****C**

Şekil 4.1. Astrazon kırmızısına maruz kalan iribaşlarda spesifik enzim aktiviteleri
A. GST, B. LDH, C. CaE

4.11.1.2. Astrazon Mavisi Uygulaması ile İlgili Enzimatik Bulgular

Astrazon mavisi etkisine maruz bırakılan *Xenopus* iribaşları için saptanan spesifik enzim aktivitesi değerleri Tablo 4.29' da verilmiştir. Madde uygulamasına bağlı olarak tüm gruplarda GST aktivitesinin arttığı saptandı. Uygulama gruplarındaki GST aktivitesi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 0,05, 0,39 ve 0,77 ppm için $p<0,05$ düzeyinde, 0,2 ppm dozunda ise $p<0,005$ düzeyinde artışın istatistiksel olarak önemli düzeyde olduğu bulundu.

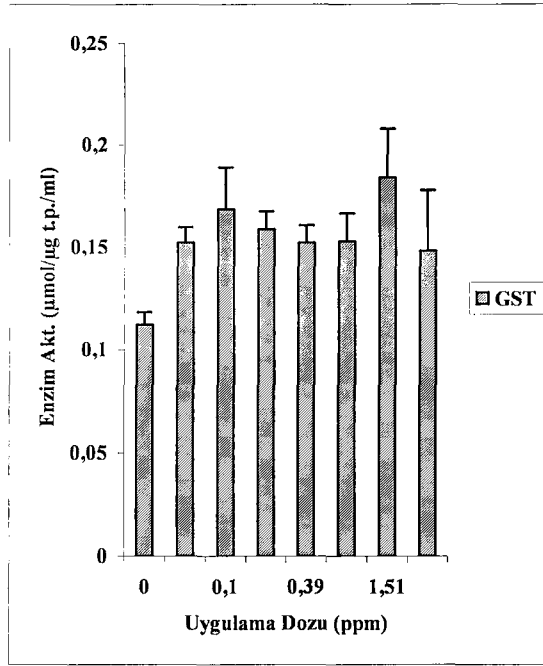
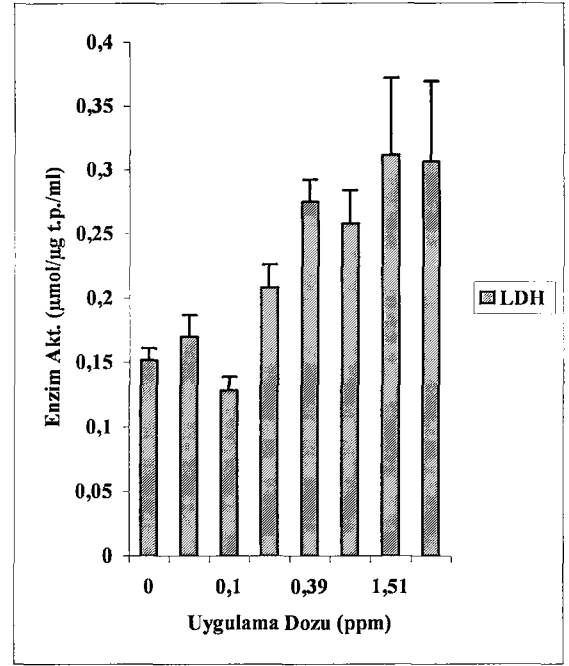
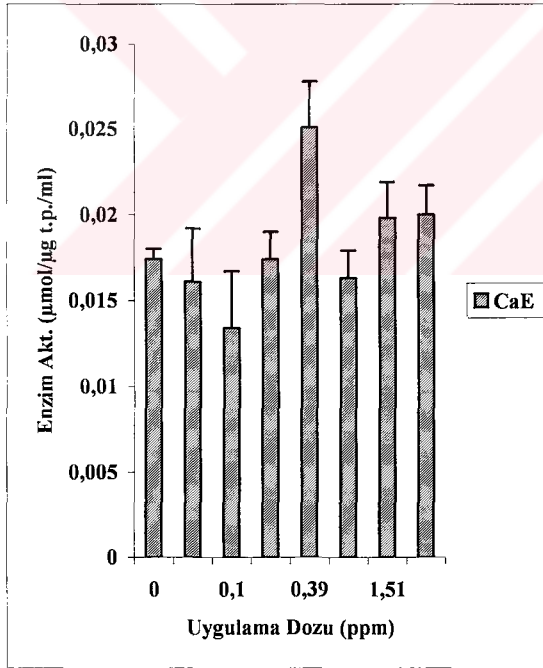
LDH aktivitesinin kontrol grubu ile karşılaştırılan uygulama gruplarında 0,2 ppm ve 1,51 ppm dozlarında $p<0,05$ düzeyinde, 0,39 ve 0,77 ppm dozlarında ise $p<0,005$ düzeyinde artışın önemli olduğu saptandı.

CaE aktivitesi için, enzimin spesifik aktivite değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, uygulama gruplarında enzim aktivitesinin önemli düzeyde değişmediği bulundu.

Tablo 4.29. Astrazon mavisi etkisine maruz kalan iribaşlarda spesifik enzim aktiviteleri

Uygulama Dozu (ppm)	n	Enzim Aktivitesi ($\mu\text{mol}/\mu\text{g t.p./ml}$)		
		GST($\pm\text{SEM}$)	LDH($\pm\text{SEM}$)	CaE($\pm\text{SEM}$)
Kontrol	6	0,1122 \pm 0,0060	0,1514 \pm 0,0092	0,0174 \pm 0,0006
0,05	6	0,1522 \pm 0,0075*	0,1696 \pm 0,0173	0,0161 \pm 0,0031
0,1	6	0,1685 \pm 0,0207	0,1282 \pm 0,0104	0,0134 \pm 0,0033
0,2	6	0,1589 \pm 0,0088**	0,2083 \pm 0,0180*	0,0174 \pm 0,0016
0,39	6	0,1524 \pm 0,0084*	0,2751 \pm 0,0177**	0,0251 \pm 0,0027
0,77	6	0,1528 \pm 0,0138*	0,2584 \pm 0,0257**	0,0163 \pm 0,0016
1,51	6	0,1840 \pm 0,0241	0,3118 \pm 0,0600*	0,0198 \pm 0,0021
2,95	6	0,1483 \pm 0,0295	0,3067 \pm 0,0629	0,0200 \pm 0,0017

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p<0,05$, ** $p<0,005$ düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemlidir.

A**B****C**

Şekil 4.2. Astrazon mavisine maruz kalan iribaşlarda spesifik enzim aktiviteleri
A. GST, B. LDH, C. CaE

4.11.2. Remazol Boyaları

4.11.2.1. Remazol Kırmızısı Uygulaması ile İlgili Enzimatik Bulgular

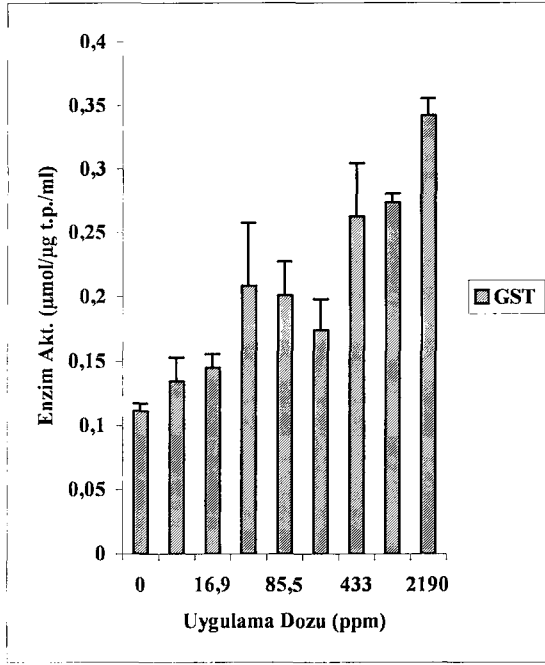
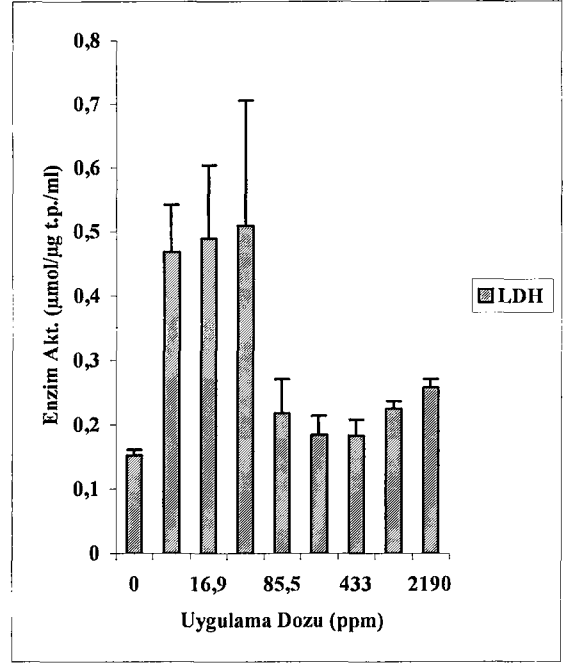
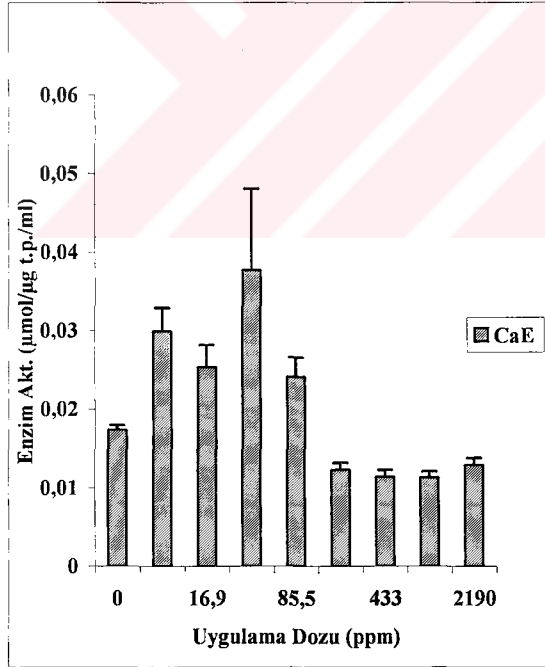
Remazol kırmızısı uygulamasına bağlı olarak saptanan enzim aktivitesi sonuçları Tablo 4.30' da verilmiştir. *Xenopus* iribaşlarında GST aktivitesinin tüm konsantrasyonlarda arttığı saptandı. Kontrol grubu ile uygulama grupları karşılaştırıldığında 7,5 ppm ve 37,98 ppm uygulama grupları hariç, tüm gruplarda enzim aktivitesinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı bulundu ($p<0,05$; $p<0,005$).

Tablo 4.30. Remazol kırmızısı uygulamasına bağlı olarak iribaşlarda saptanan spesifik enzim aktiviteleri

Uygulama Dozu (ppm)	n	Enzim Aktivitesi ($\mu\text{mol}/\mu\text{g tp/ml}$)		
		GST($\pm\text{SEM}$)	LDH($\pm\text{SEM}$)	CaE($\pm\text{SEM}$)
Kontrol	6	0,1112 \pm 0,0060	0,1514 \pm 0,0092	0,0174 \pm 0,0006
7,5	6	0,1342 \pm 0,0186	0,4688 \pm 0,0735**	0,0229 \pm 0,0030
16,88	6	0,1449 \pm 0,0103*	0,4896 \pm 0,1147*	0,0253 \pm 0,0029*
37,98	6	0,2081 \pm 0,0498	0,5096 \pm 0,1967	0,0377 \pm 0,0104
85,46	6	0,2007 \pm 0,0266*	0,2181 \pm 0,0526	0,0241 \pm 0,0025*
192,29	6	0,1738 \pm 0,0242*	0,1838 \pm 0,0299	0,0123 \pm 0,0009**
432,66	6	0,2628 \pm 0,0419**	0,1831 \pm 0,0246	0,0114 \pm 0,0009**
973,49	6	0,2737 \pm 0,0069**	0,2249 \pm 0,0122**	0,0113 \pm 0,0008**
2190,34	6	0,3421 \pm 0,0137**	0,2579 \pm 0,0132**	0,0129 \pm 0,0009*

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p<0,05$, ** $p<0,005$ düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemlidir.

LDH aktivitesinin, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında uygulama gruplarında arttığı saptandı. Bu artış, 16,88 ppm uygulama dozunda $p<0,05$ düzeyinde, 7,5 ,973,49 ve 2190 ppm dozlarında ise $p<0,005$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli düzeyde bulundu. CaE aktivitesi için kontrol grubuyla uygulama grupları karşılaştırıldığında ve 16,88, 85,46 ve 2190 ppm için $p<0,05$ düzeyinde, 192,29, 432,66, 973,49 ppm için ise $p<0,005$ düzeyinde farklılığın istatistiksel açıdan önemli olduğu bulundu (Şekil 4.3).

A**B****C**

Şekil 4.3. Remazol kırmızısına maruz kalan iribaşlarda spesifik enzim aktiviteleri
A. GST, B. LDH, C. CaE

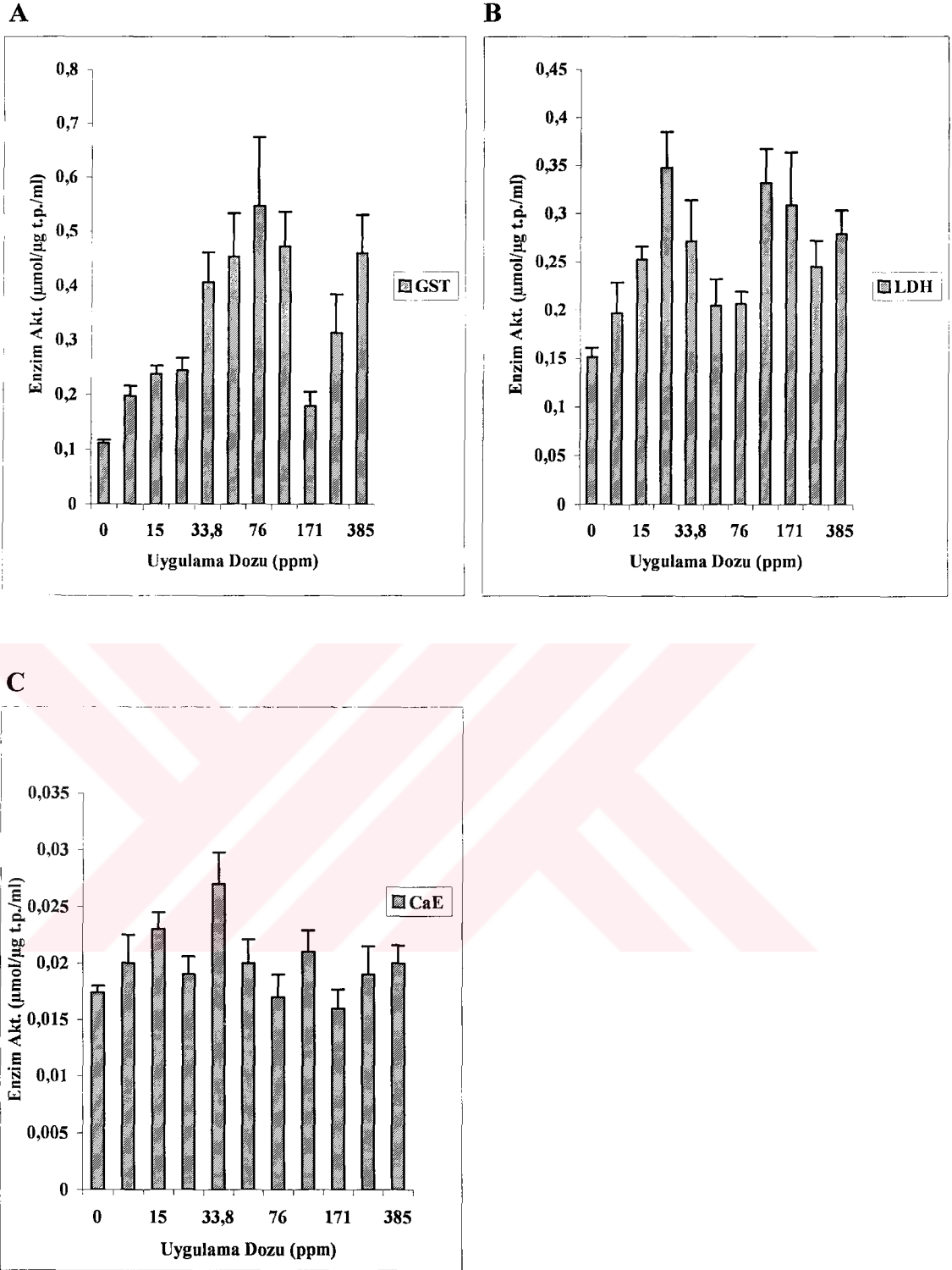
4.11.2.2. Remazol Mavisi Uygulaması İle İlgili Enzimatik Bulgular

Remazol mavisi etkisine maruz kalan iribaşlarda GST aktivitesinin kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucu, tüm dozlar için sonuç istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$; $p<0,005$). Bulgularımıza göre, tüm uygulama gruplarındaki enzim aktivitesi değerleri kontrole göre önemli düzeyde artış göstermiştir (Tablo 4.31).

Tablo 4.31. Remazol mavisi etkisine maruz kalan iribaşlarda spesifik enzim aktiviteleri

Uygulama Dozu (ppm)	n	Enzim Aktivitesi ($\mu\text{mol}/\mu\text{g t.p./ml}$)		
		GST ($\pm\text{SEM}$)	LDH($\pm\text{SEM}$)	CaE($\pm\text{SEM}$)
Kontrol	6	0,1112 \pm 0,0060	0,1514 \pm 0,0092	0,0174 \pm 0,0006
10	6	0,1965 \pm 0,0190**	0,1949 \pm 0,0320	0,0200 \pm 0,0025
15	6	0,2380 \pm 0,0149**	0,2525 \pm 0,0130**	0,0230 \pm 0,0015*
22,5	6	0,2439 \pm 0,0224**	0,3474 \pm 0,0373*	0,0190 \pm 0,0016
33,75	6	0,4064 \pm 0,0555**	0,2713 \pm 0,0426*	0,0270 \pm 0,0028**
50,63	6	0,4531 \pm 0,0802**	0,2045 \pm 0,0275	0,0200 \pm 0,0021
75,95	6	0,5462 \pm 0,1278**	0,2064 \pm 0,0127**	0,0170 \pm 0,0020
113,95	6	0,4721 \pm 0,0643**	0,3313 \pm 0,0359**	0,0210 \pm 0,0019
170,90	6	0,1791 \pm 0,0252*	0,3087 \pm 0,0550*	0,0160 \pm 0,0017
256,35	6	0,3131 \pm 0,0705**	0,2452 \pm 0,0268**	0,0190 \pm 0,0025
384,53	6	0,4594 \pm 0,0710**	0,2785 \pm 0,0251**	0,0200 \pm 0,0016**

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p<0,05$, ** $p<0,005$ düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemlidir.



Şekil 4.4. Remazol mavisine maruz kalan iribaşlarda spesifik enzim aktiviteleri
A. GST, B. LDH, C. CaE

Remazol mavisi etkisine maruz kalan iribaşlar için tüm uygulama dozlarındaki LDH aktivitesi değeri kontrole göre daha yüksektir. Enzim spesifik aktivite değerlerinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 10,0 ppm ve 50,63 ppm dozları hariç, diğer gruplarda istatistiksel olarak önemli düzeyde farklı olduğu görülmektedir ($p<0,05$; $p<0,005$).

15 ppm dozundaki CaE spesifik enzim aktivitesi bakımından $p<0,05$ düzeyinde, 33,75 ve 384,53 ppm uygulamalarında ise $p<0,005$ düzeyinde kontrole göre önemli düzeyde farklılık gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.4).

4.11.3. Cibacron Boyaları

4.11.3.1. Cibacron Kırmızısı Uygulaması İle İlgili Enzimatik Bulgular

Cibacron kırmızısı etkisine maruz kalan iribaşlar için saptanan enzim aktivitesi değerleri Tablo 4.32' de sunulmuştur.

Tablo 4.32. Cibacron kırmızısına maruz kalan iribaşlarda spesifik enzim aktiviteleri

Uygulama Dozu (ppm)	n	Enzim Aktivitesi ($\mu\text{mol}/\mu\text{g t.p./ml}$)		
		GST($\pm\text{SEM}$)	LDH($\pm\text{SEM}$)	CaE($\pm\text{SEM}$)
Kontrol	6	0,1112 \pm 0,0060	0,1514 \pm 0,0092	0,0174 \pm 0,0006
10	6	0,0586 \pm 0,0039**	0,1838 \pm 0,0221	0,0108 \pm 0,0014*
22,5	6	0,0550 \pm 0,0032**	0,2539 \pm 0,0261*	0,0132 \pm 0,0012*
50,62	6	0,0515 \pm 0,0047**	0,1367 \pm 0,0148	0,0127 \pm 0,0006**
113,89	6	0,0656 \pm 0,0034**	0,1760 \pm 0,0267	0,0200 \pm 0,0027
256,24	6	0,0645 \pm 0,0036**	0,2208 \pm 0,0534	0,0233 \pm 0,0026*
576,54	6	0,0705 \pm 0,0114*	0,3708 \pm 0,0424*	0,0376 \pm 0,0053
1297,21	6	0,0781 \pm 0,0069*	0,2848 \pm 0,0854	0,0348 \pm 0,0023**

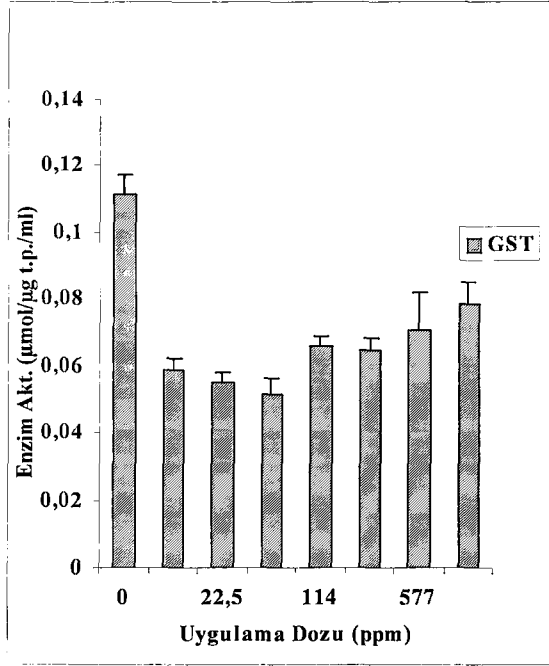
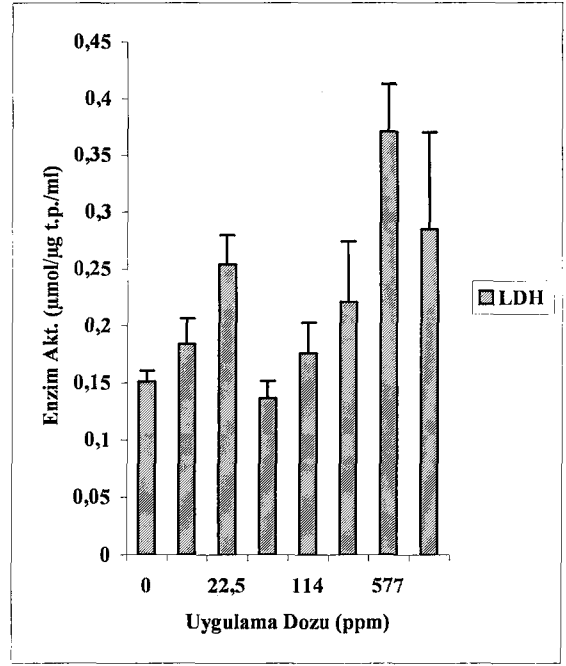
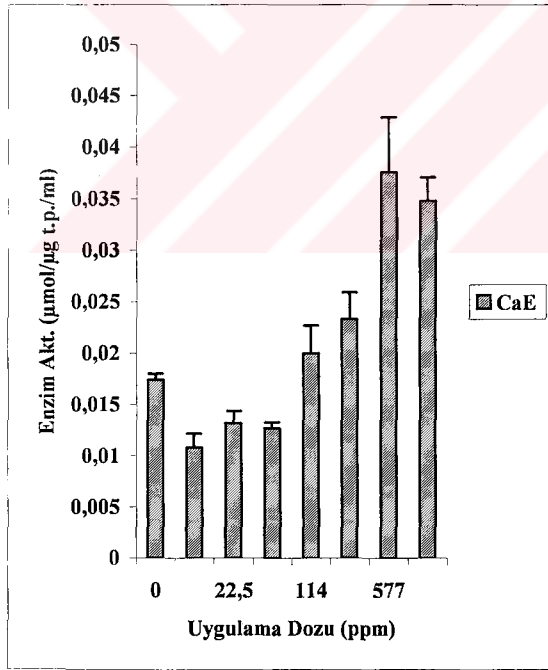
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p<0,05$, ** $p<0,005$ düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemlidir.

GST enzimi spesifik aktivite değerlerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda, tüm uygulama gruplarındaki farklılığın önemli düzeyde olduğu görülmektedir ($p<0,05$; $p<0,005$).

LDH enzim aktivite değerleri için ise 50,62 ppm uygulaması hariç, tüm boya uygulamalarında artış kaydedildi. Bu bulguların kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda 22,5 ve 576,54 ppm için $p < 0,05$ düzeyinde artışın önemli düzeyde olduğu bulundu.

CaE enziminin spesifik aktivite bulgularına göre, 10, 22,5 ve 256,24 uygulama gruplarında $p < 0,05$ düzeyinde, 50,62 ve 1297,21 ppm uygulamalarında ise $p < 0,005$ düzeyinde farklılığın kontrol grubuna göre önemli olduğu saptandı (Şekil 4.5).



A**B****C**

Şekil 4.5. Cibacron kırmızısına maruz kalan iribaşlarda spesifik enzim aktiviteleri
A. GST, B. LDH, C. CaE

4.11.3.2. Cibacron Mavisı Uygulaması İle İlgili Enzimatik Bulgular

Cibacron mavisine maruz kalan *Xenopus* iribaşları için GST enzimi aktivitesinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 25,31 ve 648,12 ppm uygulama gruplarındaki farklılığın istatistiksel olarak önemli düzeyde olduğu görülmektedir ($p<0,005$).

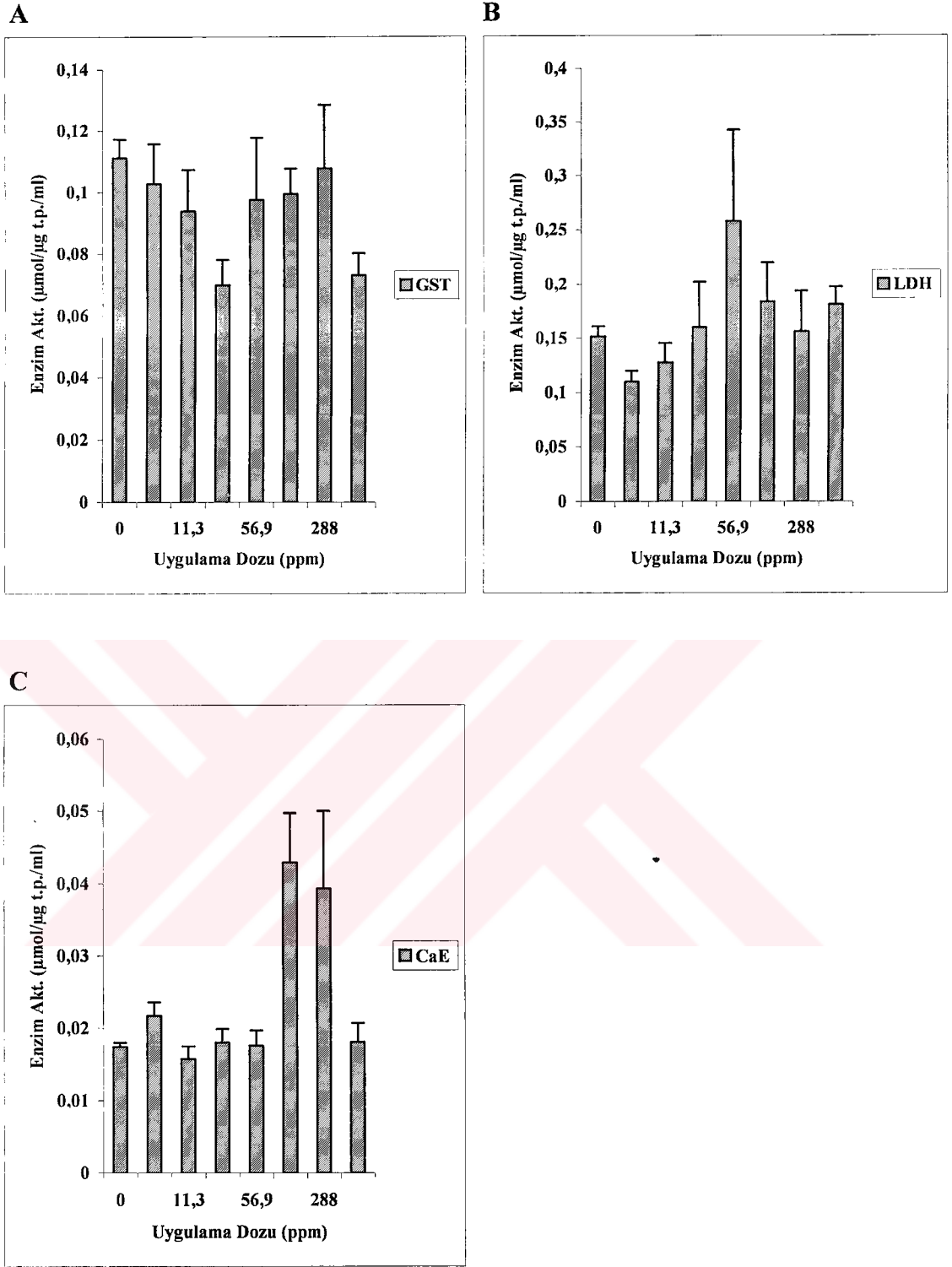
LDH enzim için spesifik aktivite değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 5 ppm uygulamasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli düzeyde bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.33).

CaE enziminin spesifik aktivitesi ölçülerek bulgular kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sadece 128,12 ppm uygulama grubundaki değişimin istatistiksel olarak önemli düzeyde olduğu saptandı ($p<0,005$) (Şekil 4.6).

Tablo 4.33. Cibacron mavisı etkisine maruz kalan iribaşlarda spesifik enzim aktiviteleri

Uygulama Dozu (ppm)	n	Enzim Aktivitesi ($\mu\text{mol}/\mu\text{g t.p./ml}$)		
		GST($\pm\text{SEM}$)	LDH($\pm\text{SEM}$)	CaE($\pm\text{SEM}$)
Kontrol	6	0,1112 \pm 0,0060	0,1514 \pm 0,0092	0,0174 \pm 0,0006
5	6	0,1027 \pm 0,0130	0,1099 \pm 0,0098*	0,0217 \pm 0,0019
11,25	6	0,0938 \pm 0,0136	0,1274 \pm 0,0179	0,0157 \pm 0,0018
25,31	6	0,0700 \pm 0,0081**	0,1599 \pm 0,0417	0,0180 \pm 0,0019
56,94	6	0,0975 \pm 0,0203	0,2577 \pm 0,0849	0,0176 \pm 0,0021
128,12	6	0,0994 \pm 0,0083	0,1835 \pm 0,0361	0,0429 \pm 0,0068**
288,27	6	0,1077 \pm 0,0207	0,1560 \pm 0,0372	0,0393 \pm 0,0107
648,12	6	0,0730 \pm 0,0072**	0,1807 \pm 0,0168	0,0181 \pm 0,0026

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında * $p<0,05$, ** $p<0,005$ düzeyinde farklılık istatistiksel olarak önemlidir.



Şekil 4.6. Cibacron mavisine maruz kalan iribaşlarda spesifik enzim aktiviteleri
A. GST, B. LDH, C. CaE

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, tekstil sanayiinde yaygın olarak kullanılan bazı boyar maddelerin toksik etkilerinin, sucul test organizması olarak yaygın şekilde kullanılan *Xenopus laevis* üzerine etkileri araştırılmıştır. *Xenopus* embriyoları üzerinde çeşitli tekstil boyar maddelerinin toksik etkileri popüler bir yöntem olan FETAX testi ile belirlenmiştir. Ayrıca *Xenopus* iribaşlarında da çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Çevresel kirlenmenin etkilerini göstermek için iki yaşam döngüsü nedeniyle amfibilerin duyarlı organizmalar olduğu, hem karasal hem de sucul çevrede kirliliğin saptanması yönünde amfibilerin önem taşıdığı belirtilmektedir [143]. U.S. EPA' nın hazırladığı bir rapora göre, çeşitli toksik maddelerin test edilmesi amacıyla kurbağa iribaşlarının kullanılması, sucul ekosistemde yaşayan organizmalara etkisinin saptanması açısından önem taşımaktadır [136].

Xenopus embriyoları çevresel kirleticilerin organizmalar üzerindeki etkilerini tarama testi olarak birçok avantajlara sahiptir. Bu embriyolar memeli embriyoları ile aynı gelişim süreçlerini izleyen klasik bir test hayvanı olup, diğer kurbağalardan farklı olarak laboratuvarında cansız yemle beslenebilmekte, gerektiği anda embriyo elde edilebilmekte, döllenme vücut dışında gerçekleşmekte, embriyonik gelişme saate bağlı olarak standardize edildiğinden farklı gelişim evrelerinde gözlenen malformasyonlar hayvanı tahrip etmeden kolayca incelenebilmektedir [32,33].

Araştırma sonuçlarına göre, test materyali olarak kullandığımız iki farklı kimyasal gruptaki astrazon boyasının *Xenopus* embriyoları ve iribaşlarının farklı gelişim evreleri üzerinde toksik etkiye sahip oldukları görülmektedir. Her iki boya ile yapılan FETAX testi sonuçlarına bakıldığında, doz ile orantılı olarak özellikle yüksek dozlarda ölüm oranlarında artış gözlenmiştir. FETAX testi sonucunda hayatta kalan iribaşlar için hesaplanan EC50, Tİ ve MCİG değerlerinde farklılıklar bulunmaktadır. Ancak bir azo boyası olan astrazon kırmızı ve bir fitallosiyanin olan astrazon mavisinin LC50 değerleri sırası ile 4,7 ve 4,9 olarak hesaplanmış olup, birbirine oldukça yakın değerler olduğundan, öldürücü etki düzeyleri benzerdir. LC50 değerlerinin çok düşük düzeylerde bulunması ile, bu boyalar amfibi iribaşları için yüksek toksik etkiye sahip maddeler olarak değerlendirilebilir. Ortalama etkili konsantrasyon değerlerine (EC50) bakıldığında, astrazon mavisinin daha düşük konsantrasyonlarda etkili olduğu ve dolayısıyla teratojenite indeksi değerine göre şiddetli teratojen grubuna dahil olduğu da görülmektedir. Bu durumda, astrazon mavisinin çevresel açıdan daha yüksek bir riske

sahip olduğunu söyleyebiliriz. Bulgularımıza göre, astrazon kırmızısı da teratojen bir madde olarak belirlenmiştir. Astrazon mavisi ile karşılaştırıldığında ise bunun daha zayıf teratojen grubuna dahil olduğu görülmektedir. Literatür verilerine göre, her iki boyar madde için yapılmış olan risk analizi değerlendirmelerinde, astrazon kırmızısı için sıçanlarda belirlenmiş akut oral LD50 değerinin 1400 mg/kg ve astrazon mavisi için ise 206 mg/kg olduğu rapor edilmektedir. Ayrıca, zebra balıklarında yapılan toksisite testleri ile NOEC değerleri her iki boya için sırasıyla 1-10 mg/L ve 10-100 mg/L olarak verilmiştir. Bu bulgular ile deneylerimizde elde edilen LC50 verileri karşılaştırıldığında, boyar maddelerin *Xenopus* embriyoları için oldukça toksik olduğu görülmektedir. Sıçan deneyleri sonucuna bağlı olarak, verilen raporlar ile bu maddeler düşük düzeyde çevresel riske sahip ajanlar olarak kategorize edilmiş iken, çalışmamız sonucunda hem öldürücü konsantrasyon düzeylerini dikkate alarak, hem de bu boyar maddelerin ASTM standartlarına göre teratojen maddeler olarak tanımlanması nedeniyle, çevresel açıdan riskli ksenobiotikler olduğu ifade edilebilir.

Diğer taraftan, bu her iki boyar madde için düzenlenmiş olan raporlarda, sıçanlar için bir fitalloşyanin boyası olan astrazon mavisinin, azo boyası olan astrazon kırmızısından daha toksik olduğuna ilişkin veriler, *Xenopus* embriyoları ile elde ettiğimiz bulgularımız ile uyumaktadır. Ayrıca, Doğan [20] tarafından *Bufo viridis* iribaşları üzerinde yapılan çalışmanın bulguları ile de bulgularımız paralellik göstermektedir. Astrazon kırmızısının maviye göre daha düşük düzeyde toksik çıkmasının nedeni, astrazon kırmızısının suda daha kolay çözünebilen, dolayısıyla daha kolay metabolize edilebilen bir boya olmasına bağlanabilir.

Xenopus iribaşlarının 96 saat süreyle boyar madde etkisine maruz kalmaları morfolojik olarak önemli bozukluklara neden olmuştur. Uygulama dozlarının artışına bağlı olarak, iribaşlarda gelişimin yavaşladığı ve yüksek dozlarda vücut büyüklüklerinde belirgin bir gerileme olduğu bulunmuştur. Büyümeyi inhibe eden en düşük konsantrasyon değeri (MCİG) astrazon kırmızısı ve mavisi için sırasıyla 0,1 ppm ve 0,28 ppm gibi değerlerle, inhibisyonun çok düşük dozlarda başladığını göstermektedir. Bu sonuçlar, astrazon boyalarının iribaş büyüme ve gelişmelerinde gösterdiği olumsuz etkinin ne kadar yüksek olduğuna da işaret edebilir.

Astrazon kırmızısı ve mavisine maruz kalan iribaşlarda gözlenen malformasyon oranları da EC50 ve Tİ değerlerine paralellik göstermiştir. Astrazon kırmızısı ile yapılan test sonucunda %22,97 oranında malformasyon görülürken, astrazon mavisinde %39,07 oranında malformasyon görülmüştür. Böylece iribaşlar üzerinde astrazon mavisinin

olumsuz etkisinin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Malformasyon oranlarını belirlemek için incelediğimiz bütün parametreler farklı oranlarda olmak üzere, iki astrazon grubuna maruz kalan iribaşlarda görülmüştür. Astrazon mavisine yüksek dozlarda maruz kalan gruplarda mikrosefalinin oldukça fazla oranda görülmesi dikkat çekici bir durumdur.

Xenopus iribaşlarında 7 gün süren subakut toksisite testleri sonucunda astrazon kırmızısı ve mavisine bağlı ölüm oranları için %82 ve %81 ile birbirine yakın değerler elde edilmiştir. 46. gelişim evresindeki iribaşlar için 24., 72. ve 168. saatlerdeki LC50 değerlerine bakıldığında, her iki astrazon grubu için 24. saatten 168. saate doğru azalan konsantrasyon değerleri bulunmuştur. Bu durum, doz-yanıt ilişkisi bakımından beklenen bir sonuçtur. Astrazon kırmızısı ve mavisi için LC50 değerlerini karşılaştırdığımızda astrazon mavisine maruz kalma sonucu hesaplanan LC50 değerlerinin astrazon kırmızısına maruz kalanlara göre daha düşük olduğu görülmektedir. Bu da, astrazon mavisinin iribaşlar üzerinde daha toksik olduğunu gösterebilir. Bu durum FETAX testine bağlı bulgularımız ile de paraleldir. Doğan [20] tarafından yapılan çalışmayla, *Bufo viridis* iribaşlarının farklı gelişim evrelerinde astrazon boyalarının toksik etkileri araştırılmış ve dört farklı astrazon boyası arasında astrazon mavisinin en yüksek toksik etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada embriyonik evredeki toksisite değerleri ile, 46. gelişim evresindeki değerler karşılaştırıldığında da iribaşlar için 46. evrede 72. saat sonunda elde edilen LC50 değerlerinin, FETAX testi için 96. saat sonunda elde edilen LC50 değerlerinden daha düşük konsantrasyonda ortaya çıkması, gelişiminin ilerlemesine bağlı olarak, amfibi iribaşlarında boyar madde toksisitesine duyarlılığın artmakta olduğunu göstermektedir. Bu durum amfibilerin, metamorfozun ileri evrelerinde, ksenobiotiklere karşı duyarlılığının arttığını düşündürmektedir.

Enzim aktivitesi ile ilgili bulgulara göre, astrazon kırmızısı için, GST aktivitesinin yüksek dozlarda artış gösterdiği gözlenmiştir. Bu aktivite artışının özellikle 0,4 ppm uygulama dozundan itibaren kontrol grubuna göre önemli düzeyde olduğu saptanmıştır. Astrazon mavisi için madde uygulamasına bağlı olarak tüm gruplarda GST aktivitesinin arttığı bulunmuştur ve dört uygulama grubunda bu artışın kontrol grubuna göre önemli düzeyde olduğu gözlenmiştir. GST' nin detoksifikasyon sisteminde önemli rolü olduğu bilinmektedir [1]. Bu artışının, boyar maddelerin toksik etkilerini azaltmak amacıyla yönelik olarak organizmanın geliştirdiği bir savunma mekanizması olduğu düşünülebilir. Literatür verilerine göre, *Xenopus* embriyolarının insektisit uygulamasına maruz kalmasının da GST aktivitesinde önemli bir artışa yol açtığı saptanmıştır [133].

Bu nedenle, boyar maddeler ile ortaya çıkan toksik etkiye karşı da benzer bir mekanizmanın geliştirildiği düşünülmektedir.

LDH aktivitesi için astrazon kırmızısının üç farklı dozundaki enzim aktivitesinin kontrol grubu iribaşlara göre önemli düzeyde farklılık gösterdiği saptanmıştır. Astrazon mavisi ile çalışılan gruplarda LDH aktivitesi kontrol gruplarıyla farklılık göstermiştir ve dört farklı doz grubundaki LDH aktivitesindeki artışın önemli düzeyde olduğu bulunmuştur.

Astrazon kırmızısı için CaE enziminin spesifik aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve 4 grupta aktivitedeki artışın önemli olduğu görülmüştür. Astrazon mavisi için enzimin spesifik aktivite değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, uygulama gruplarında enzim aktivitesinin önemli düzeyde değişmediği bulunmuştur.

Yine iki farklı kimyasal gruba ait remazol boyar maddeleri ile yapılan embriyonal toksisite testleri bulgularına göre, remazol kırmızısı ve mavisi için embriyolardaki ölüm oranları %14,38 ve %31,41 olarak belirlenmiştir. Bu değerler remazol mavisinin embriyolar üzerinde daha fazla toksik etki oluşturduğuna işaret edebilir. FETAX testi sonunda hesaplanan LC50, EC50, Tİ ve MCİG değerlerinin remazol kırmızısı ve mavisi için birbirlerinden farklı değerlerde olduğu görülmüştür. Remazol kırmızısı için saptanan LC50 ve EC50 değerleri remazol mavisi için saptanan değerlere göre oldukça yüksektir. Dolayısıyla remazol kırmızısı için hesaplanan Tİ değeri de maviye göre daha düşük bir değerde bulunduğundan, remazol kırmızısının zayıf teratojen etkiye sahip olduğu ifade edilebilir. Remazol mavisi ise orta şiddetli teratojen olarak nitelendirilmiştir. Sonuç olarak, remazol mavisinin teratojenitesinin daha yüksek bulunmasından dolayı, remazol kırmızısına göre daha toksik olduğu söylenebilir.

Literatür bilgilerine göre, her iki boyar madde için belirlenen toksisite değerlerine göre, sıçanlarda belirlenmiş akut oral LD50 değerinin her iki remazol boyası için de >2000 mg/kg olduğu bildirilmektedir. Ayrıca zebra balıklarında yapılan toksisite testleri ile NOEC değerleri remazol kırmızısı için >500 mg/L ve remazol mavisi için ise 100-500 mg/L olarak verilmiştir. Bu veriler ile deneylerimizde elde edilen LC50 değerleri karşılaştırıldığında, remazol boyalarının *Xenopus* embriyoları için toksik olduğu görülmektedir. Bu nedenle, bu araştırma sonucuna göre bu iki tekstil boyar maddesinin de amfibi iribaşları ve embriyoları için riskli maddeler olduğunu söyleyebiliriz. Bununla birlikte, remazol boyaları için hesaplanan LC50 değerlerini, astrazon boyaları için bulunan LC50 değerleri ile karşılaştırdığımızda, remazol

boyalarının daha düşük toksik etkiye sahip olduğunu ifade edebiliriz. 168 saat süreyle remazol mavisi boyasına maruz kalması ise, toksik etkiyi önemli düzeyde arttırmaktadır.

96 saat süren test süresince iribaşların remazol boyalarına maruz kalmaları sonucunda, gelişmelerinin inhibe olduğu görülmüştür. Büyüme inhibisyonu remazol kırmızısına maruz kalma sonucu 3,3 ppm konsantrasyonda ve remazol mavisi için ise 5,0 ppm konsantrasyonda başlamıştır. Bu durum da risk değerlendirmesi yönünden önceki bulgularımızı desteklemektedir.

Remazol kırmızısı ve mavisine maruz kalan iribaşlarda malformasyon oranları birbirinden farklıdır. Remazol kırmızısının %16,12' lik oranla, remazol mavisinin ise %26,06' lık bir oranla iribaşlar üzerinde etkili oldukları görülmüştür. Malformasyon oranlarına bakılarak, bir fitallosiyanin boyası olan remazol mavisinin, reaktif azo boyası olan remazol kırmızısına göre daha etkili olduğu söylenebilir. İncelenen malformasyon tiplerinden hemen hemen tümünün görülmüş olması yanı sıra, doz artışına bağlı olarak malformasyon sayılarında da belirgin artış olduğu saptanmıştır. Remazol mavisi için ise, incelenen bütün malformasyon tipleri iribaşlarda farklı oranlarda olmak üzere görülmüştür. Baş ve yolk ödeminin diğer malformasyon tiplerine göre yüksek oranda bulunması, remazol mavisinin bu tip malformasyonların gelişiminde daha etkili olduğu fikrini vermektedir.

7 günlük subakut toksisite testi sonucunda, remazol kırmızısı ve mavisi için iribaşlarda saptanan ortalama ölüm oranları %60 ve %63,11 gibi değerlerde bulunmuş olup, bu sonuçlara göre embriyolara nazaran iribaşlar üzerinde remazol boyalarının daha toksik olduğuda görülmektedir. Bu durumda, iribaşlar büyüdükçe maruz kaldıkları madde miktarına paralel olarak toksik etkinin arttığı gözlenmektedir. 24., 72., ve 168. saatlerdeki LC50 değerleri her iki remazol boyası için de azalan konsantrasyonlarda bulunmuştur. Remazol mavisi için LC50 değerlerinin kırmızı için hesaplanan değere göre oldukça düşük konsantrasyonda olduğu görülmektedir. Bu durumda bu iki remazol boyasından mavinin daha toksik olduğu ifade edilebilir.

Enzim aktivitesi sonuçları incelendiğinde, remazol kırmızısı için GST aktivitesinin tüm konsantrasyonlarda arttığı ve bu artışın özellikle yüksek dozlarda istatistiksel açıdan önemli düzeyde olduğu bulunmuştur. Remazol mavisi etkisine maruz bırakılan iribaşlarda GST aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sonuç, tüm dozlar için istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. GST aktivitesindeki bu artış, remazol boyalarının toksik etkisini belirtmektedir. Ayrıca bu sonuçlara göre, II.

basamak biotransformasyonun *Xenopus* iribaşlarında aktif hale geldiğini de ifade edebiliriz.

LDH aktivitesi değerleri hem remazol kırmızısı hem de remazol mavisi için tüm uygulama dozlarında kontrole göre daha yüksektir.

Remazol kırmızısı için CaE aktivitesine bakıldığında, düşük dozlarda aktivite artışına yol açtığı, ancak yüksek dozlara maruz kalan iribaşlarda ise CaE aktivitesinin inhibe olduğu görülmektedir.

Elde edilen bulgulara göre, test materyali olarak kullanılan 2 farklı renkteki cibacron boya için *Xenopus* embriyoları üzerinde yapılan FETAX testi sonucunda, ölüm oranlarında beklenen doz-yanıt ilişkisi saptanamamıştır. Ancak hem cibacron kırmızısı hem de cibacron mavisi için yüksek konsantrasyonlara (576,54+ ppm; 432,41+ ppm) bağlı olarak ölüm oranında önemli düzeyde artış kaydedilmiştir.

96 saat sonunda hayatta kalan iribaşlar için tespit edilen LC50 ve EC50 değerlerine bakıldığında, cibacron kırmızısında maviye göre daha yüksek konsantrasyonlar elde edilmiştir. Böylece cibacron mavisinin daha düşük konsantrasyonlarda daha toksik olduğu söylenebilir. Cibacron boya için her ikisi de teratojen madde olarak belirlenmiştir. Ancak, hesaplanan değerlere göre, hem cibacron kırmızısı hem de cibacron mavisinin zayıf teratojen oldukları görülmektedir.

Çeşitli çalışmalara göre, cibacron boya için yapılmış olan risk analizi değerlendirmelerinde, cibacron kırmızısı için sıçanlarda belirlenmiş akut oral LD50 değerinin >2000 mg/kg, cibacron mavisi için akut oral LD50 değerinin ise >5000 mg/kg olduğu belirtilmektedir. Ayrıca balık toksisite testi bilgilerine göre, cibacron kırmızısı ve mavisi için LC50 değerleri sırasıyla >100 mg/L ve >1000 mg/L olarak bildirilmektedir. Deneylerimizde elde edilen bulgular ile karşılaştırıldığında *Xenopus* embriyolarında LC50 değerlerinin sıçanlardakine oranla daha düşük olduğunu, dolayısıyla bu boya için *Xenopus* üzerinde daha toksik olduğunu söyleyebiliriz.

Yapılan embriyonal toksisite testi süresince cibacron boya için maruz kalan embriyolarda gelişim geriliği görülmüştür. Büyümeyi inhibe eden en düşük konsantrasyon değeri (MCİG), uygulama gruplarının ilk dozları olup, cibacron kırmızısı için 6,66 ppm, cibacron mavisi için 3,33 ppm olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubu için vücut uzunluk değerleri ile cibacron boyar maddelere maruz kalan çeşitli grupların vücut uzunluk değerleri karşılaştırıldığında, tüm dozlar için farklılığın önemli düzeyde olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar cibacron boyar maddelerinin iribaşların büyümeleri üzerindeki etkisinin bir göstergesi olabilir.

Xenopus iribaşlarında büyüme inhibisyonunun yanısıra, çeşitli tipte malformasyonlarda gözlenmiştir. Cibacron kırmızısı ve mavisini için saptanan malformasyon oranları sırasıyla %40,12 ve %49,50 düzeyindedir. Cibacron kırmızısı için çalışılan malformasyon tiplerinden siklopiya (tek gözlülük) hariç, diğer malformasyon tipleri farklı oranlarda olmak üzere görülmektedir. Cibacron mavisini için incelenen 8 malformasyon tipinin hepsi değişik oranlarda olmak üzere gözlenmiştir. Bu nedenle, çalışılan cibacron boyaalarının teratojenik etkili maddeler olduğu da ifade edilebilir.

Xenopus laevis iribaşlarının gelişimlerinin 46. evresinde yapılan 7 günlük subakut toksisite testi sonucunda, bir azo boyası olan cibacron kırmızısı için ölüm oranı %31,22 iken, cibacron mavisini için %54,22 olarak belirlenmiştir. Oranlara bakılarak reaktif azo boyası olan cibacron mavisinin iribaşlar üzerindeki toksik etkisinin daha yüksek olduğunu da ifade edebiliriz.

İribaşlarda farklı zamanlarda tespit edilen LC50 değerleri incelendiğinde, azalan konsantrasyon değerleri bulunmuştur. 24., 72. ve 168. saatteki LC50 değerleri cibacron kırmızısında, cibacron mavisine göre daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, cibacron kırmızısının maviye göre daha az toksik olduğuna işaret edebilir.

Cibacron boyaalarının enzim aktivite değerlerine göre; cibacron kırmızısı için GST aktivite değerlerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucunda, tüm uygulama gruplarındaki farklılığın önemli düzeyde olduğu görülmüştür. Cibacron mavisinde ise GST aktivitesi bütün dozlarda azalmıştır ve iki dozdaki aktivite değerlerindeki farklılık önemli düzeyde bulunmuştur.

Cibacron kırmızısı ve mavisini için *Xenopus* iribaşlarında LDH aktivitesi doz artışına bağlı olarak artış göstermiştir. Buna bağlı olarak *Xenopus*' da LDH enzimi toksik etkinin belirlenmesinde bir biyobelirteç olarak kullanılabilir.

Cibacron kırmızısı uygulama dozlarında CaE aktivitesinde kontrol grubuna göre farklılıklar görülmüştür ve yüksek dozlara doğru aktivitede artış gözlemiştir. Cibacron mavisine maruz kalan gruplarda CaE aktivitesinde farklılıklar saptanmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bir doz grubuna maruz kalma sonucu enzim aktivitesindeki artış önemli düzeyde bulunmuştur.

Çalışmalarda kullanılan tekstil boyaalarının renk pigmentlerine göre toksik etkileri kendi aralarında karşılaştırılarak incelendiğinde, FETAX testi sonucunda elde edilen 4,736 ppm' lik LC50 değeriyle astrazon kırmızısının remazol ve cibacron kırmızısına göre en yüksek toksik etkiye sahip olduğu söylenebilir. En az toksik olan

boyar maddenin remazol kırmızısı olduğu tespit edilmiştir. LC50 değerleri için mavi renkli boyalar incelendiğinde, yine astrazon mavisinin en toksik, remazol mavisinin ise en az toksik olduğu görülmektedir.

Kırmızı renkli boyalarda en düşük EC50 değeri astrazon kırmızısında, en yüksek değer ise remazol kırmızısında bulunmuştur. Böylece, en etkili kırmızı boyar maddenin astrazon grubuna, en az etkili kırmızı boyar maddenin ise remazol grubuna ait olduğunu söyleyebiliriz. Mavi renkteki boyar maddelerin EC50 değerlerinde en düşük değer 1,252 ppm ile astrazon mavisine aittir ve en etkili mavi renkli boyar madde grubudur. En yüksek EC50 değeri ise 220,22 ppm ile cibacron mavisidir ve en az etkili mavi renkli boyar madde grubuna dahil olmuştur.

Daha önce belirtildiği gibi, çalışılan bütün boyalar teratojen madde olarak tespit edilmiştir. Astrazon mavisini 3,965' lik bir değerle şiddetli teratojenler grubuna, remazol mavisini 2,958' lik değeriyle orta şiddetli teratojenler grubuna, diğer boyar maddelerde zayıf teratojenler grubuna dahil olmuşlardır. Bu verilere göre, fitallosiyanin grubu mavi boyaların azo grubuna ait mavi renkli boyalara göre daha toksik olduğu söylenebilir.

Tüm boyaların doz gruplarının MCİG değerlerine bakıldığında, çok düşük konsantrasyonlardan itibaren *Xenopus* iribaşlarının gelişimleri üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu görülmektedir. Böylece hem fitallosiyanin hem de azo grubu tüm boyaların büyümeyi inhibe ettiği söylenebilir.

Xenopus iribaşlarındaki LC50 değişimleri bütün boyalarda 24. saatten 168. saate doğru, beklenildiği gibi, azalan konsantrasyonlarda bulunmuştur. Böylece, maruz kalma süresi ile toksisite arasında da doğrusal bir doz-yanıt ilişkisi mevcuttur. Boyar maddeler renklerine göre incelendiğinde, 24. saatte en düşük LC50 değeri olan ve dolayısıyla en fazla toksik etki gösteren kırmızı renkli boyar madde astrazon kırmızısıdır. En yüksek LC50 değeri cibacron kırmızısı için hesaplanmıştır ve iribaşlar üzerinde en az toksik olan kırmızı renkli boyadır. Mavi renkli boyar maddelerde LC50 değeri 1,90 ppm ile en düşük konsantrasyon elde edilen astrazon mavisidir. En yüksek LC50 değeri ise 1144 ppm ile cibacron mavisinde tespit edilmiştir. 72. saatteki LC50 değerlerine bakıldığında, hem kırmızı hem de mavi renkli boyar maddelerde en düşük değer astrazon boyalarında görülmüştür. 168. saate bakıldığında kırmızı boyar maddelerden en küçük LC50 değeri 0,35 ppm ile astrazon kırmızısının, en büyük LC50 değerinin ise 358,96 ppm ile cibacron kırmızısı uygulama gruplarında elde edilmiştir. Kırmızı renkli boyar maddeler toksik etkilerine göre sıralandığında, astrazon kırmızısı > remazol kırmızısı > cibacron

kırmızısı olarak saptanmıştır. Mavi renk gruplarında ise astrazon mavisi > remazol mavisi > cibacron mavisi olarak sıralanmaktadır.

Test edilen boyar maddelerin pH değerlerinin 0. ve 24. saatlerde periyodik olarak ölçülmesi sonucunda, ortam pH'ının önemli düzeyde bir değişime uğramadığı da saptanmıştır. Buna göre, pH düzeyinin toksik etkinin ortaya çıkmasında önemli bir rolünün olmadığı da düşünülmektedir.

Genel bir değerlendirme ile *Xenopus laevis*'in hem embriyo hem de iribaşlarında yapılan çalışmalarda, astrazon boyalarının, remazol ve cibacron boyalarına göre daha toksik olduğunu ifade edebiliriz. Ayrıca, çalışılan bütün boyar maddeler arasında genellikle mavi renkli boyaların, kırmızı renkli boyar maddelere göre daha fazla toksik olduğunu da ifade edebiliriz.

Sonuç olarak, tekstil sanayinde yaygın olarak kullanılan bu boyar maddelerin *Xenopus*'un embriyonal gelişimi ve daha sonraki metamorfoz evreleri üzerinde toksik etkiye sahip olduğu ve bu maddelerin çevresel açıdan önemli risk faktörleri olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Özellikle, sucul ortamda amfibi iribaşlarının gelişimi üzerine olumsuz etkiye sahip olan bu maddelerin, alıcı ortam olarak su kaynaklarına deşarj edilmesinin, ekosistem dengelerini bozabilecek bir faktör olduğu da ifade edilebilir. Bunun yanı sıra bu boyar maddelere doğrudan maruz kalmanın daha ileri evrelerinde, özellikle hormonal dengenin bozulmasına etkileri olup olmayacağının da araştırılması gerektiği kanısı ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle endokrin sistemi bozucu bir etkiye sahip olup olmadığının ve çeşitli düzeylerde toksik etkilerinin de araştırılması gerekmektedir. Ayrıca, tekstil sanayinde yaygın olarak kullanılan bu maddelerin kontrolsüz şekilde alıcı ortamlara deşarj edilmesi de, son yıllarda yoğun şekilde rapor edilen ve tüm dünyada amfibi popülasyonlarının azalmasına neden olan çevresel kirlenici faktörlerden birisi olabilir.

6. KAYNAKLAR

- [1] C.D. Klaassen (Ed.), 6th. Edition, *Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons*, McGraw-Hill, Medical Pub. Division, 1236 p., 2001.
- [2] Ö. Yeşilada, D. Asma, S. Cing, *Decolorization of textile dyes by fungal pellets*, **Process Biochem.**, 2003, 38: 933-938.
- [3] R.K. Somashekar, M.R. Gurudev and Sidda Ramiah, *Somatic Cell Abnormalities Induced by Dye Manufacturing Industry Waste Water*. **Cytologia.**, 1985, 50: 129-134.
- [4] I.M. Banat, P. Nigam, D. Singh, R. Marchant, *Microbial decolorization of textile dye containing effluents: a review*, **Biores. Technol.**, 1996, 58: 217-227.
- [5] V. Kumar, L. Wati, P. Nigam, I. M. Banat, B. S. Yadav, D. Singh, R, Marchant, *Decolorization and biodegradation of anaerobically digested sugarcane molasses spent wash effluent from biomethanation plants by white- rot fungi*, **Process Biochem.**, 1998, 33: 1, 83-88.
- [6] J.R. M. Willets and N.J. Ashbolt, *Understanding anaerobic decolouration of textile dye wastewater: mechanism and kinetics*. **Water Sci. Technol.**, 2000, 42: 1-2, pp 409-415.
- [7] I. Sohair, Abo- Elela and R. Sh. Abdel Wahaab, *Fish Toxicity Bioassay of Textile Wastewaters Using Nile Bulti*, **Environ. Technol. Lett.**, 1988, 9: 1147- 1152.
- [8] I.M. Banat, P. Nigam, D. Singh, and R. Marchant, *Microbial decolourisation of textile-dye-containing effluents: A Review*. **Biores. Technol.**, 1995, 58: 217-227.
- [9] R.M Christie, *Colour Chemistry*, Royal Society of Chemistry, 205 s., 2001, England.
- [10] V.M. Correia, T. Stephenson and S.J. Judd, *Characterization of textile wastewaters: a review*, **Environ. Technol.**, 1994, 15: 917-919.
- [11] C.M. Chen, M.L. Shih, S.Z. Lee, J.S. Wang, *Increased toxicity of textile effluents by a chlorination process using sodium hypochlorite*, **Water Sci. Technol.**, 2001, 43 (2): 1-8.
- [12] P.G. Tratnyek, vd., *Photoeffects of Textile Dye Wastewaters: Sensitization of Singlet Oxygen Formation, Oxidation of Phenols and Toxicity to Bacteria*, **Environ. Toxicol. Chem.**, 1994, 13: 27-33.
- [13] B. Glover, *Getting rid of colour*, **J. Soc. Dyers Col.**, 1993, 109: 273.
- [14] R. Laing, *The impact of effluent regulations on the dyeing industry*, **Rev. Prog. Coloration.**, 1991, 21: 56-71.
- [15] L. Fishbein, *Mutagens and potential mutagens in the biosphere*, **Sci. Tot. Environ.**, 1974, 2: 341-379.
- [16] EPA (a), *A Review of the reference dose and reference concentration processes*, **U.S. Environ. Protection Agency**, Washington, D.C., EPA/630/P-02/002F, 2002.
- [17] EPA (b), *Framework for Cumulative Risk Assessment*, **U.S. Environ. Protection Agency**, Washington, D.C., EPA/630/P-02/001A, 2002.

- [18] R.M. Mann and J.R. Bidwell, *Application of the FETAX protocol to assess the developmental toxicity of nonylphenol ethoxylate to Xenopus laevis and two Australian frogs*, **Aqua. Toxicol.**, 2000, 51: 19-29.
- [19] L. Tavera-Mendoza, S. Ruby, P. Brousseau, M. Fournier, D. Cyr and D. Marcogliese, *Response of the Amphibian Tadpole (Xenopus laevis) to Atrazine During Sexual Differentiation of the Testis*, **Environ. Toxicol. Chem.**, 2002, 21(3): 527-531.
- [20] U.G. Doğan, *Bazı tekstil boyalarının amfibi iribaşlarına toksik etkileri üzerine bir araştırma*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 2001.
- [21] F. Sayım, *Malathion (Organik Fosforlu İnsektisit)' un Rana ridibunda (Amphibia Anura) Larvaları Üzerindeki Toksik Etkilerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 1998.
- [22] ASTM, *Standard guide for conducting the frog embryo teragonesis assay-Xenopus (FETAX)*, E1439-98, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, 1998.
- [23] NIH, *A Report of the ad hoc Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, National Institute of Health, Pub. No: 97- 3981, 1997.
- [24] ETAD, *Pollution Prevention in the Dye Manufacturing Industry*, U.S. Dye Manufacturers Operating Committee, 1994
- [25] H. Zollinger, *Color chemistry-syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments*, VCH Publications, New York, N.Y. 1991.
- [26] K. Al-Sapti, *Cholorotriazine reaktive azo red 120 textile dye induces micronuclei in fish*, **Ecotox. Environ. Safety**, 2000, 47: 149-155.
- [27] T-L. Hu, S.C. Wu, *Assessment of effect of azo dye RP₂B on the growth of a nitrojen fixing cyanobacterium-Anabaena sp.*, **Biores. Technol.**, 2000, 77: 93-95.
- [28] C. Vismara, A. Garavaglia, *4-Choloro-2-Methylphenoxyacetic Acid Containing Compounds Genotoxicity Evaluation by Mutatox Assay and Comparison with Acute (Microtox) and Embriyo (FETAX) Toxicities*, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 1997, 58: 582-588.
- [29] İ. Başer ve Y. İnancı, *Boyar Madde Kimyası*, Marmara Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Yayınları, 1990, s. 47-52.
- [30] A.R. Khatri, *Reaktive dyes and dyeing process*, **Pakistan Textile Journal**, 1996, pp. 22-25.
- [31] M. Prati, E. Biganzoli, P. Boracchi, M. Tesauro, C. Monetti, G. Bernardini, *Ecotoxicological soil evaluation by FETAX*, **Chemosphere**, 2000, 41: 1621-1628.
- [32] T. Özgünen, *Xenopus laevis' te Deneysel Embriyoloji*, Ders Notu, Adana 1994
- [33] A. Boğa, *Dış Ortamda Yer Alan Çeşitli Kimyasal Kirliliklerin Embriyo Gelişimi Üzerine Etkisini Değerlendirmede FETAX Testinin Değeri*, Master tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 1996.
- [34] G.K. Noble, *The biology of the Amphibia*, McGraw- Hill New York, 1931.
- [35] W. Allaerts, R. Ubink, J. Vente, R. Tuinhof, B.G. Jenks, E.W. Roubos, *Nitric oxide synthase and background adaptation in Xenopus laevis*, **J. Chem. Neuroanatomy**, 1997, 14: 21-31.
- [36] T. Özgünen, *Xenopus Fizyolojisi*, Ders Notu, Adana, 1991.

- [38] G. Hilken, J. Dimigen, F. Iglauer, *Growth of Xenopus laevis Under Different Laboratory Rearing Conditions*, **Laboratory Animals**, 1995, 29: 152-162.
- [39] ASTM, *Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX)*, 2th, E1439-98, 1025 p, American Society for Testing and Materials, 1999, Philadelphia, PA.
- [40] M. Saka, *Examination of an amphibian-based assay using the larvae of Xenopus laevis and Ambystoma mexicanum*, **Ecotox. Environ. Safety**, 2003, 55(1): 38-45.
- [41] K. Yamauchi, P. Prapunpoj, and S.J. Richardson, *Effect of Diethylstilbestrol on Thyroid Hormone Binding to Amphibian Transthyretins*, **Gen. Comp. Endocrin.**, 2000, 119: 329-339.
- [42] M.J. Delgado, M.V. Cespedes, N.De Pedro, M. Alonso-Bedate, A.L. Alonso-Gomez, *Day/night variations of dopamine ocular content during Xenopus laevis ontogeny*, **Neuroscience Lett.**, 2001, 300: 129-132.
- [43] J.A. Bantle, D.J. Fort, B.L. James, *Identification of developmental toxicants using the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX)*, **Hydrobiologia**, 1989, 188/189: 577-585.
- [44] J. Herkovits, P. Cardellini, C. Pavanati and S. Perez-Coll, *Cadmium Uptake and Bioaccumulation in Xenopus laevis Embryos at Different Developmental Stages*, **Ecotox. Environ. Safety**, 1998, 39: 21-26.
- [45] C. Vismara, V. Battista, G. Vailati, R. Bacchetta, *Paraquat induced embryotoxicity on Xenopus laevis development*, **Aqua. Toxicol.**, 2000, 49: 171-179.
- [46] W.J. Fischer, D.R. Dietrich, *Toxicity of the cyanobacterial cyclic heptapeptide toxins microcystin-LR and -RR in early life-stages of the African clawed frog (Xenopus laevis)*, **Aqua. Toxicol.**, 2000, 49: 189-198.
- [47] D.J. Fort, E.L. Stover, T.L. Propst, B.C. Faulkner, T.A. Vollmuth and F.J. Murray, *Evaluation of the Developmental Toxicity of Caffeine and Caffeine Metabolites using the Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX)*, **Food Chem. Toxicol.**, 1998, 36: 591-600.
- [48] A.C. Gutleb, J. Appelman, M.C. Bronkhorst, J.H.J. van den Berg, A. Spenkeliink, A. Brouwer, A.J. Murk, *Delayed effects of pre- and early-life time exposure to polychlorinated biphenyls on tadpoles of two amphibian species (Xenopus laevis and Rana temporaria)*, **Environ. Toxicol. Pharm.**, 1999, 8: 1-14.
- [49] D. Kolankaya, *Embriyoloji Ders Notları*, Hacettepe Üniversitesi, 1986.
- [51] P.D. Nieuwkoop, J. Faber, *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*, Garland Publishing, INC., New York & London, 1994.
- [52] C. Vismara, C. Rosetti, E. Bolzacchini, A. Luperini, G. Bernardini, *Toxicity Evaluation of 4-Chloro-2-Methylphenoxyacetic Acid by Microtox and Comparison*, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 1996, 56: 85-89.
- [53] G.S. Schuytema, A.V. Nebeker, *Comparative Toxicity of Diuron on Survival and Growth of Pasific Treefrog, Bullfrog, Red-Legged Frog, and African Clawed Frog Embryos and Tadpoles*, **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 1998, 34: 370-376.
- [54] C. Vismara, R. Bacchetta, B. Cacciatore, G. Vailati, U. Fascio, *Paraquat*

- embryotoxicity in the Xenopus laevis cleavage phase*, **Aqua. Toxicol.**, 2001, 55: 85-93.
- [55] ASTM, *Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX)*, E1439-91, American Society for Testing and Materials, 1991, Philadelphia, PA.
- [57] D.J. Fort, D.A. Dawson, A.J. Bantle, *Development of a Metabolic Activation System for the Frog Embryos Teratogenesis Assay: Xenopus (FETAX)*, **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**, 1988, 8:251-263
- [58] R.C. Tinsley and H.R. Kobel (Eds.), *The biology of Xenopus*, Clarendon Press, England, 464 s., 1996.
- [59] D. Asma, *Bazı Fungus ve Bakterilerde Detoksifikasyon Sistemi ve Sistem Üzerine Pestisitlerin Etkisinin Araştırılması*, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 1998.
- [60] M.O. Amdur, J. Doull, C.D. Klassen (Eds.), *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 1033, Pergamon Press, 1991, New York.
- [61] M. Petrivalsky, M. Machala, K. Nezveda, V. Piacka, Z. Svobodano and P. Drabek, *Glutathion-Dependent Detoxifying Enzymes in Rainbow Trout Liver: Search for Specific Biochemical Markers of Chemical Stress*, **Environ. Toxicol. Chem.**, 1997, 16: 1417-1421.
- [62] S.G. George, *Enzymology and Molecular Biology of Phase II Xenobiotic Conjugating Enzymes in Fish*, D.C. Malins and G.K. Ostrader (Eds.), **Aqua. Toxicol.**, Lewis Pub., 1994, pp. 37-85, USA.
- [63] J.D. Hayes, R.C. Strange, *Invited commentary potential contribution of the Glutathione-S-Transferase supergene family to resistance to oxidative stress*, **Free Radical Res.**, 1995, 22 (3): 193-207.
- [64] S. Angelucci, P. Sacchetta, A.D. Luca, P. Moio, F. Amicarelli, C.D. Ilio, *Glutathione transferase isoenzymes from frog (Xenopus laevis) liver and embriyo*, **Biochim. Biophys. Acta**, 2002, 1569: 81-85 .
- [65] J.D. Hayes, R.C. Strange, *Glutathione S-Transferase Polymorphism and their Biological consequences*, **Pharmacology**, 2000, 61(3): 154-166.
- [66] R.C. Strange, P.W. Jones, A.A. Fryer, *Glutathione S-Transferase: Genetics and role in toxicology*, **Toxicol. Lett.**, 2000, 112: 357-363.
- [67] F.J. Leinweber, *Possible physiological roles of carboxylic ester hydrolases*, **Drug Metab. Rev.**, 1987, 18: 379-439.
- [68] M.G. Barron, K.A. Charron, W.T. Stott, *Tissue carboxylesterase activity of rainbow trout*, **Environ. Toxicol. and Chem.**, 1999,18(11): 2506-2511.
- [69] W.C. Dauterman, *Extramicrosomal metabolism of insecticides*, In *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Plenum Press, New York, 1976 pp. 149-176.
- [70] A.L. Pond, H.W. Chambers, J.E. Chambers, *Organophosphate detoxication potential of various rat tissues via A-esterase and aliesterase activities*, **Toxicol. Lett.**, 1995, 28: 245-252.
- [71] B.F. McCutchen, T. Uematsu, A. Szekars, T.I. Huang, T. Shiotsuki, A. Lucas, B.D. Hammock, *Development of surrogate substrates for juvenile-hormone esterase*, **Arch. Biochem. Biophys.**, 1993, 307: 231-241.

- [72] C.A. Rodgers, D.L. Stalling, *Dynamic of an ester of 2,4-D in organs of three fish species*, **Weed Sci.**, 1972, 20: 101-105.
- [73] M.G. Barron, P.W. Albro, W.L. Hayton, *Biotransformation of di-2-ethylhexyl phthalate by rainbow trout*, **Environ. Toxicol. Chem.**, 1995, 14: 873-876.
- [74] J.S. Boone, J.E. Chambers, *Time course of inhibition of cholinesterase and aliesterase activities and nonprotein sulhydryl levels following exposure to organophosphorus insecticides in mosquito fish (Gambusia affinis)*, **Fundam. Appl. Toxicol.**, 1996, 29(2): 202-207.
- [75] R. Abbas, W.L. Hayton, *A physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic model for paraoxon in rainbow trout*, **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 1997, 145: 192-201.
- [76] M.L. Parker, M.I. Goldstein, *Differential toxicities of organophosphate and carbamate insecticides in the nestling European starling (Sturnus vulgaris)*, **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 2000, 39(2): 233-242.
- [77] M.G. Barron, K.A. Charron, W.T. Stott, S.E. Duvall, *Tissue carboxylesterase activity of rainbow trout*, **Environ. Toxicol. Chem.**, 1999, 18(11): 2506-2511.
- [78] A. Cohen, D. Nuggegodra, M.M. Gagnon, *Metabolic responses of fish following exposure to two different oil spill remediation techniques*, **Ecotox. Environ. Safety**, 2001, 48: 306-310.
- [79] B. Asztalos, J. Nemcsok, I. Benedeczký, *The effects of pesticides on some biochemical parameters of carp (Cyprinus carpio L.)*, **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 1990, 19: 275-282.
- [80] R. Kumari, R.K. Singh, Y.P. Khanna, *Carbofuran-induced stress-mediated disease syndromes in Clarias batrachus, a freshwater fish*, **Proc. Internat. Conf. Pollution Assessment**, Control and Treatment, 1997, pp. 57-63.
- [81] M. Escher, T. Wahli, S. Büttner, *The effect of sewage plant effluent on brown trout (Salmo trutta fario): a cage experiment*, **Aquat. Sci.**, 1991, 61: 93-110.
- [82] M. Özmen, A. Güngördü, *Sarıyar barajında yaşayan bazı balık populasyonlarında çevresel kirliliğin biyomarkırlarının değerlendirilmesi üzerine bir araştırma*, İ.Ü.A.F. Araştırma Projesi P.No: 2000/26, 2001, Malatya.
- [83] J.E. Hornby, L. Muntz, P. Gough, *An electrophoretic comparison of the LDH isozyme distribution during the development of the tadpole tails of the aquatic toad Xenopus laevis and the amphibian frog Rana temporaria*, **Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.**, 1989, 93(1): 85-92.
- [84] E.A. Clarke, R. Anliker, *Organic dyes and pigments*, **Handbook of Environ. Chem.**, Springer Verlag, 1980.
- [85] R.A. Cartwright, *Historical and modern epidemiological studies on populations exposed to N-substituted aryl compounds*, **Environ. Health Perspective** 1983, 49: 13-19.
- [86] Y. Mori, T. Niwa, K. Tyoshi, K. Hirano, M. Suguira, *Mutagenesis in Salmonella after metabolic activation of carcinogenetic azo dyes and their isomers by liver S9 from rats, mice and hamsters*, **Mutat. Res.**, 1983, 56: 95-102.

- [87] T.P. Cameron, T.J. Hughes, P.E. Kirby, V.A. Fung, V.C. Dunkel, *Mutagenic activity of 27 dyes and related chemicals in the Salmonella microsome and mouse lymphoma TK+/- assays*, **Mutat. Res.**, 1987, 189: 223-261.
- [88] K. Hayakawa, V. Kawaguchi, T. Murahashi, M. Miyazaki, *Distribution of nitropyrenes and mutagenicity in air borne particulates collected with Andersen Sampler*, **Mutat. Res.**, 1995, 348: 57-61.
- [89] D.F. Spencer, *Oxygen consumption by the crayfish *Orconectes propinquus* (Girard) exposed to aquashade*, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 1984, 33: 373-378.
- [90] D. Brown, *Effects of colorants in the aquatic environment*, **Ecotox. and Environ. Safety**, 1987, 13: 139-147.
- [91] R.L. Sing, S.K. Khanna, G.B. Singh, *Acute and Short-Term Toxicity Studies on Orange II*, **Vet. Hum. Toxicol.**, 1987, 29(4): 300-304.
- [92] D. Brown and R. Anliker, *Dyestuffs and the environment-A risk assessment of Chemicals in the Environment*, editor Richardson M., **The Royal Society of Chem.**, 1988, pp. 398-413.
- [93] K. Hunger and R. Jung, *On the toxicology and ecology of organic colorants*, **Chimica**, 1991, 45: 297-300.
- [94] A.G. Murugesan, M.A. Haniffa, *Histopathological and histochemical changes in the oocytes of the air-breathing fish *Heteropneustes fossilis* (bloch) exposed to textile-mill effluent*, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 1992, 48: 929-936.
- [97] W.M. Grant, *Toxicology of the eye*, 3rd ed. Springfield, IL: Charles C. Thomas Publisher, pp.155, 1986.
- [98] M.A. Brown, S.C. DeVito, *Predicting azo dye toxicity*, **Critical Reviews in Environ. Sci. and Tech.**, 1993, 23(3): 249-324.
- [99] K.A. Goel, K. Gupta, *Acute toxicity of Acid Yellow 36 to *Heteropneustes fossilis**, **Indian J. Environ. Hlth.**, 1995, 27: 266-9.
- [100] P.K. Malik, *Use of activated carbons prepared from sawdust and rice-husk for adsorption of acid dyes: a case study of acid yellow 36*, **Dyes and Pigments**, 2003, 56: 239-249.
- [101] D.R. Hitcock, S.E. Law, J. Wu, P.L. Williams, *Determining toxicity trends in the ozonation of synthetic dye wastewaters using the Nematode *Caenorhabditis elegans**, **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 1998, 34: 259-264.
- [102] M.I. Beydilli, S.G. Pavlostathis, W.C. Tincher, *Decolorization and toxicity screening of selected reactive azo dyes under methanogenic conditions*, **Wat. Sci. Tech.**, 1998, 38(4-5): 225-232.
- [103] W.K. Walthall, J.D. Stark, *The acute and chronic toxicity of two xanthene dyes, fluorescein sodium salt and phloxine B, to *Daphnia pulex**, **Environ. Pollution**, 1999, 104: 207-215.
- [104] K.S. Rana and S. Raizada, *Acute Toxicity of Tannery and Textile Dye Effluents on a Common Teleost, *Labeo rohita*: Histological Alterations in Liver*, **J. Environ. Biol.**, 1999, 20: 233-36.
- [105] K.S. Rana and S. Raizada, *Histopathological alterations induced by tannery and textile dyeing effluents in the kidney of *Labeo rohita* (HAM.)*, **J. Environ. Biol.**, 2000, 21: 301-304.
- [106] S. Gomes de Moreas, R.S. Freire, N. Duran, *Degradation and toxicity*

- reduction of textile effluent by combined photocatalytic and ozonation processes*, **Chemosphere**, 2000, 40: 369-373.
- [107] C.A.K. Gouvea, F. Wypych, S.G. Moraes, N. Duran, N. Nagata, P.P-Zamora, *Semiconductor-assisted photocatalytic degradation of reactive dyes in aqueous solution*, **Chemosphere**, 2000, 40: 433-440.
- [108] A. Villegas-Navarro, Y. Ramirez-M., M.S. Salvador-S.B., J.M. Gallardo, *Determination of wastewater LC50 of the different process stages of the textile industry*, **Ecotox. Environ. Safety**, 2001, 48: 56-61.
- [109] A. Villegas-Navarro, M.C.R. Gonzalez, E.R. Lopez, R.D. Aguilar, W.S. Marçal, *Evaluation of Daphnia magna as an indicator of toxicity and treatment efficacy of textile wastewaters*, **Environ. Internat.**, 1999, 25(5): 619-624.
- [110] M. Sumathi, K. Kalaiselvi, M. Palanivel, P. Rajaguru, *Genotoxicity of textile dye effluent on fish (Cyprinus carpio) measured using the comet assay*, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 2001, 66: 407-416.
- [112] C. Wang, A. Yediler, D. Lienert, Z. Wang, A. Kettrup, *Toxicity evaluation of reactive dyestuffs, auxiliaries and selected effluents in textile finishing industry to luminescent bacteria Vibrio fischeri*, **Chemosphere**, 2002, 46: 339-344.
- [113] B-Y. Chen, *Understanding decolorization characteristics of reactive azo dyes by Pseudomonas luteola: toxicity and kinetics*, **Process Biochem.**, 2002, 38: 437-446.
- [114] A. Gottlieb, C. Shaw, A. Smith, A. Wheatley, S. Forsythe, *The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolorisation*, **J. Biotech.**, 2003, 101: 49-56.
- [115] A.R. Blaustein, D.B. Wake, *Declining amphibian populations: a global phenomenon?* **Trends Ecol. Evol.**, 1990, 5: 203-204.
- [116] A.R. Blaustein, D.B. Wake, *The puzzle of declining amphibian populations*, **Sci. Am.**, 1995, 272: 52-63.
- [117] C. Carey, N. Cohen, L. Rollins-Smith, *Amphibian declines: an immunological perspective*, **Dev. Comp. Immunol.**, 1999, 23: 459-472.
- [118] D.W. Sparling, C.M. Fellers, L.L. McConnell, *Pesticides and amphibian population declines in California USA*, **Environ. Toxicol. Chem.**, 2001, 20(7): 1591-1595.
- [119] J. Helgen, R.G. McKinnell, M.C. Gernes, M.J. (Ed.), *Investigation of malformed northern leopard frogs in Minnesota. In: Lannoo, Status and Conservation of Midwestern Amphibians*, University of Iowa Press, Iowa, 1998, pp. 288-297.
- [121] U.G. Doğan ve M. Özmen, *Toxicity bioassay of atrazone dyes using Amphibian Tadpole*, **Toxicol. Lett.**, 2001, Vol:123 (Supp.1) 110.
- [122] A. Boğa, S. Binokay, A. Kendirci, T. Özgünen, *Effects of lithium on formation of the larval body pattern of Xenopus laevis*, **Tr. J. Biol.**, 1997, 21: 423-430.
- [123] B.D. Palmer, L.K. Huth, D.L. Pioto, K.W. Selcer, *Vitellogenin as a biomarker for xenobiotic estrogens in an amphibian model system*, **Environ. Toxicol. Chem.**, 1998, 17 (1): 30-36.
- [124] I. Lutz, W. Kloas, *Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding*, **Sci. Tot. Environ.**, 1999, 225 (1-2): 49-57.

- [125] W. Kloas, I. Lutz, R. Einspanier, *Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo*, **Sci. Tot. Environ.**, 1999, 225: 59-68.
- [126] K. Yamauchi, P. Prapunpoj, S.J. Richardson, *Effect of diethylstilbestrol on thyroid hormone binding to amphibian transthyretins*, **General and Comp. Endocrin.**, 2000, 119 (3): 329-339.
- [127] D.B. Pickford, I.D. Morris, *Inhibition of gonadotropin-induced oviposition and ovarian steroidogenesis in the African clawed frog (*Xenopus laevis*) by the pesticide methoxychlor*, **Aqua. Toxicol.**, 2003, 62 (3): 179-194.
- [128] D.J. Fort, E.L. Stover, D.R. Farmer, J.K. Lemen, *Assesing the Predictive Validity of Frog Embriyo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX)*, **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, 2000, 20: 87-98.
- [129] D.J. Fort, E.L. Stover, J.A. Bantle, R.A. Finch, *Evaluation of the Developmental Toxicity of Thalidomine Using Frog Embriyo Teratogenesis Assay: Xenopus (FETAX)*, **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, 2000, 20: 35-47.
- [130] D.J. Fort, R.R. Paul, *Enhancing the predictive validity of Frog Embriyo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX)*, **J. Appl. Toxicol.**, 2002, 22: 185-191.
- [131] D. Dravakova, K. Dvorakova, L. Blaha, B. Marsalek, Z. Knotkova, *Effect of Cyanobacterial Bromass and Purifred Microcystins on Malformations in Xenopus laevis Teratogenesis Assay (FETAX)*, **Cyanobacterial Toxi. in Xenopus Teratogen. Assay**, 2002, 547-555.
- [132] L.A. Lienesch, J.N. Dumont, J.A. Bantle, *The effect of cadmium on oogenesis in Xenopus laevis*, **Chemosphere**, 2000, 41: 1651-1658.
- [133] O.L. Anguiano, A.C. Castro, A.M.P. D'Angelo, *The role of glutathion conjugation in the regulation of early toad embriyos tolerance to pesticides*, **Comp. Biochem. Physiol., Part C**, 2001, 128: 35-43.
- [134] D.W. Berzins, K.J. Bundy, *Bioaccumulation of lead in Xenopus laevis tadpoles from water and sediment*, **Environ. Internat.**, 2002, 28: 69-77.
- [135] Eric A.E. Garber, *Mineral deficiency and the use of the FETAX bioassay to study environmental teratogens*, **J. Appl. Toxicol.**, 2002, 22: 237-240.
- [136] EPA (Environmental Protection Agency), *Ecological Effects Test Guidelines, Tadpole/ Sediment Subchronic Toxicity Test*, OPPTS 850.1800, 1996.
- [137] W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby, *The first Enzimatic Step in Mercapturic Acid Formation Glutathion S-Transferases*, **J. Bio. Chem.**, 1974, 249: 7130-7139.
- [138] P. Santhoshkumar, T. Shivanandappa, *In vitro sequestration of two organophosphorus homologs by the rat liver*, **Chemico-Biological Interac.**, 1999, 119-120: 277-282.
- [139] A. Güngördü, *Sarıyar Baraj Gölünde Yaşayan Balıklarda Çevresel Kirleticilerin Etkilerininin Saptanması*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 2001
- [140] M. Özmen, S.E. Dominguez, A. Fairbrother, *Effects of Dietary Azinphos Methyl on selected Plasma and Tissue Biomarkers of the Gray-Tailed Vole*, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 1998, 60(2): 194-201.

- [141] O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randal, *Protein Measurement with Folinphenol Reagent*, **J. Biol. Chem.**, 1951,193: 265-275.
- [142] D.A. Dawson, C.A. Mc Cormick, J.A. Bantle, *Detection of teratogenic substances in acidic mine water samples using the frog embriyo teratogenesis assay: Xenopus (FETAX)*, **J. Appl. Toxicol.**, 1985, 5: 234-244.
- [143] G.S. Schuytema, vd., *Toxicity of Guthion and Guthion 2S to Xenopus laevis Embryos*, **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 1994, 27: 250-255.

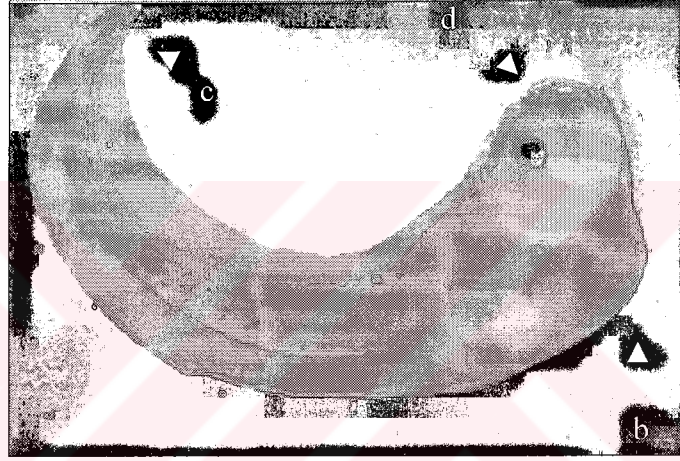
Kaynak Olarak Kullanılan Veri Tabanları

- [37] S.E. Wilson-Sanders (Ed.), *Animal Care User's Handbook*, 45 s., **IACUC**, 2002, The University of Arizona, USA.
- [50] *Xenbase: a Xenopus web resource*, **Xenbase**, 2001
- [56] The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (**NICEATM**), *Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus (FETAX)*, Background Review Document, National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), 2000.
- [95] *Environmental Hazard and Risk Assessment of Organic Colorants (including life-cycle analysis)*, Materials for ETAD Seminar, Denmark, **ETAD 1992** .
- [96] *Canadian Centre for Occupational Health and Safety*, **HSELINE**, Health and Safety, 1998.
- [111] **HSDB**, *Hasardous Substances Data Bank*, National Laboratory of Medicine, **Toxicology Data Network (TOXNET)**, 2001.
- [120] Organisation for Economic Co-operation and Development, *Detailed review paper on aquatic testing methods for pesticides and industrial chemicals. In: OECD Series on Testing and Assessment*, No.11, **OECD**, Paris, p.190, 1998.

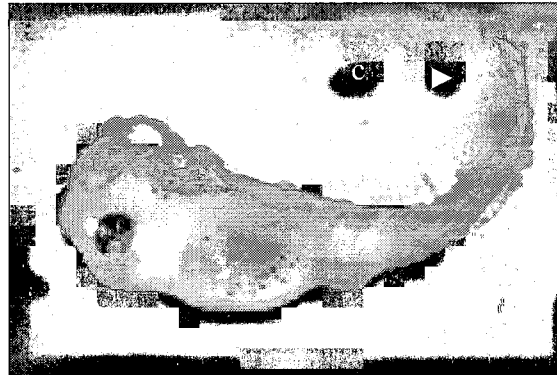
EKLER



a- 1.48 ppm (M.B. 20x10x)

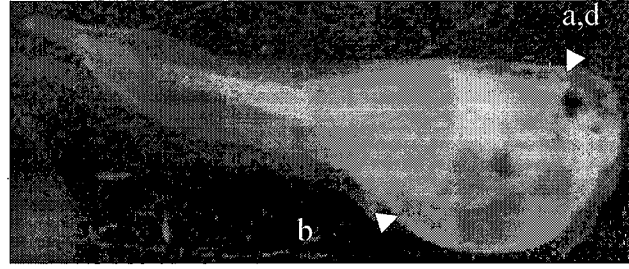


b- 1.92 ppm (M.B. 20x10x)

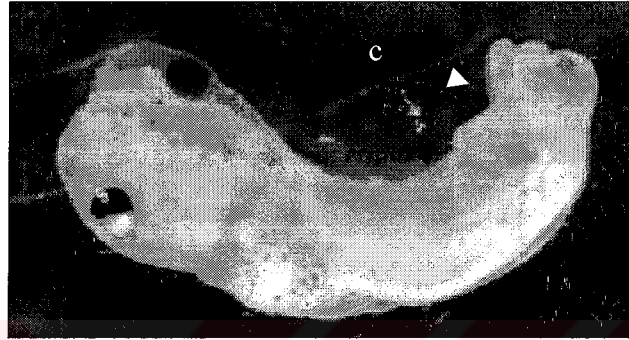


c- 4.22 ppm (M.B. 20x10x)

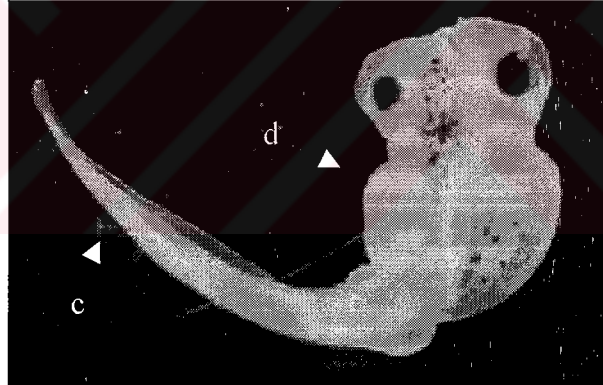
EK 1. Astrazon kırmızısına maruz kalan embriyolarda 96. saat sonunda gözlenen malformasyonlara bazı örnekler (M.B.: Mikroskop Büyütmesi, a: Mikroftalmi, b:Yolk Ödemi, c:Kuyruk Eğriliği, d: Mikrocefali).



a- 0.77 ppm (M.B. 20x10x)

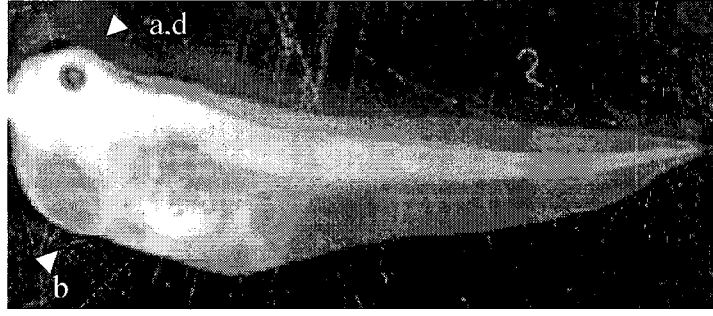


b- 1.51 ppm (M.B. 20x10x)

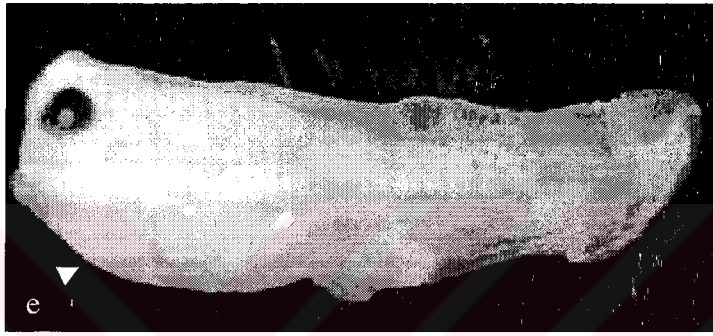


c- 5.78 ppm (M.B.12.5x10x)

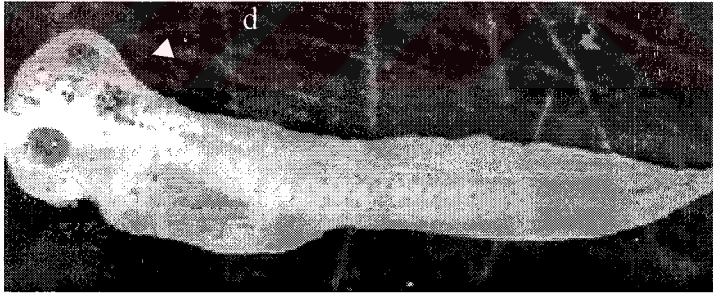
EK 2. Astrazon mavisine maruz kalan embriyolarda 96. saat sonunda gözlenen malformasyonlara bazı örnekler (M.B.: Mikroskop Büyütmesi, a: Mikroftalmi, b:Yolk Ödemi, c:Kuyruk Eğriliği, d: Mikrosefali).



a- 56.97 ppm (M.B. 20x10x)



b- 648.99 ppm (M.B. 20x10x)



c- 2190.34 ppm (M.B. 20x10x)

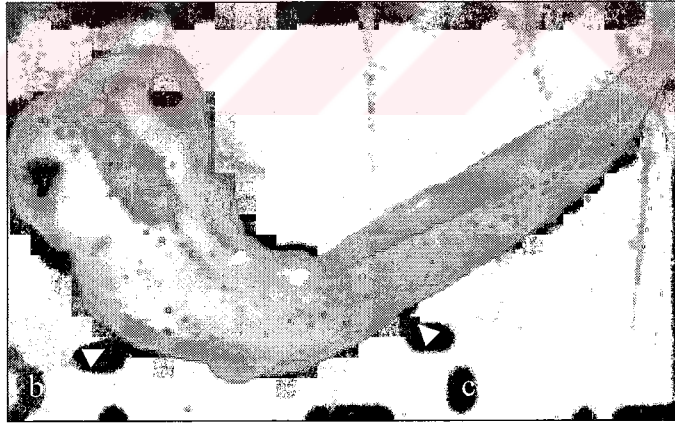
Ek 3. Remazol kırmızısına maruz kalan embriyolarda 96. saat sonunda gözlenen malformasyonlara bazı örnekler (M.B.: Mikroskop Büyütmesi, a: Mikroftalmi, b:Yolk Ödemi, c:Kuyruk Eğriliği, d: Mikrocefali, e: Depigmentasyon).



a- 73.79 ppm (M.B. 20x10x)



b- 103.31 ppm (M.B. 20x10x)

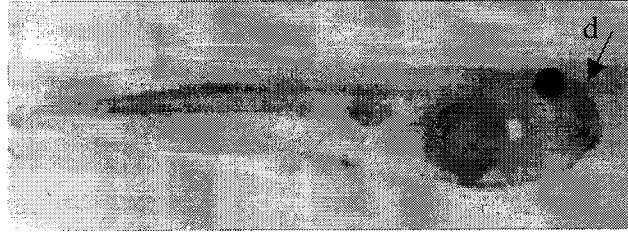


c- 144.63 ppm (M.B. 20x10x)

EK 4. Remazol mavisine maruz kalan embriyolarda 96. saat sonunda gözlenen malformasyonlara bazı örnekler (M.B.: Mikroskop Büyütmesi, a: Mikroftalmi, b:Yolk Ödemi, c:Kuyruk Eğriliği, d: Mikrosefali, e: Depigmentasyon, f: Baş Ödemi).



a- 384.36 ppm (M.B. 20x10x)

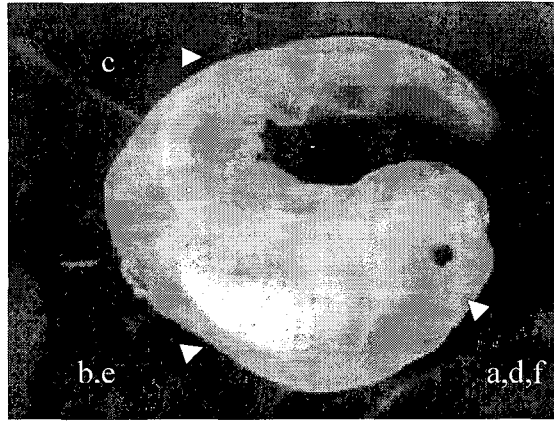


b- 576.54 ppm (M.B. 12.5x10x)

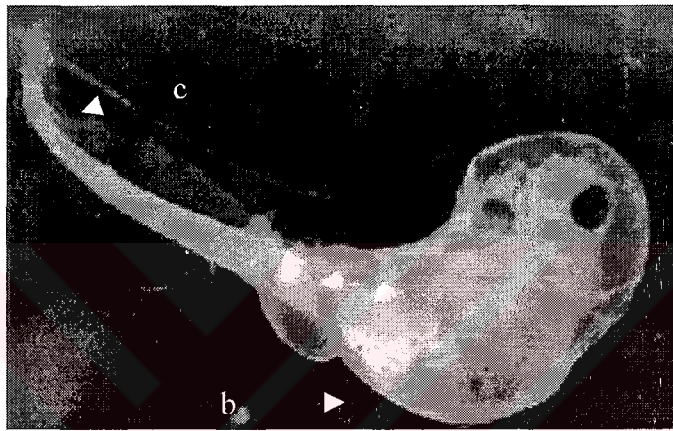


c- 576.54 ppm (M.B. 20x10x)

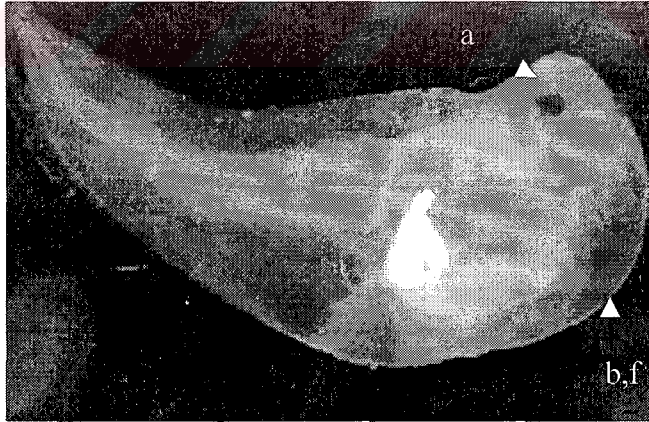
EK 5. Cibacron kırmızısına maruz kalan embriyolarda 96. saat sonunda gözlenen malformasyonlara bazı örnekler (M.B.: Mikroskop Büyütmesi, a: Mikroftalmi, b:Yolk Ödemi, c:Kuyruk Eğriliği, d: Mikrosefali, e: Depigmentasyon, f: Baş Ödemi).



a- 5 ppm (M.B. 20x10x)



b- 7.5 ppm (M.B. 20x10x)



c- 37.96 ppm (M.B. 20x10x)

EK 6. Cibacron mavisine maruz kalan embriyolarda 96. saat sonunda gözlenen malformasyonlara bazı örnekler (M.B.: Mikroskop Büyütmesi, a: Mikroftalmi, b:Yolk Ödemi, c:Kuyruk Eğriliği, d: Mikrosefali, e: Depigmentasyon, f: Baş Ödemi).



(M.B.: 12.5x10x)



(M.B.: 12.5x10x)

EK 7. FETAX çözeltisinde bırakılan kontrol grubu iribaşlara örnek
(M.B.: Mikroskop Büyütmesi)

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ayşe (Yavaş) BİRHANLI
Doğum Yeri ve Tarihi : Kavaklıdere (Muğla)-01.04.1971
Mesleği ve Durumu : Biyolog- Araştırma Görevlisi

EĞİTİM

İlkokul : 50. Yıl İlkokulu (Aydın)
Ortaokul-Lise : İncirliova Lisesi (Aydın)
Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı
Doktora : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

ÇALIŞTIĞI KURUMLAR

Eylül 1993.... : İnönü Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Fen Bilgisi Öğretmenliği, Araştırma Görevlisi

BİLİMSEL FAALİYETLER

- 1- A. Yavaş, Dışsal Olarak Uygulanan Absisik asit (ABA) ve Gibberellik asit (GA₃) Uygulanan Swiss-Albino Farelerin (*Mus musculus* L.) Karaciğer, Böbrek ve Beyin Dokularında Analizi, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 1995, Malatya.
- 2- A. Yavaş, Ş.F. Topcuoğlu, M. Özmen, Absisik asit (ABA) ve Gibberellik asit (GA₃) Uygulanan Swiss-Albino Farelerin (*Mus musculus* L.) Karaciğer, Böbrek ve Beyin Dokularında Analizi, XIII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 17-20 Eylül 1996, İstanbul.
- 3- A. Yavaş, M. Özmen, S.F. Topcuoğlu, Analysis of Gibberellik acid, Abscisic acid, Indol-3-acetic acid and Zeatin from the selected tissues of Albino mice, Toxicological and Environmental Chemistry, Vol.59 (1996) pp.251-260.
- 4- A. Birhanlı, A. Güngördü, M. Özmen, Astrazon Grubundan İki Tekstil Boyasının *Xenopus laevis* üzerine Toksik Etkilerinin Araştırılması, XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi, 4-7 Eylül 2002, Malatya.
- 5- Yüksek bitkilerin gövde çeliklerinde köklenme kapasitesinin iç ve dış faktörlerle ilişkisi ve sentetik büyüme maddelerinin (IAA ve 2,4 D) bu yöndeki etkisi (Seminer).
- 6- Toksikasyon ve Detoksifikasyon (Seminer).