T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# YUMURTAYA VERİLEN BİSFENOL A (BPA)' NIN TESTİSLERİN GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN IŞIK MİKROSKOBİK SEVİYEDE BELİRLENMESİ

**Banu KANDİL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI**

**Danışman**
**Prof. Dr. Emrah SUR**

**KONYA-2016**

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# YUMURTAYA VERİLEN BİSFENOL A (BPA)' NIN TESTİSLERİN GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN IŞIK MİKROSKOBİK SEVİYEDE BELİRLENMESİ

**Banu KANDİL**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI**

**Danışman**
**Prof. Dr. Emrah SUR**

**KONYA-2016**

## ÖNSÖZ

Kanatlılarda erken embriyonik dönemde gonadlar bilateral olup histolojik olarak ileride tunika albugineayı oluşturacak olan ince bir korteks tabakası ile bu tabakanın çevrelediği medulla bölgesinden oluşmaktadır. Erkeklerde medullada bulunan primer seks kordonları seminifer tübüllere dönüşürek testis dokusuna gelişirken dişilerde ise korteks farklılaşarak ovaryum dokusuna gelişir. Kanatlı hayvanlarda sadece sol gonad ovaryum olarak gelişirken, erkeklerde her iki gonad testis dokusuna dönüşür.

Kanatlı hayvanlarda memelilerden farklı olarak östrojen hormonu gonadların gelişmesinde ve farklılaşmasında kritik bir rol oynar. Östrojen konsantrasyonu testosteron seviyesinden fazla ise sol gonad ovaryum dokusuna dönüşürken bunun tersi durumda ise testisler gelişir. Bu nedenle embriyonik süreçte östrojen konsantrasyonunda meydana gelen farklılıklar erkek embriyolarda testisin ovaryum dokusuna benzer bir dokuya dönüşmesine sebep olabilmektedir.

Bisfenol A [2,2-bis (4-hidroksifenil)] propan, sanayide birçok amaçla üretilen ürünlerde ham madde olarak kullanılan östrojenik etkili bir maddedir. BPA' nın kimyasal yapı formülü endojen östrojen hormonu (17_östradiol) ile kıyasladığında aralarında hiçbir benzerlik yoktur ve sahip olduğu zayıf östrojenik etki nedeniyle de östrojenlerin aktivitesini artırabilir, baskılayabilir, östrojenleri taklit edebilir veya östrojen nükleer hormon reseptörünün aktivasyonunu bozabilir.

Plastik sanayide yaygın olarak kullanılan BPA' nın çok geniş kullanım alanının olması günlük hayatta canlıların BPA ile maruziyetini arttırmakta ve insan sağlığını tehdit etmektedir. Özellikle embriyonik dönemde veya erken gelişim döneminde bu maddeye maruz kalma başta üreme sistemi olmak üzere diğer sistemler üzerinde de kalıcı fonksiyonel ve morfolojik bozukluklara sebep olabilir. Yukarıda da bahsedildiği gibi memelilerden farklı olarak kanatlılarda seksüel farklılaşma sürecinde östrojen hormonunun üstlenmiş olduğu kritik rol nedeniyle, BPA gibi östrojenik etkili maddelerin etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda kanatlı embriyoları tercih edilmektedir.

Sunulan bu çalışmada BPA' nın tavuk embriyolarının testis gelişimi üzerindeki etkilerinin ışık mikroskobik düzeyde incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK)' nun 29.01.2016 tarih ve 2016/11 sayılı etik kurul onayı alınarak gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans eğitim sürecinde gerek bilimsel gelişmemde gerekse tez konumun belirlenmesinde, düzenlenmesinde, yürütülmesinde ve tez sonuçlarının yorumlanmasında akademik bilgi ve deneyimleri ile büyük katkıları olan ve aynı zamanda hayatımın her aşamasında değerli fikirleri ile bana yol gösteren, manevi desteğini benden esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Emrah SUR' a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimi sürecinde bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, tez çalışmamda bana her türlü yardım ve destekte bulunan başta Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ olmak üzere, Anabilim Dalımız Öğretim Üyeleri Prof. Dr. İlhami ÇELİK, Prof. Dr. Yasemin ÖZNURLU, Doç. Dr. Murat BOYDAK, Doç. Dr. Tuğba ÖZAYDIN, S.Ü Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Haluk ÖZPARLAK, laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan Araş. Gör. İlknur ÜNDAĞ ile Yüksek Lisans Öğrencisi Didem YILMAZ' a ve damızlık yumurtaları temin eden Alternatif Veterinerlik Yem Gıda ve Hayvancılık San. Tic. Ltd. Şti. sahibi Veteriner Hekim Hakan KONYA’ ya teşekkür ederim.

Bütün eğitim hayatım boyunca manevi desteklerini hiç esirgemeyen canım aileme çok teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

**SİMGELER VE KISALTMALAR ..... vi**

**1.GİRİŞ ..... 1**

1.1. Kanatlılarda Testis Dokusu ..... 2
1.1.1. Kanatlılarda Testislerin Anatomisi ..... 2
1.1.2. Kanatlılarda Testislerin Histolojik Yapısı ..... 3
1.1.3. Kanatlılarda Testislerin Histofizyolojisi ..... 4
1.1.4. Kanatlılarda Seminifer Tubullerin Histolojik Yapısı ..... 5
1.1.5. Seminifer Tubullerde Yer Alan Hücreler ..... 6
1.1.6. Kanatlı Hayvanlarda Gonadların Embriyonik Gelişimi ..... 9
1.2. Endokrin Bozucular ..... 12
1.3. Bisfenol A ..... 14
1.3.1. Bisfenol A' nın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri ..... 14
1.3.2. Bisfenol A' nın Üretim ve Kullanım Alanları ..... 14
1.3.3. Bisfenol A' nın Çevresel Yayılımı ..... 15
1.3.4. Organizmaların Bisfenol A ile Temas Yolları ..... 16
1.3.5. Halk Sağlığı Açısından Bisfenol A' nın Önemi ..... 16
1.3.6. Bisfenol A' nın Biyolojik Etkileri ..... 17
1.3.7. Bisfenol A' nın Östrojenik Etkisi ..... 18
1.3.8. Kanatlı Hayvanların Üreme Sistemine Bisfenol A' nın Östrojenik Etkisi 19

**2. GEREÇ VE YÖNTEM ..... 21**

2.1. Yumurtaya Enjekte Edilecek Solüsyonların Hazırlanması ..... 21
2.1.1. Taşıt Maddenin Hazırlanması ..... 21
2.1.2. Etken Maddenin Hazırlanması ..... 21
2.2. Yumurtaların Hazırlanması ..... 21
2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Enjeksiyon İşlemleri ..... 21
2.4. Yumurtaların Açılması ve Doku Örneklerinin Alınması ..... 22
2.5. Enzimhistokimyasal Yöntemler ..... 23
2.5.1. Alfa Naftil Asetat Esteraz (ANAE) Enzimi Demonstrasyonu İçin İnkübasyon Solüsyonunun Hazırlanması ..... 23
2.5.2. Asit Fosfataz (ACP-Az) Enzimi Demonstrasyonu İçin İnkübasyon Solüsyonunun Hazırlanması ..... 23
2.6. Histometrik Ölçümler ..... 23
2.6.1. Yüzey Alanı Ölçümleri ..... 24
2.6.2. Korteks Kalınlığı Ölçümleri ..... 24
2.6.3. Seminifer Tubul Çapı Ölçümleri ..... 24

2.6.4. İstatistiki Analizler ..... 24
**3. BULGULAR ..... 25**
3.1. İnkübasyonun On Üçüncü Günü ..... 25
3.1.1. Morfolojik Bulgular ..... 25
3.1.2. Histolojik Bulgular ..... 25
3.2. İnkübasyonun On Sekizinci Günü ..... 29
3.2.1. Morfolojik Bulgular ..... 29
3.2.2. Histolojik Bulgular ..... 29
3.3. İnkübasyonun Yirmi Birinci Günü (Kuluçkadan Çıkışın İlk Günü) ..... 32
3.3.1. Morfolojik Bulgular ..... 32
3.3.2. Histolojik Bulgular ..... 33
3.4. Histometrik Bulgular ..... 38
3.4.1. Testis Yüzey Alanı Sonuçları ..... 38
3.4.2. Seminifer Tubül Çapı Sonuçları ..... 39
3.4.3. Korteks Kalınlığı Sonuçları ..... 39
3.5. Enzim Histokimyasal Bulgular ..... 39
3.5.1. Alfa Naftil Asetat Esteraz (ANAE) Enzimi Demonstrasyonu Sonuçları ..... 39
3.5.2. Asit Fosfataz (ACP-Az) Enzimi Demonstrasyonu Sonuçları ..... 41
3.6. Pappenheim'ın Panoptik Boyaması Sonuçları ..... 42
**4. TARTIŞMA ..... 45**
**5. SONUÇ VE ÖNERİLER ..... 56**
**6. KAYNAKLAR ..... 57**
**7. EKLER ..... 62**
EK A: Etik Kurul Kararı ..... 62
**8. ÖZGEÇMİŞ ..... 63**

## SİMGELER VE KISALTMALAR

**ABP**: Androjen Bağlayıcı Protein

**ABD:** Amerika Birleşik Devleti

**ACP-az:** Asit Fosfataz Enzimi

**$AFB_1$:** Aflatoksin $B_1$

**AK**: Adluminal Kompartman

**AMH:** Anti_Müllerian Hormon

**ANAE:** Alfa Naftil Asetat Esteraz

**atm:** atmosfer

**BD:** Bağ Doku

**BK:** Bazal Kompartman

**BPA:** Bisfenol A

**BPAG:** BPA-glukronit

**BPAS:** BPA-sülfat

**CHEST:** Tavuk Embriyotoksisitesi Belirleme Testi

**cm:** santimetre

**DDT:** Dikloro Difenol Trikloroetan

**DES:** Dietilstilbestrol

**$dm^3$:** desimetre küp

**EB**: Endokrin Bozucu

**ERα:** Östrojen Reseptör alfa

**ERβ:** Östrojen Reseptör beta

**FSH**: Folikül Uyarıcı Hormon

**g:** gram

**GSI:** Gonadosomatik Indeks

**HCl:** Hidro Klorik Asit

**kg:** kilogram

**L:** litre

**m:** metre

**µg:** mikrogram

**mL:** mililitre

**µL:** mikrolitre

**mm:** milimetre

**NaF:** Sodyum Florid

**NaOH:** Sodyum Hidroksit

**ng:** nanogram

**PAS:** Periyodik Asit Schiff

**PCBs:** Poliklorine Bisfeniller

**s:** Spermatogonyumlar

**ST:** Seminifer tubul

**STLu:** Seminifer tubul lümeni

**TDI**: Tolere edilebilir günlük alım miktarı

## ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER LİSTESİ

**Şekil 1.1.** Kaynaklarına göre endokrin bozucular

**Şekil 3.1.** İnkübasyonun on üçüncü gününde kontrol grubundan bir embriyoya ait testis dokusu kesiti

**Şekil 3.2.** İnkübasyonun on üçüncü gününde kontrol grubundan bir embriyoya ait testis dokusu kesiti

**Şekil 3.3.** İnkübasyonun on üçüncü gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir embriyoya ait testis dokusu kesiti.

**Şekil 3.4.** İnkübasyonun on üçüncü gününde 100 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir embriyoya ait testis dokusu kesiti

**Şekil 3.5.** İnkübasyonun on üçüncü gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir embriyoya ait testis dokusu kesiti.

**Şekil 3.6.** İnkübasyonun on üçüncü gününde 100 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir embriyoya ait testis dokusu kesiti.

**Şekil 3.7.** İnkübasyonun on sekizinci gününde kontrol grubundan bir embriyoya ait testis dokusu kesiti.

**Şekil 3.8.** İnkübasyonun on sekizinci gününde 50 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir embriyoya ait testis dokusu kesiti.

**Şekil 3.9.** İnkübasyonun on sekizinci gününde 100 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir embriyoya ait testis dokusu kesiti.

**Şekil 3.10.** İnkübasyonun on sekizinci gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir embriyoya ait testis dokusu kesiti

**Şekil 3.11.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait testislerin kesiti

**Şekil 3.12.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 100 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir civcive ait testislerin kesiti.

**Şekil 3.13.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait testis dokusu kesiti

**Şekil 3.14.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol gruplarından çözücü-kontrol grubuna ait bir civcivin testis dokusu kesiti.

**Şekil 3.15.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait testis dokusu kesiti.

**Şekil 3.16.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol gruplarından çözücü-kontrol grubuna ait bir civcivin testis dokusu kesiti.

**Şekil 3.17.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir civcive ait testis dokusu kesiti.

**Şekil 3.18.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 100 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir civcive ait testis dokusu kesiti.

**Şekil 3.19.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait testis dokusu kesiti.

**Şekil 3.20.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 100 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir civcive ait testis dokusu kesiti.

**Şekil 3.21.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait testis dokusunun kriyostat kesiti

**Şekil 3.22.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir civcive ait testis dokusunun kriyostat kesiti

**Şekil 3.23.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait testis dokusunun kriyostat kesiti.

**Şekil 3.24.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait testis dokusunun kriyostat kesiti

**Şekil 3.25.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir civcive ait testis dokusunun kriyostat kesiti.

**Şekil 3.26.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait testis dokusunun kriyostat kesiti

**Şekil 3.27.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir civcive ait testis dokusunun kriyostat kesiti.

**Şekil 3.28.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 50 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir civcive ait testis dokusunun kriyostat kesiti

**Çizelge 1.1.** Bisfenol A' nın genel özellikleri

**Çizelge 3.1.** Kuluçkadan çıkış gününde testislerde yapılan ölçümler

# ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## YUMURTAYA VERİLEN BİSFENOL A (BPA)' NIN TESTİSLERİN GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN IŞIK MİKROSKOBİK SEVİYEDE BELİRLENMESİ.

**Banu KANDİL**
**Histoloji ve Embriyoloji (Vet) Anabilim Dalı**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ/ KONYA-2016**

Bu çalışmanın amacı Bisfenol A (BPA)′ nın kanatlı embriyolarında testis gelişimi üzerindeki etkisini belirlemektir.

Bu amaçla Isa Brown ırkı yumurtacı tavuklara ait 300 adet döllü yumurta kontrol (K), taşıyıcı kontrol (TK), 50 (D1), 100 (D2), 250 (D3) µg/yumurta BPA olmak üzere 5 gruba ayrıldı. Test solüsyonları inkübasyondan önce yumurta sarısına enjekte edildi. İnkübasyonun 13. 18. ve 21. günlerinde her gruptan 6 adet canlı erkek embriyo elde edilene kadar yumurtalar açıldı. BPA' nın östrojenik ve gelişimsel etkileri belirlemek için tüm histolojik değerlendirmeler ve histometrik ölçümler sol testis doku kesitleri üzerinde gerçekleştirildi.

İnkübasyonun 13. 18. ve 21. günlerinde BPA uygulanan gruplarda testis dokularında gelişme geriliği, az sayıda hücre kordonu ve zayıf hücresel organizasyon gözlendi. İnkübasyonun 21. gününde deney grupları ve kontrol grupları arasında seminifer tubul çaplarında belirgin bir farklılık tespit edildi (K: 38,81±0,40µm; TK: 38,41±0,43µm; D1: 29,07±0,45µm; D2: 28,75±0,47µm; ve D3: 28,06±0,46µm ,$p<0,05$). Deney gruplarında seminifer tubul çaplarının azaldığı ve aynı zamanda seminifer tubul organizasyonun bozulduğu gözlendi. Kontrol gruplarına kıyasla deney gruplarında korteks kalınlığında artış gözlendi ve en belirgin artışın 50 ve 100 µg/yumurta dozunda BPA uygulanan gruplarda olduğu belirlendi (K: 14,72±0,23µm; TK: 15,78±0,27µm; D1: 20,40±0,33µm; D2: 20,68±0,36µm; D3: 18,22±0,38µm, $p<0,05$). Kontrol grupları (K: 697106,56±38257,85µm$^2$; TK: 664742,36±30269,02µm$^2$) ve 250 µg/yumurta dozunda BPA uygulanan grupla (586920,07±15509,13µm$^2$) karşılaştırıldığında 50 (840774,62±37355,58µm$^2$) ve 100 µg/yumurta (857630,05±22990,35µm$^2$) dozunda BPA uygulanan gruplarda testis yüzey alanında önemli bir artış tespit edildi ($p<0.05$). Kanatlı embriyolarında 50 ve 100 µg/yumurta dozunda BPA uygulanan gruplarda BPA' nın sol testis yüzey alanı ile korteks kalınlığını artırarak ovo-testis gelişimini tetiklediği buna karşın 250µg/yumurta dozunda uygulanan BPA' nın ise toksik etkiye sahip olduğu görüldü. Gruplar arasında ANAE ve ACP-az boyamasında belirgin bir farklılık yoktu

BPA' nın kanatlı embriyoların testislerinin gelişiminde maruz kalınan doza bağlı olarak hem toksik hem de östrojen benzeri etkilere sebep olabileceği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** ACP-ase; ANAE; BPA; kanatlı embriyo; testis

## SUMMARY

REPUCLIC of TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCE INSTITUTE

# THE LIGHT MICROSCOBIC INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF IN OVO ADMINISTRATED BISPHENOL A (BPA) ON THE DEVELOPMENT OF TESTES.

**Banu KANDİL**
**Department of Histology and Embryology (Vet)**

**MASTER THESIS/KONYA-2016**

The aim of this study was to determine the effects of BPA on testes development in avian embryos.

For this purpose, 300 fertile eggs of Isa Brown laying parent stock were divided into 5 groups as control (C), vehicle-control (VC), 50 (E1), 100 (E2), and 250 µg/egg (E3) BPA. Test solutions were injected into yolk before incubation. At the 13$^{th}$, 18$^{th}$ and 21$^{th}$ days of incubation, the eggs from each group were opened until 6 living male embryos were obtained from each group. All histological evaluation and histometrical measurement were performed on left testes to examine for both estrogen-like and developmental effects of BPA.

On the 13$^{th}$, 18$^{th}$, and 21$^{th}$ days of the incubation, the groups that were treated with BPA observed growth retardation in testicular tissues, fewer cell cords and weak cellular organization. At 21$^{th}$ days of the incubation, there was a significant difference in diameter of seminiferous tubule between control groups (C: 38,81±0,40µm and VC: 38,41±0,43µm) and experimental groups (E1: 29,07±0,45µm; E2: 28,75±0,47µm and E3: 28,06±0,46µm, $p<0,05$). The experimental groups showed a decrease in the diameter of their seminiferous tubules and also disrupted the organization of the seminiferous tubules. The increase in cortical thickness compared to the control groups was observed in the BPA treated groups but the most notable increases were observed at 50 µg/egg and 100 µg/egg BPA treated groups (C: 14,72±0,23µm; VC: 15,78±0,27µm; E1: 20,40±0,33µm; E2: 20,68±0,36 µm; E3: 18,22±0,38µm, $p<0,05$). The testes surface area was higher at 50 µg/egg (840774,62±37355,58µm$^2$) and 100µg/egg (857630,05±22990,35µm$^2$) BPA treated groups compared to the control groups (C: 697106,56±38257,85µm$^2$; VC: 664742,36±30269,02µm$^2$) and at 250 µg/egg BPA administrated group (586920,07±15509,13 µm$^2$). In 50 and 100 µg/egg BPA treated birds, BPA triggered ovotestis growth by characterizing increased surface area and cortical thickening whereas BPA had toxic effects at 250 µg/egg. There were no distinct differences ANAE and ACP-ase staining pattern between the groups.

It was concluded that BPA can induce both estrogen-like and toxic effects in the developing testes of chicken embryos in dose-dependent manner.


**Key Words:** ACP-ase; ANAE; BPA; chicken embryo; testes

# 1.GİRİŞ

Canlı neslinin sürekliliği, üreme fonksiyonu ile sağlanır. Bu fonksiyonu gerçekleştiren organlara ise üreme organları adı verilir. Üreme ile ilgili fonksiyonları yerine getiren ve ilgili seks hormonlarını salgılayan organların oluşturduğu bütüne de üreme sistemi denir. Üremede erkek ve dişinin işlevlerine uygun olarak üreme organları; şekil, konum ve yapı bakımından dişi ve erkekte farklılıklar gösterir (Halldin 2005).

Dişi üreme sistemi bilateral yerleşimli ovaryum, tuba uterina (ovidukt), uterus, serviks ve vaginayı içeren iç genital organlar ile vestibül, labiyumlar, klitoris ve vestibüle açılan bezlerden oluşan dış genital organlardan ibarettir. Dişi üreme sistemi haploid dişi gamatleri (oosit II) üretip, haploid erkek gametlerle (spermatozoa) birleşmesi için gerekli ortamı sağlamanın yanı sıra oluşan embriyonun implantasyonu için gerekli hormonları salgılar ve doğuma kadar gelişimini destekler. Söz konusu organlar aynı zamanda salgıladığı hormonlar ile genital siklusu düzenler ve diğer organlar üzerinde etkili olurlar (Erdost 2011).

Erkek üreme sistemini ise; spermatozoon (spermiyum) ve erkek cinsiyet hormonları üreten testisler, üretilen spermatozoonların depolanmasını ve iletilmesini sağlayan kanallar, seminal sıvı adı verilen besleyici ve taşınmayı kolaylaştıran salgı yapan eklenik genital bezler ile spermayı dişi kanalına aktaran penis oluşturur (Ergün 2011).

Erkek kanatlıların üreme sistemi memelilere kıyasla daha basit bir yapı gösterir. Bir çift testis ve küçük epididimisler, kloakanın urodeumuna açılan uzun sarmallanmış duktus deferensler ve kloakadaki erektil yapılardan oluşur. Memelilerde spermlerin depo edildiği ve hareket yeteneğini kazandıkları epididimis, kanatlılarda oldukça kısadır. Kanatlılarda esas sperm depo edilen bölüm ise duktus deferenstir. Buna ek olarak kanatlı spermleri duktus deferenste olgunlaşır ve fertilizasyon yeteneğini kazanırlar. Ayrıca memelilerdeki penisin karşılığı olarak da deve kuşu, kuğu ve kaz gibi hayvanlarda "fallus" adı verilen bir organ söz konusudur ki bu organ da penisten farklı olarak kan ile değil lenfatik sıvı ile erekte olur. Yine önemli bir farklılık olarak semen sıvısı penil üretra olarak adlandırılabilecek herhangi bir kanaldan yoksun olduğu için fallusun dış yüzünden akıtılır (Hodges 1974, Kirby ve Froman 2000, Razi ve ark 2010).

Memelilerde ejekulasyondan önce testis, epididimis ve duktus deferens sıvılarını içeren semen sıvısının hem asiditesi yüksek, hem de besin öğelerinden fakir olduğu için içerdiği spermler epididimis ve duktus deferenste infertildirler. Ejekulasyondan hemen önce kanatlılarda bulunmayan eklenik genital bezlerden salgılanan sıvılar pH değerini bir miktar yükselttikleri gibi besin maddelerini de sıvıya eklerler. Kapasitasyon olarak adlandırılan bu süreç sonunda memeli spermleri fertilizasyon özelliği kazanırlar. Kanatlılarda ise fertilizasyon için spermlerin kapasitasyonuna gerek yoktur. Zira kanatlı spermleri duktus deferenste fertilite kazanmışlardır (Hodges 1974, Van Krey 1993, Kahvecioğlu ve Çalışlar 2002).

Memelilerde erkek genital kanalda aylarca yaşayan spermler, ejakulasyondan sonra vücut sıcaklığında bile ancak 24-72 saat kadar yaşayabilirler. Kanatlı spermleri ise dişi genital kanala aktarıldıktan sonra günler hatta haftalarca fertilizasyon yeteneklerini korurlar (Hodges 1974, Kirby ve Froman 2000, Erdost 2011).

## 1.1. Kanatlılarda Testis Dokusu

### 1.1.1. Kanatlılarda Testislerin Anatomisi

Kanatlılarda karın boşluğu içerisinde yerleşen testisler bir çift olup, fasülye biçimindedir. Puberte öncesi sarımsı beyaz ya da siyahımsı olan renk seksüel aktivitenin başlamasıyla birlikte beyaza doğru değişir. Ancak Avustralya tepeli papağanı gibi bazı türlerde (cockatoo) siyaha yakındır. Kranio-ventral olarak böbreğin kranial kısmına doğru uzanan testisler, kaudalde V.iliaca' ya ulaşır. Kranial olarak akciğerin ventral yüzü ile ilişkidedirler. Medial olarak ise aorta, V.cava caudalis ve adrenal beze yakın bir yerleşim gösterirler. Testis kısa bir mezenteryumla aorta ve böbreğin arasında sölom çatısına bağlanır. Mezenteryum testisin ventral yüzüne bağlıdır ve böylece epididimisi ventralinden örter (Hodges 1974).

Üreme mevsimi boyunca horozların testisi 35-60 mm uzunluğunda, 25-30 mm çapındadır. Tüy dökme döneminde (inaktif dönemde) bu değerler sırasıyla 10-19 mm ve 10-15 mm olarak gerileme gösterir (Kahvecioğlu ve Çalışlar 2002).

Kanatlı hayvanlarda sol testis, sağ testinden daima büyüktür. Erkek kazda üreme döneminde sağ testisin 11-20 mm uzunluğunda ve 8-17 mm genişliğinde iken, sol testisin 16-32 mm uzunluk ve 9-21 mm genişliğinde olduğu belirlenmiştir. Üreme

dönemi dışında ise sağ testis 4-7 mm uzunluğunda, 3-4 mm genişliğinde iken, sol testis 9-12 mm uzunluk ve 3-5 mm çapındadır (Kahvecioğlu ve Çalışlar 2002).

Frey ve Goymann (2009)' ın Afrika siyah guguk kuşlarında yaptıkları bir çalışma, kanatlılardaki testis asimetrisi açısından oldukça istisnai bir durumu ortaya koymaktadır. Dişileri birden fazla erkekle çiftleşen bu türde kuluçka ve yavru bakımı sürecinin hemen tamamı sadece sağ testisi aktif olan erkek kuş tarafından üstlenilmiştir. Sol testis ve epididimis makraskobik olarak görülmezken, mikroskop altında da doku kalıntısı olarak tespit edilmişlerdir. Az sayıda Sertoli hücresi içermesine karşın spermatogoniyumları bulundurmayan az sayıdaki seminifer tubullerin çevresindeki intersitisyel dokuda da yine az sayıda Leydig hücresinin yer aldığı bildirilmiştir.

Okpe ve ark (2010)' nın Nijer ırkı erişkin horozlarda yaptıkları bir çalışmada ortalama vücut ağırlığını 977 gr, ortalama testis ağırlığını ise 6,30 gr olarak ölçerlerken, testis uzunluğunun 5,3 cm, testis genişliğinin ise 2,7 cm olduğu bildirilmektedir. Söz konusu araştırıcılar gonadosomatik indeks (GSI) olarak bilinen ve gonad ağırlığı/vücut ağırlığı X 100 şeklinde formüle edilen değerin yaklaşık olarak %1,1 olduğunu belirtirlerken, bu değerin memelilerden oldukça yüksek olduğunu, bu durumun da sperm üretimindeki etkinliğin bir göstergesi olabileceğini ileri sürmektedirler.

### 1.1.2. Kanatlılarda Testislerin Histolojik Yapısı

Kanatlılarda testis dokusu en dıştan peritonun viseral yaprağı olan tunika seroza ile örtülüdür. Bu katmanın hemen altında, testisin en kalın katmanı olan tunika albuginea yer alır. Düz kas hücreleri ve fibroblastlar ile kollajen iplik demetlerinden oluşan bu katman, memelilerinin aksine testis dokusu içerisine uzantılar göndermediği için, kanatlılarda testis dokusunda memelilerdeki gibi bir lopçuk yapısı ayırt edilmez (Al-Tememy 2010).

Testis kapsülünün fonksiyonu tam olarak bilinmeyip, tahmin ve varsayımlara dayalı olup bazı memelilerde testis kapsülü içinde yer alan düz kas hücrelerinin kasılmasının hareket yeteneği kazanmamış spermatozonların akıtıcı kanallara taşınmasında görev aldığı ileri sürülmüştür (Banks ve ark 2006).

Aire ve Ozegbe (2007)' nin yaptığı bir çalışmada bıldırcınlarda testis kapsül kalınlığı 81,5±13,7µm, yerli tavuklarda 91,7±6,2µm, horozlarda 104,5±29,8µm ve ördeklerde 91,8±18,9µm olarak bulunmuş ve testis kapsülünün memelilere kıyasla daha ince olduğu ileri sürülmüştür. Testis kapsül kalınlıklarındaki bu farklılıkların çalışmada kullanılan tespit metodları, tespit solüsyonları veya çalışma periyodunun süresinden kaynaklanıyor olabileceği ileri sürülmüştür (Aire ve Ozegbe 2007). Arenas ve ark (1997) testis kapsül kalınlığının yaşa bağlı olarak arttığını ama toplam hacminin değişmediğini göstermiştir.

### 1.1.3. Kanatlılarda Testislerin Histofizyolojisi

Kanatlı hayvanlarda dişilerde sadece sol ovaryum fonksiyonel iken erkeklerde testislerin her ikisi de fonksiyonel olup, sağ ve sol testisler sölom çatısının orta çizgisinin her iki kenarında simetrik olarak bulunmaktadır (Mattsson ve ark 2008). Her iki testis vücut içinde geliştikleri bölgede cavum abdominisde kalırlar ve 41-42 ℃ olan vücut ısısında fonksiyonlarını sürdürürler (Kahvecioğlu ve Çalışlar 2002). Bu yüzden spermatogenezis, memelilerdeki gibi 24-26 ºC' lik skrotum sıcaklığında değil, 41 ºC' deki vücut sıcaklığında gerçekleşir. Memelilerde pleksus pampiniformisler, funikulus spermatikusun içinde yer alan kan damarları ağı olup, testis sıcaklığının vücut sıcaklığının altında tutulmasını (termoregülaryon) sağlarlar. Bu kan damarları ağları (pleksus pampiniformisler) kanatlılarda bulunmaz (Kahvecioğlu ve Çalışlar 2002, Razi ve ark 2010). Kanatlılarda testisler, özellikle kranial ucunda abdominal hava keseleri ile kuşatılmıştır. Hava keseleri ve testislerin yan yana bulunmasının testislerin soğutulmasına yarayan bir yapı olduğu düşünülmektedir (Kahvecioğlu ve Çalışlar 2002). Ancak bu teorinin şüphe götürür olduğu yapılan deneysel bir çalışma ile ortaya konulmaya çalışılmıştır. Abdominal hava keseleri şirurjikal yolla çıkarılan horozların semen kalitesi değerlendirildiğinde kontrol grubu hayvanları ile aralarında belirgin bir fark görülmemiştir. Yine testiküler ve rektal ısı ile hava kesesine ait sıcaklıklar kıyaslandığında da önemli bir fark saptanamamıştır. Bu durumda horozlarda testisin hava keseleri tarafından serinletilmediği, germinatif epitelin yüksek vücut ısısına uyum sağlayarak bu ısıda bile normal spermatozoon üretmeye devam ettiği ileri sürülmüştür (Erdoğan ve Kılınç 2009).

Testislerin hem endokrin hem de ekzokrin fonksiyonları vardır. Seminifer tubullerde spermatozoon üretimi ekzokrin fonksiyon olarak kabul edilirken; intertubuler bağ dokusunda bulunan intersitisyel (Leydig) hücreleri tarafından testosteron üretimi de endokrin fonksiyondur (Deviche ve ark 2011).

### 1.1.4. Kanatlılarda Seminifer Tubullerin Histolojik Yapısı

Horozların testislerindeki seminifer tubuller memeli testislerindeki gibi belirgin ve düzgün seyreden yapılar olmayıp; testisin her tarafında birbirleriyle ileri derecede anastomozlaşarak sıkı ve yaygın bir ağ oluştururlar (Al-Tememy 2010). Horozlardaki seminifer tubullerin memelilerden farklı olarak testisin periferinde kör uç şeklinde başlamadığı, karmaşık, anastomozlaşan ağlar şeklinde olduğu birçok araştırmacının yaptığı detaylı diseksiyonlarla gösterilmiştir (Hodges 1974).

Seminifer tubullerin duvarını seminiferöz epitel hücreleri oluştururken; tubuluslar arası bölgede (peri tübüler alanlar, intersitisyum) Leydig hücreleri (intersitisyel hücreler) bulunur (Deviche ve ark 2011).

Seminifer tubuller kollagen iplikleri içeren ince bir tunika propriya ile sarılmıştır. Bunun içinde bazal membran yer alır ve bazal membranın üzerinde germinal epitel dikkati çeker. Germinal epitel farklı fonksiyona sahip iki tip hücreden ibarettir. Bunlardan Sertoli hücreleri destek hücreleri iken diğerleri ise germinal hücrelerdir. Bazal membrandan lümene doğru sırayla spermatogonyumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler ve olgunlaşan spermatozoonlar yer almaktadır (Nicholls ve Graham 1972, Aire 1997, Deviche ve ark 2011).

İmmatur hayvanlarda seminifer tubuller küçük olup, duvarı tek katlı epitelle döşelidir. Lan ve ark (2011)' nın yaptıkları bir çalışmada 1 günlük erkek deve kuşu civcivlerinde tam bir seminifer tubul yapısı gözlenmediği, ancak seminifer tubullere benzeyen tubiform yapıların dikkati çektiği ve bu yapıların çok sayıda primordial germ hücreleri ve az sayıda spermatogonyumları içerdiği belirlenmiştir. 30 günlük deve kuşu civcivlerinde ise tam bir seminifer tubul yapısının belirginleştiği ama şekillerinin düzensiz olduğu görülmüş, bu aşamada primordial germ hücrelerinin tamamen spermatogonyumlara farklılaştığı tespit edilmiştir. Aynı araştırıcılar 45 günlük deve kuşu civcivlerinde ise düzgün yapılı seminifer tubullerin ortaya çıktığını ve tubul duvarının bazal membran ve seminiferoz epitelden oluştuğunu

belirlemişlerdir. Bu epitelin Sertoli hücreleri ve 1-2 sıra spermatojenik hücre içerdiği, aynı zamanda myoid hücrelerden ve kollajen ipliklerinden oluşan bir bazal membran ile çevrili olduğu saptanmıştır.

Kanatlı hayvanlarda testis dokusunda tubuller arası anastomozların memelilere kıyasla daha fazla olduğu bildirilmektedir (Hodges 1974). Kumaran ve Turner (1949)' ın erkek civcilerde yaptığı bir çalışmada seminifer tubul çapının kuluçkadan çıkışı takip eden ilk gün 35 µm olduğu, erişkin dönemde ise 250 µm' ye ulaştığını tespit edilmiştir. Aynı araştırmacılar, tubullerin toplam uzunluğunu 8. günde 1,17 m ve 5. ayda 257,7 m olduğunu hesaplamışlar ve bu artışın da spermatogonyumların spermatidlere dönüşümü için yüzey alanının ileri derecede genişlediğinin bir göstergesi olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca 20 haftalık horoz testisinde seminifer tubullerin toplam uzunluğunun 250 m' den fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Okpe ve ark (2010)' nın Nijer ırkı erişkin horozlarda yaptıkları bir çalışmada tubuler yapıların testisin %96,6' sını oluşturduğu ve bu oranın memelilere kıyasla oldukça yüksek olduğu ifade edilmektedir. Söz konusu çalışmada ortalama tubuler uzunluk 308 m olarak tespit edilmiş ve bu değerin de memelilerle karşılaştırıldığında oldukça yüksek olduğu ileri sürülmüştür. Yine aynı çalışmada ortalama tubuler çapın 158,40 µm olduğu; bu değerin ise memelilere kıyasla oldukça düşük olduğu bildirilirken; seminifer tubul epitel yüksekliğinin de 56,00 µm olduğu tespit edilmiştir.

### 1.1.5. Seminifer Tubullerde Yer Alan Hücreler

#### Sertoli Hücreleri

İtalyan fizyolog Enrico Sertoli tarafından 1865 yılında ilk keşfedildikleri yıllarda "tree like cell" ya da "mother cell" olarak adlandırılan hücreler sonradan "Sertoli hücreleri" olarak literatüre geçmişlerdir (Sertoli 1865). Sustentakular hücreler olarak da adlandırılan Sertoli hücreleri genellikle germinal hücrelerin ve özellikle olgunlaşan spermatozoonların desteklenmesi ve beslenmesinden sorumlu hücrelerdir (Kirby ve Froman 2000, Al-Tememy 2010).

Sertoli hücreleri seminifer tubullerin bazal membranından lümenine doğru uzanan ince uzun hücrelerdir. Sertoli hücreleri, bazaline yakın olarak yerleşmiş oval

veya üçgen şekilli açık renkli çekirdeği ve belirgin iri çekirdekçiği ile tanınırlar. Ökromatik çekirdeğe sahip olması, hücrenin aktif olduğunu göstermektedir (Kirby ve Froman 2000, Al-Tememy 2010).

Sertoli hücreleri alt yan yüzlerinde (bazo-lateral) zonula okludens adı verilen bağlantı kompleksleri sayesinde birbirine tutunarak kan-testis bariyerini oluşturur. Bu bariyerin bazal membranla zonula okludensler arasında kalan bölümüne bazal kompartman (BK), zonula okludenslerden lumene kadar uzanan bölümüne ise adluminal kompartman (AK) denir. Spermatogonyumlar ve primer spermatositler bazal kompartmanda, sekonder spermatositler ve spermatidler adluminal kompartmanda yerleşmiştir. Her iki kompartmandaki erkek eşey hücreleri Sertoli hücrelerinin lateral oyuntularına yerleşirler. Erkek eşey hücreleri, kan testis bariyeri ile kan akımından izole edildiğinden besin maddesi ve metabolit alışverişinde Sertoli hücrelerine ihtiyaç duyar. Bu yüzden Sertoli hücreleri, spermatositler için destekleyici bir işleve sahiptir. Bu işlevi, dolaşım sistemi ile gelişme aşamalarındaki spermatositler arasında madde alışverişine aracılık ederek gerçekleştirirler. Sertoli hücre bariyeri aynı zamanda permeabilite bariyeri de oluşturduğundan, seminifer tubullerdeki sıvının bileşimi ile kan plazması ve testisin lenf sıvısının bileşimi birbirinden oldukça farklıdır. Dolaşımdaki antikorlar ve plazma proteinleri de seminifer tubullere giremezler. Aynı zamanda kan testis bariyeri, genetik olarak farklı ve bu yüzden antijenik olan haploid eşey hücrelerini erişkin erkeğin immün sisteminden izole etmek suretiyle immunolojik saldırıdan koruduğu gibi, sperme özgü veya sperm tarafından üretilen antijenlerin sistemik dolaşıma ulaşmasını da önler. Bu yüzden kan testis bariyeri, spermatogenik hücrelerin immün sistemden izole olmasında belirleyici rol oynar (Ergün 2011).

Sertoli hücrelerinin birçok görevi vardır. Bunlar;

-Gelişme aşamasındaki eşey hücrelerini desteklemek, korumak ve beslemek,

-Dejenere olan eşey hücrelerini ve gelişen eşey hücrelerinden arta kalan sitoplazma parçalarını fagosite etmek,

-Salgıladığı sıvı yardımıyla olgunlaşan spermatozoonların seminifer tubullerden diğer testis içi kanallara geçişini kolaylaştırmak,

-Hipofiz ön lobundan gelen folikül uyarıcı hormonun (FSH) kontrolü altında androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezi ile testosteronu bağlayarak seminifer tubullerin lumeninde yoğunlaşmasını ve spermatogenezisin sürekliliğini sağlamak,

-Salgıladığı inhibin hormonunun neden olduğu negatif geri bildirim (negative feedback) ile FSH sentezini ve salınmasını önlemek,

-Salgıladığı testiküler transferin ile plazma içinde bulunan demiri, gelişmekte olan spermatogenik hücrelere taşımak,

-Embriyonik süreçte, sentezlediği ve yaşam boyu salgılanan anti-Müllerian hormon (AMH) ile dişi genital sisteminin öncülü olan Müller kanallarının gelişimini engellemek olarak sıralanabilir (Ergün 2011).

Sertoli hücrelerinin sitoplazması çok sayıda germinal hücrelerin varlığı nedeniyle kolaylıkla ayırt edilememesine rağmen, germ hücrelerinin etrafında, arasında ve onlar ile yakın temas halindedir (Hodges 1974).

**Germ Hücreleri**

Yeni kuluçkadan çıkan bir civcivde, seminifer tubullerin duvarında bazal laminaya oturan germinal epitel katmanı bulunur. Bu epitelde, primordiyal germ hücrelerinden köken alan spermatogonyumlarla, indiferent gonatta gerçekleşen diferensiyasyon olayı esnasında primer cinsiyet hücresi kordonlarının içine giren destek hücreleri (sustentakular hücreler, Sertoli hücreleri) birlikte lokalize olurlar (Kirby ve Froman 2000, Lan ve ark 2011).

Spermatogonyumlar: Genellikle seminifer tubullerin periferinde bulunup, eliptik şekle sahiptirler. Sitoplazmaya ekzantrik olarak yerleşen, açık boyanan, oval şekilli çekirdeğe sahiptirler. Çekirdek içinde birkaç büyük çekirdekçik ve ince bir kromatin ağı bulunmaktadır (Hodges 1974).

Spermatositler: Spermatogonyumların bulunduğu tubullerin duvarına yakın olarak yerleşen primer spermatositler olgunlaşma bölünmesinin ilk aşamasını geçiren hücrelerdir. Testislerde bulunan en büyük eşey hücresi olan bu hücreler yuvarlak, belirgin bir çekirdekçik ve spermatogonyumlardan daha ince kromatin içeren büyük bir çekirdeğe sahiptirler. Sekonder spermatositler primer spermatositlerden belirgin

derecede küçük olup, spermatogonyumlardan ise biraz büyüktürler. Olgunlaşma bölünmesinin ikinci aşamasını geçiren sekonder spermatositlerin çekirdeği yuvarlak olup, kromatin dağınık bir yerleşim gösterir (Hodges 1974).

Spermatidler: Olgunlaşma bölünmelerinden sonra gelişen spermatidler, oldukça küçük, yuvarlak hücrelerdir. Küresel şekle sahip olan çekirdeğin içinde ince dağınık halde bulunan birkaç kromatin ağı vardır (Hodges 1974).

Seminifer tubullerin yanı sıra tubuller arası bağ dokuda Alman anatomist Franz Leydig tarafından 1850 yılında keşfedilen Leydig hücreleri bulunur (Leydig 1850). Yapısal olarak kanatlılarda ve memelilerde birbirine oldukça benzerdir. Özellikle geniş intersitisyel boşluklar içinde ya küçük gruplar şeklinde ya da tek tek bulunan Leydig hücrelerinin eşeysel olarak aktif kuşlarda ökromatik yapıda oval veya poligonal çekirdeğe sahip oldukları bildirilmektedir (Aire 1997, Al-Tememy 2010). Testisler endokrin fonksiyonlarını Leydig hücreleri tarafından erkeklik hormonu olan testosteronu salgılayarak gerçekleştirir. Hücrelerden salgılan testosteron gevşek bağ doku içerisindeki doku sıvısı yolu ile seminifer tubullere ve bu arada da az bir miktarı da doku kılcallarına geçer. Kılcal damarlar yoluyla dolaşıma geçen testosteron ise genital organların gelişimi ve sekonder erkeklik özelliklerinin ortaya çıkmasını sağlar (Ergün 2011).

### 1.1.6. Kanatlı Hayvanlarda Gonadların Embriyonik Gelişimi

**Seksüel farklılaşma**

Kanatlı hayvanlarda seksüel farklılaşma memelilerde olduğu gibi cinsiyet kromozomlarına bağlı iken seksüel farklılaşmanın genetik yapısı tam olarak bilinmemektedir (Halldin ve ark 2005). Memelilerde erkekler heterogametik olup XY kromozomuna sahip iken dişiler homogametik olup XX kromozomuna sahiptir. Kanatlılarda ise durum farklı olup erkekler homogametik özellikte olup ZZ kromozomuna sahip iken dişiler heterogametik olup ZW kromozomuna sahiptir (Lintelmann ve ark 2003). Memelilerde testis gelişiminde önemli rol oynayan SRY geni kanatlılarda bulunmayıp primer cinsiyet tayin edici sinyal belirsizdir (Brunström ve ark 2009). Memelilerde seksüel farklılaşmada görev alan bazı genler kanatlı hayvanlarda bulunmasına rağmen bu genlerin niteliği de belirlenememiştir (Shimada 2002).

Memelilerde fenotipik olarak bir erkeğin oluşması testosteron hormonuna bağlıdır. Y kromozomu üzerinde testosteron hormonun üretimini başlatan erkeğe özgü genlerin ekspresyonu ile testislerin gelişimi başlar ve testosteron hormonun yokluğuna bağlı olarak dişi karakterler gelişir. Kanatlılarda ise fenotipik olarak bir dişinin farklılaşmasında östrojen kritik bir rol oynar. Östrojen hormonunun yokluğuna bağlı olarak erkeksi karakterler gelişir. Seksüel farklılaşma boyunca östrojen sentezinin inhibisyonu ile genotipik olarak dişi olan birey fenotipik olarak bir erkeğe dönüşecektir (Berg ve ark 1999).

**Gonadların farklılaşması ve gelişimi**

Gonadlar, primordial germ hücrelerinin mezonefronun bir bölümünü örten sölomik epitele göç etmesi ile şekillenirler. Nakamura ve ark (2007)' nın Swift (1916)' dan bildirdiklerine göre kanatlılarda primordial germ hücrelerinin oogonyum ve spermatogonyumlara dönüşümü ise sırasıyla inkübasyonun 8 ve 13. günlerde gerçekleşmektedir.

Kanatlılarda seksüel farklılaşmadan önce gonadlar bilateral olup ince bir korteks ile çevrili medulladan oluşurlar (Brunström ve ark 2009). Erkeklerde medullada bulunan primer seks kordonları Sertoli hücreleri ve spermatositlerden oluşan seminifer tübüllere dönüşürken, dişilerde ise farklılaşarak kalınlaşan korteks çok sayıda oosit içerir. Dişi kanatlılarda sadece sol gonad ovaryum dokusuna gelişirken, erkeklerde her iki gonad testis dokusuna dönüşür. Seksüel olarak farklılaşmamış embriyolarda çift taraflı olarak Müller kanalları bulunur. Dişilerde seksüel farklılaşma ile birlikte sol taraftaki Müller kanalları gelişip farklılaşarak oviduktu oluştururken, sağ taraftaki Müller kanalı gerilemeye başlar (Halldin 2005). Müller kanalları testisler şekillendikten sonra kaudalden kraniale doğru gerilemeye başlar. Primer cinsiyet kanallarındaki Sertoli hücrelerinin progenitörleri tarafından üretilen AMH (Anti Müllerian Hormone) hormonu Müller kanalının gerilemesine neden olur. Erkeklerde Müller kanalının gerilemesinin nedeni dolaşımda AMH hormonu etkisini ortadan kaldırabilecek düzeyde östrojen hormonu bulunmamasıdır (Kirby ve Froman 2000).

Kanatlılarda sol gonadın ovaryum dokusuna mı yoksa testis dokusuna mı gelişeceğini östrojen konsantrasyonu belirler. Östrojen konsantrasyonu testosteron seviyesinden fazla ise sol gonad ovaryum dokusuna dönüşürken bunun tam tersi

durumda testis dokusuna gelişir. Dişilerde östrojen reseptör geni sadece sol gonadın korteks ve epitelinde sürekli olarak eksprese olurken, erkeklerde inkübasyonun 4.5 ve 12.5 günleri arasında sınırlı ve geçici olarak eksprese olur (Halldin ve ark 2005). Östrojen sentezi için gerekli olan P-450 aromataz enzimi gonadların seksüel farklılaşmasında sadece dişilerde eksprese edilir (Berg ve ark 1999). Gonadların ve kanalların, farklılaşma sürecinde östrojen seviyesinde meydana gelen değişikliklere karşı oldukça duyarlı oldukları ifade edilmektedir (Halldin 2005).

Testislerin kuluçkadan çıkıştan sonraki gelişmeleri ve spermatogenezis üç evrede gerçekleşir. Bu evreler evcil horozlarda 10-14. haftalara kadar ki prepubertal evre, 20-24. haftaya kadar süren pubertal evre ve takiben cinsel olgunluk evresidir (Van Krey 1993).

Yaklaşık olarak 0-6 haftalık genç horozların testis dokularını intersitisyel doku kaplamaktadır. Seminifer tubullerin bazal laminasında tek sıra şeklinde hücreler bulunmakta olup seminifer tubullerin büyük çoğunluğunu Sertoli hücreleri, spermatogonyumlar, makrofajlar ve mast hücreleri doldurmaktadır. Seminifer tubuller yaklaşık olarak 40µm çapa sahip olup oldukça küçüktür ve lümen yapıları çok az gelişmiştir. Bu dönemde içerdikleri hücrelerin çoğalmasıyla seminifer tubullerin uzunluğu hızla artarken, çapı yavaş bir şekilde artmaktadır. Somatik ve germ hücreleri sürekli çoğalmasına rağmen testis dokusunun ağırlığı ve hacmi yavaş bir şekilde artar çünkü seminifer tubuller intersitisyel doku ile yer değiştirmektedir (Kirby ve Froman 2000).

Prepubertal evre boyunca testis büyümesi ve gelişmesi oldukça yavaştır ve bu gelişme hızı vücut ağırlığı artışıyla doğru orantılıdır. Altı haftadan sonra gittikçe artan sayıda primer spermatosit üretilir ve indiferensiye durumdaki destek hücrelerinin (sustentakular hücreler, Sertoli hücreleri) proliferasyonu gerçekleşir (Van Krey 1993).

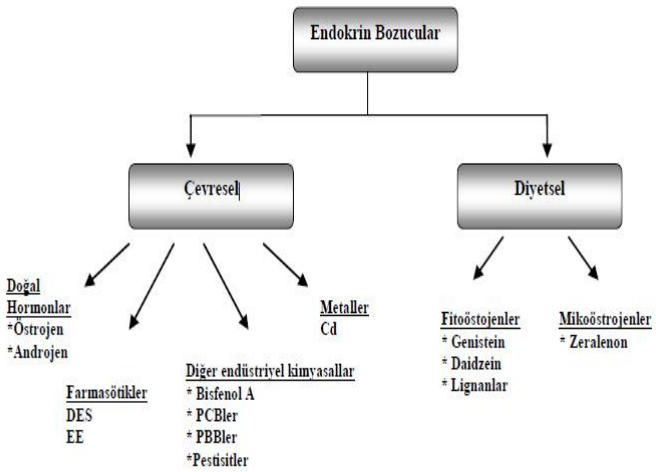
İkinci evre olan pubertal evrede testislerin büyüme ve gelişme hızı artar. Bu dönemde, primer spermatositler mayoz bölünmenin birinci evresini geçirir ve nispeten küçük olan sekonder spermatositleri oluşturular ki; bunlar da hızla mayoz bölünmenin ikinci evresini geçirerek toplam 4 adet spermatid oluşur. Spermatidler de metamorfoz geçirerek spermatozoonları oluştururlar (Van Krey 1993).

Spermatogenezisin üçüncü ve son evresi olan seksüel olgunlukta ise testisler büyüklüklerinin üst sınırına ulaşmışlardır. Ancak ilk spermadaki spermatozoon sayısı ve kalitesi düşüktür; bu yüzden gerçek cinsel olgunluk, spermatozoonların sayı ve kalitesinin en iyi olduğu ve testislerin büyümelerinin en üst sınıra ulaştığı dönem olarak kabul edilmelidir (Van Krey 1993).

## 1.2. Endokrin Bozucular

Endokrin bozucular, sağlıklı bir organizmada veya onun gelecekteki kuşağında endokrin sistemin çalışmasını değiştirerek, sağlık problemlerine sebep olan madde veya madde karışımlarıdır (Goldman ve ark 2000). Endokrin bozucular (EB), ilk olarak bundan yaklaşık 55 yıl önce 1962 yılında Rachel Carson' un pestisitlerin kuşlar üzerindeki zararlı etkilerini konu alan "Silent Spring" isimli eserinde gündeme gelmiştir (Carson 1962). Endokrin bozucuların oldukça yaygın kullanımları ve organizmada sebep oldukları zararlı etkilerinden dolayı bilim adamlarının ve sivil toplum örgütlerinin gündeminde önemli bir sorun olarak ele alınmıştır (Lintelmann ve ark 2003).

Endokrin bozucular kaynakları dikkate alındığında çevresel ve diyetsel kaynaklar olarak iki ana başlık altında sınıflandırılabilir (Şekil 1.1). Çevresel endokrin bozucular doğal hormonlar, farmasötikler, endüstriyel kimyasallar ve metaller; diyetsel endokrin bozucular ise fitoöstrojenler ve mikoöstrojenler olarak gruplandırılabilir (Hess-Wilson ve Knudsen 2006).




**Şekil 1.1.** Kaynaklarına göre endokrin bozucular.

Yapılan pek çok çalışmada insanların günlük hayatta sürekli endokrin bozuculara maruz kaldığı rapor edilmiştir. Günlük hayatta kullandığımız çoğu plastik eşyada, yediğimiz çoğu besinde, soluduğumuz havada, içtiğimiz suda, bitki yetiştirdiğimiz toprakta, temizlikte kullandığımız çoğu deterjanlarda, kişisel bakım ürünlerden doğum kontrol haplarına kadar hemen her yerde endokrin bozucular bulunmaktadır (Kabir ve ark 2015).

Endokrin bozucular; endojen hormonları taklit edip hormon sentezini ve hormonal fonskiyonları engelleme, depolonan hormonları serbest bırakma, salgı, taşınım mekanizmalarını engelleme, doğal hormonları devre dışı bırakma, hormon reseptörlerini antagonize ya da agonize etme gibi etkiler ile vücudun hormonal sistemine etki etmektedir (Schönfelder ve ark 2002).

Endokrin bozucular endokrin sistem üzerine etki ederek üreme sistemini, immünolojik sistemi, hipatalamus, hipofiz, tiroid, timus, adrenal bez, meme dokusu gibi çeşitli organ ve dokulara etki ederek büyüme ve gelişmeyi etkilemektedir. Bu maddelere maruz kalma sonucu obezite ve diyabetten erken ergenliğe; kanser ve erken doğumlardan, fertilitede düşüşe kadar birçok sağlık problemi ortaya çıkmaktadır (Kabir ve ark 2015).

Endokrin bozucular organizmalarda her zaman aynı etkiye neden olmayıp doz-cevap eğrisi de her zaman doğrusal değildir (Non-lineer doz-cevap tepkisi). Endokrin bozucuların organizmalarda sebep olacağı toksik etkilerde maruz kalınan doz, etkilenme süresi, yaşamın hangi döneminde maruz kalındığı, kimyasalların karışımı önemli faktörlerdendir (Flint ve ark 2012). Endokrin bozucular yetişkinlerde, yeni doğanlarda veya gelişmekte olan fetüste farklı etkilere sebep olur. Yetişkinlere göre intrauterin dönem veya doğum sonrasındaki gelişim evresinde bu maddelere maruz kalınması büyük bir risk oluşturmaktadır. Çünkü plasenta fetüsü dış ortamdan tamamen koruyamaz ve anneden fetüsa bu kimyasal maddeler geçebilmektedir. Son derece hızlı hücre bölünmesi ve farklılaşması içinde olan fetüs anormal bir şekilde programlanmaya başlayarak büyüme ve gelişmede aksamalara neden olabileceği gibi ve üreme sistemini de etkileyerek fonksiyonel veya morfolojik olarak bozukluklara yol açabilmektedir. Bu maddeler bazen organizmada hemen etkisini göstermeyip yetişkinlikte veya yaşlanmaya bağlı olarak ileri dönemlerde de etkisini gösterebilir. Aynı zamanda yetişkinlikte bu maddelere maruziyet sonucu

oluşan hasarların geri dönüşümü mümkün olabilirken prenatal dönemde oluşan hasarın geri dönüşümü söz konusu olmayabilir (Heindel 2007, Kabir ve ark 2015).

Endokrin bozucuların insan sağlığı üzerinde zararlı etkilere sebep olması ile bazı kimyasalların üretimi ve kullanılması yasaklanmaya başlanmıştır. Östrojenik etkili bir madde olan DES (Dietilstilbestrol) nadir olarak görülen vagina kanseri ile ilişkili olduğu ortaya çıkınca ABD Gıda ve İlaç Komisyonu 1971 yılında DES' in ilaçlarda kullanılmaması için uyarıda bulunmuştur. Yine 1979 yılında PCB' lerin (Poliklorine Bisfeniller), 1972 yılında DDT' in (Dikloro Difenol Trikloroetan) genel kullanımı yasaklanmıştır (Kabir ve ark 2015).

## 1.3. Bisfenol A

### 1.3.1. Bisfenol A' nın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Bisfenol A düşük pH ve yüksek sıcaklıkta iki mol fenolün bir mol aseton ile kondensasyonu sonucu üretilip, genelikle 2,2–(4,4-hidroksifenil) propan şeklinde adlandırılmaktadır. Bisfenol A katı, krem-beyaz renkte ve kristal yapıdadır. Sudaki çözünürlüğü düşükken yağlarda çözünürlüğü iyi olup fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 1.1' de gösterilmiştir (Staples ve ark 1998).

**Çizelge 1.1.** Bisfenol A' nın genel özellikleri.

| | |
|---|---|
| IUPAC adlandırması | 2,2-bis(4-hidroksifenil)propan |
| CAS numarası | 80–05–7 |
| Kimyasal formülü | $C_{15}H_{16}O_2$ |
| Yapısal formülü | $(CH_3)_2$-C- $(C_6H_4–OH)_2$ |
| Molekül ağırlığı | 228 g/mol |
| Erime sıcaklığı | 150–155 °C |
| Kaynama sıcaklığı | 220 °C (4 mm Hg) |
| Alevlenme sıcaklığı | 270 °C |
| Uçuculuğu | 193 °C (1 atm basınçta) |
| Sudaki çözünürlüğü | 120 mg/L (25 °C) |

### 1.3.2. Bisfenol A' nın Üretim ve Kullanım Alanları

BPA dünya genelinde en fazla üretilen kimyasal maddelerden biridir. BPA' nın geniş kullanım alanı ve küresel ihtiyacın giderek artması sebebiyle dünya çapında üretimi büyük boyutlara ulaşmaktadır (Crain ve ark 2007). Örneğin 1993 yılında

dünya genelinde 640 000 ton üretilen BPA, 1995 yılında sadece Almanya' da 210 000 ton üretilmiştir (Lintelmann ve ark 2003). Artan talepler nedeniyle BPA' nın 2003 yılındaki üretimi 2 214 000 tona ulaşmıştır (Vom Saal ve Hughes 2005).

BPA %99-99.8 saflıkta üretilip polikarbanot plastik ve epoksi reçine üretiminde primer monomer olarak kullanılmaktadır. BPA' nın kullanım alanları sadece bunlarla sınırlı kalmayıp gıda saklama poşetleri, su ve meyve suyu şişeleri ile kola ve bira kutularının iç yüzeyinin kaplandığı plastik filmlerden süt şişeleri ve su damacanalarına, kıyafet koruyucularından, kompakt diskler, termal kağıtlar, diş dolgu maddeleri ve optik lenslerden bebek biberonlarına kadar günlük hayatta kullandığımız çok geniş bir ürün yelpazesinde karşımıza çıkmaktadır (Markey ve ark 2003, Vom Saal ve Hughes 2005).

### 1.3.3. Bisfenol A' nın Çevresel Yayılımı

BPA' nın üretim maliyetinin düşük olması ve çok farklı kullanım alanlarının olması yüksek üretim kapasitesini ve buna bağlı olarak da çevreye önemli miktarda BPA atılımını beraberinde getirmektedir. BPA' nın çevresel kontaminasyonu büyük ölçüde epoksi, polikarbonat ve polisülfon sertleştirici ve kauçuk imalatı sırasında meydana gelen endüstriyel atık suların yeterince arıtılmadan yüzey sularına verilmesi, BPA depolarında meydana gelen kaçaklar ve taşımacılık sırasında meydana gelen kazalarla gerçekleşmektedir (Lintelmann ve ark 2003). 2008 yılında ABD' de 577 tondan fazla BPA' nın sadece üretim ve işleme sırasında çevreye yayıldığı rapor edilmiştir (Flint ve ark 2012). Yine 1993 yılında 640 000 ton üretilen BPA' nın yaklaşık %0.017' si (109 ton) çeşitli yollarla çevreye bulaşmıştır (Staples ve ark 1998).

Göller, nehirler ve denizler BPA içeren fabrika atık suları ve atık depolarındaki sızıntı sulardan yüksek oranda kontamine olmaktadır (Crain ve ark 2007). BPA tatlı sulardan ziyade deniz suyunu daha çok kontamine etmekte ve böylece deniz ürünleri tatlı su ürünlerinden daha çok kontamine olmaktadır (Lee ve ark 2008). Almanya' da yapılan bir çalışmada Elba nehrinden alınan su örneğinde 4-92 $\mu g/dm^3$ ve onun sediment örneğinde ise 10-380 $\mu g/dm^3$ gibi yüksek oranlarda BPA kalıntısı tespit edilmiştir (Stachel ve ark 2003). 1998 yılında Japonya' da yapılan bir araştırmada farklı akarsulardan alınan 109 örneğin %57' sinde, 20 sediment örneğinden ise 19' unda BPA tespit edilmiştir (Lintelmann ve ark 2003).

### 1.3.4. Organizmaların Bisfenol A ile Temas Yolları

BPA' nın çok geniş kullanım alanın olması nedeniyle insanlar intrauterin yaşamdan itibaren ömürleri boyunca BPA' ya maruz kalabilmektedir. En sık karşılaşılan maruz kalma yolunun polikarbonat şişelerde ve epoksi reçine ile kaplı ambalajlardaki yiyecek ve içeceklerin tüketimi ile gerçekleşmektedir (Michałowicz 2014). BPA içeren kapların kaynatılması, mikrodalga fırınlarda yüksek sıcaklıklarda ısıtılması ve plastik kapların uzun süre kullanılması da epoksi reçinelerin bozunmasına ve ambalajlardan besin maddelerine BPA geçişine neden olmaktadır (Schönfelder ve ark 2002). Yapılan bir çalışmada 40-95 ˚C sıcaklık aralığında ısıtılan ve ilk kez kullanılan plastik bir şişeden suya 0.03- 0.13 μg/dm$^3$ BPA geçişi olduğu ölçülmüştür. Şişelerin 6 aylık kullanımından sonra yine 40-95 ˚C sıcaklık aralığında ısıtılması sonucunda ise bu rakamın 0.18-18.47 μg/dm$^3$' e kadar arttığı tespit edilmiştir (Nam ve ark 2010).

BPA' nın plastik şişelerden besin maddelerine geçmesi ve ciddi toksik etkilere sahip olmasından dolayı ilk defa Kanada' da ve ilerleyen yıllarda birlikte tüm dünyada bebek biberonlarında BPA' nın kullanılması yasaklanmıştır (Michałowicz 2014).

İnsanların BPA' ya maruz kalma yollarından biri de temizlikte kullandıkları ve içtikleri BPA ile kontamine olmuş sudur (Vom Saal ve Hughes 2005). Ayrıca insanlar dermal temas ve solunum yoluyla da BPA' ya maruz kalabilirler. Sentetik polimerlerden yapılan kağıtlarda BPA bulunmaktadır ve bu maddelerden kolayca ayrışabilmesi ile bu maddelere dokunan kişiler BPA' ya maruz kalabilmektedir (Michałowicz 2014).

### 1.3.5. Halk Sağlığı Açısından Bisfenol A' nın Önemi

Oral yolla alınan BPA' nın büyük bir kısmının vücuda girdikten sonra karaciğerde CYP2C18 enzimi ile geriye kalan kısmının ise CYP2C19 ve CYP2C9 enzimleri ile metabolize olduğu ileri sürülmektedir. Karaciğerde metabolize olan BPA' nın bir bölümünün glukronik asit ile konjuge olarak majör metaboliti BPA-glukronit (BPAG)' e geri kalan az bir bölümünün ise sülfat konjugasyonuna uğrayarak minör metabolit BPA-sülfat (BPAS)' a dönüştükten sonra yaklaşık altı saatlik yarılanma ömrünün ardından 42 saatte tamamına yakının idrar ile atıldığı

tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada oral yolla vücuda alınan BPA' nın % 9.5’ inin hiçbir değişikliğe uğramadan (total BPA), % 69.5' inin BPA glukronit-konjugatı şeklinde, % 21' inin ise BPA sülfat-konjugatı şeklinde idrar ile atıldığı; çok az bir miktarının ise dışkı ile atıldığı gösterilmiştir (Ye ve ark 2005). Yapılan diğer bazı çalışmalarda da BPA' ya maruz kalan insanlardan alınan serum, idrar, anne sütü, plasental, tükürük, kordon kanı, amniyotik sıvı, ovaryum folikül sıvısında değişik miktarlarda BPA olduğu tespit edilmiştir (Ikezuki ve ark 2002, Sun ve ark 2004, Vandenberg ve ark 2007). Amerika' da 394 yetişkin bireyden alınan idrar örneklerinin % 95' inde BPA olduğu tespit edilmiş olup kadınların idrar örneklerinde ortalama 1.12 ng/ml erkeklerde ise 1.63 ng/ml BPA ölçülmüştür (Calafat ve ark 2005).

BPA’ nın yaygın kullanımı ve çevresel kontaminasyon dikkate alındığında insanların yaklaşık olarak günlük 1µg/kg vücut ağırlığı dozunda BPA' ya maruz kaldığı bildirilmektedir (Vandenberg ve ark 2007). Bu durum BPA' nın günlük tolere edilebilir alım miktarının hesaplanmasını zorunlu kılmıştır. Tolere edilebilir günlük alım miktarı (TDI) ise tüm yaşam boyunca herhangi bir sağlık riski oluşturmadan her gün tüketilebilir olan madde miktarıdır. 1980' lerde Avrupa Gıda Komisyonu Bilimsel Komitesi BPA' nın tolere edilebilir günlük alım miktarını vücut ağırlığının her kilogramı için 50 µg olarak belirlemiştir (Vom Saal ve Hughes 2005). 2002 yılında ise Avrupa' da tolere edilebilir günlük alım miktarı 10µg/kg/gün olarak belirlenmiştir (Arakawa ve ark 2004).

In vivo olarak yapılan çalışmalarda günlük tolere edilebilir miktardan daha düşük dozda BPA' nın bile seksüel olgunluğu etkilediği, günlük sperm üretimini ve fertileteyi düşürdüğü ve vücutta bir takım yan etkiler oluşturduğu tespit edilmiş ve sonuçta BPA için belirlenen günlük tolere edilebilir doz miktarının güvenilir olamayacağı kararına varılmıştır (Alonso-Magdalena ve ark 2006).

### 1.3.6. Bisfenol A' nın Biyolojik Etkileri

BPA insülin, leptin, cinsiyet hormonları, adinopektin, tiroksin gibi hormonların fonksiyonlarını değiştirerek sadece endokrin sistemi etkilemekle kalmaz immün sistem, üreme sistemi, ürogenital sistem ve sinir sistemini de etkileyerek insan ve diğer canlılarda östrojenik, mutajenik ve teratojenik etkiler gösterir (Michałowicz 2014).

Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda BPA' nın testosteron ve progesteron seviyesini düşürdüğü, Sertoli hücrelerini apoptozise götürdüğü, sperm kalitesini ve sayısını düşürüp spermlerin olgunlaşmasını geciktirdiği, seminifer tubullerin organizasyonunu bozduğu, spermlerin olgunlaşmasını engellediği, spermatogenezisin düzgün işlemesini engellediği, ovulasyonu baskıladığı ve fertiliteyi düşürdüğü ortaya çıkarılmıştır. Yine yapılan farklı çalışmalarda embriyonik dönemde çok düşük dozlarda bile BPA' ya maruz kalınmasının fetal vücut ağırlığını arttırdığı, sperm üretimini düşürdüğü, seksüel farklılaşmayı bozduğu, meme bezi gelişimi ve dokularının organizasyonunu etkilediği rapor edilmiştir (Lee ve ark 2008).

BPA' nın etkisinin bunlarla sınırlı kalmayıp prostat ağırlığını arttırdığı, vücut ağırlığında artışa giderek obeziteye sebep olduğu, koroner kalp hastalığına ve kansere yakalanma riskini arttırdığı, beyin gelişimini etkileyip fonksiyon ve yapısını değiştirdiği, embriyonik ölümlere, erken doğumlara ve erken puberteye neden olduğu, diyabet riskini arttırdığı, enzimlerin aktivitesini bozduğu, hormonların salgılanması, yapı ve fonksiyonuna etki ettiği, immun sistem üzerine zararlı etkileri gibi organizmalarda çok farklı zararlı etkilere sebep olduğu yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (Michałowicz 2014).

### 1.3.7. Bisfenol A' nın Östrojenik Etkisi

Östrojenler dişi üreme kanalının gelişimi ve fonksiyonundan, sekonder cinsiyet karakterlerinin ortaya çıkmasından ve oksitosin ve prostaglandinler gibi uterus düz kaslarının kontraksiyonundan sorumludur. Östojenlerin üreme ile ilgili fonksiyonları dışında iskelet gelişimi, kemik metabolizması, yağ bezleri aktivitesi, elektrolit dengesi, kalsiyum ve fosfat birikimi, yağ depolanması gibi olaylar üzerine etkileri vardır (Ergün 2011).

Östojenler steroid yapıda bir hormon olup, fonksiyonlarını dokularda bulunan iki spesifik intersellüler reseptör olan östrojen alfa (ERα) ve östrojen beta (ERβ) ile yerine getirir. Östrojen reseptörü beta (ERβ) daha çok merkezi sinir sistemi, immün sistem, sindirim sistemi, kardiyovasküler sistem, ürogenital sistem ve solunum sisteminin çoğu doku ve organlarında; östrojen reseptörü alfa (ERα) ise çoğunlukla uterus ve meme dokusunda, embriyonik gelişim sürecindeki dişi ve erkeklerin Müller kanalı ve gonadlarında eksprese edilir. ERα daha çok üreme ile ilgili olaylarda görev alırken, ERβ ise birçok dokunun fizyolojisinde önemli rol oynar (Gustafsson 1999).

Kanatlı hayvanların embriyonik gelişimi boyunca ERα ve ERβ farklı miktarda eksprese edilir. ERβ' nın gelişimin ilk aşamalarında ERα' dan daha çok miktarda ekspre olduğu ileri sürülmektedir (Mattsson ve ark 2008).

BPA zayıf östrojenik etkili bir endokrin bozucu kimyasal maddedir (Usman ve Ahmad 2016). BPA ve östradiolun fenol grupları benzerlik gösterdiği için BPA, östrojenlerin aktivitesini artırabilir, baskılayabilir, östrojenleri taklit edebilir veya östrojen nükleer hormon reseptörünün aktivasyonunu bozabilir. BPA' nın östrojen reseptörüne bağlanma gücü 17-östradiol β' dan 10.000 kat daha zayıftır. BPA, ERα ve ERβ' ya bağlanabilmekle birlikte hedef hücrelerdeki ERβ' ya bağlanma afinitesinin daha yüksek olduğu iddia edilmektedir (Wetherill ve ark 2007).

### 1.3.8. Kanatlı Hayvanların Üreme Sistemine Bisfenol A' nın Östrojenik Etkisi

Dişi kanatlı embriyolarında erkek embiyolara göre 17β-estradiol ($E_2$) daha fazla sentezlenmektedir. Embriyonik dönemde dişilerde deneysel olarak östrojenin baskılanması veya fonksiyonun engellenmesi sonucu testislere benzeyen ovaryum, erkeğe özgü sekonder cinsiyet karakterlerinin ortaya çıkması, tamamlanmamış ovidukt gelişimi, bıldırcınlarda erkeğe benzer klokal gland oluşumu dikkati çekmiştir. Bu hayvanlara ilerleyen dönemlerde yapılan testesteron uygulamasının erkeklere benzer çiftleşme davranışlarına neden olduğu gözlenmiştir (Balthazart ve ark 1992).

Yine östrojenik etkili kimyasal maddeler uygulanan dişi embriyolarda östrojen dengesinin bozulmasının bir sonucu olarak sağ Müller kanalının ovidukt olarak geliştiği, sol oviduktun kısalması, yumurta üretiminde aksamalar, kabuk bezinde karbonik anhidrazın sentezinde aksamalar ve ince kabuklu yumurtaların oluşumu gibi bazı anomalilerin bu duruma eşlik ettiği bildirilmiştir (Halldin 2005). Embriyonik dönemde östrojenik etkili kimyasal maddelere maruz kalan erkek embriyolarda ise sol gonadın ovaryum benzeri korteks gelişimi ile karakterize olan ve ovo-testis olarak adlandırılan bir yapıya dönüştüğü gösterilmiştir. Erkek embriyolarda oluşan bu anomalinin kalıcı olmadığı ileri sürülmektedir. Östrojen uygulanan erkek embriyolarda her iki Müller kanalının birden bulunabildiği, semen üretiminin düştüğü ve bıldırcınlarda klokal bezin tam olarak gelişmediği de gözlenmiştir (Brunström ve ark 2009).

Yapılan bir çalışmada döllü bıldırcın yumurtasına verilen BPA' nın erkek embriyoların gonadlarında ovotestis oluşumuna neden olduğu bildirilirken Oshima ve ark (2012)' nın döllü tavuk yumurtası kullanarak yaptıkları bir başka çalışmada ise sarı kesesi yoluyla verilen BPA' nın sol testis ağırlığını artırdığı, gelişmekte olan seminifer tubullerin duvarında germ hücre sayısı ile Sertoli hücre sayılarında önemli azalmalara neden olduğu ve hatta sadece Sertoli hücresi içeren seminifer tubullere rastlandığı bildirilmektedir (Esener 2007). BPA' nın oral yolla uygulandığı bir başka çalışmada ise BPA verilen hayvanların ibik ve testis ağırlıklarının kontrol grubuna nazaran daha düşük olduğu tespit edilmiş; aynı zamanda histolojik olarak BPA grubundaki hayvanlara ait testis dokularında seminifer tubüllerin daha küçük olduğu ve spermatogenesisin de kontrol grubuna göre belirgin bir biçimde aksadığı görülmüştür (Furuya ve ark 2002).

Bu çalışmanın amacı döllü tavuk yumurtasına verilen üç farklı dozdaki BPA' nın erkek embriyoların testis dokularının gelişimi üzerindeki olası etkilerinin histolojik, enzim histokimyasal ve histometrik yöntemlerle belirlenmesi amaçlandı.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada özel bir çiftlikten elde edilen Isa Brown ırkı yumurtacı tavuklara ait her biri 50-55 g olan 310 adet döllü tavuk yumurtası kullanılmıştır. .

### 2.1. Yumurtaya Enjekte Edilecek Solüsyonların Hazırlanması

#### 2.1.1. Taşıt Maddenin Hazırlanması

1 gr lesitin (I.078.K.034.0010, Koza Gıda) 1.5mL diklormetilen (UN1593, VWR Chemicals) içerisinde çözdürülerek üzerine 10 mL yerfıstığı yağı (Zade) ilave edildikten sonra diklormetilenin uçmasını sağlamak amacıyla 60 ˚C' lik etüvde kapağı açık erlen içerisinde 1 gece bekletildi.

#### 2.1.2. Etken Maddenin Hazırlanması

Bu amaçla her bir doz grubu için kullanılacak olan Bisfenol A (MKBQ5209V, Sigma) hassas terazi ile tartılarak santrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine bir miktar etanol eklenerek BPA' nın erimesi sağlandı. Etanolde eritilen BPA' ların üzerine gruplardaki yumurta sayıları da dikkate alınarak 100 µl hacimde her bir yumurta için istenen miktarda BPA içerecek hacimde taşıt madde solüsyonu ilave edildi.

### 2.2. Yumurtaların Hazırlanması

Yumurtalar enjeksiyondan önce kapalı bir kabinde 21 g potasyum permanganat + 42 mL formaldehit/$m^3$ karışımıyla elde edilen buharla 15 dakika dezenfekte edildi. Dezenfekte olan yumurtalar rastgele seçilerek 5 gruba ayrıldı.

### 2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Enjeksiyon İşlemleri

Araştırmada ikisi kontrol grubu olmak üzere aşağıda verilen toplam 5 grup oluşturulmuştur.

Grup 1 (Kontrol grubu, toplam 45 yumurta): Bu gruptaki yumurtalara hiç bir işlem uygulanmadı.

Grup 2 (Taşıyıcı kontrol grubu, toplam 50 yumurta): Bu gruptaki yumurtların sarısına etanol, lesitin ve fıstık yağı karışımından oluşan 100 µl hacminde taşıyıcı solüsyon enjekte edildi.

Grup 3 (50 µg/yumurta BPA, toplam 60 yumurta): Bu gruptaki yumurtaların sarısına 100 µl hacminde taşıyıcı madde içerisinde çözdürülmüş 50 µg/yumurta dozunda BPA enjekte edildi.

Grup 4 (100 µg/yumurta BPA, toplam 70 yumurta): Bu gruptaki yumurtaların sarısına 100 µl hacminde taşıyıcı madde içerisinde çözdürülmüş 100 µg/yumurta dozunda BPA enjekte edildi.

Grup 5 (250 µg/yumurta BPA, toplam 85 yumurta): Bu gruptaki yumurtaların sarısına 100 µl hacminde taşıyıcı madde içerisinde çözdürülmüş 250 µg/yumurta dozunda BPA enjekte edildi.

Enjeksiyonlar yumurta sarısına steril insülin enjektöri aracılığıyla yapıldı. Yumurtanın dezenfeksiyonunu takiben özel yumurta delicisi ile yan tarafından açılan delikten girilerek 100 µl hacminde test solüsyonu yumurta sarısına enjekte edildi ve delikler sıvı parafin ile kapatıldı.

Yumurtalar S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Laboratuarında yer alan kuluçka makinesinde (Prodi HB 500S) optimal koşullarda (Kuluçka sıcaklığı 37,7 $^{o}$C, RH %55; Çıkım sıcaklığı 37,5 $^{o}$C, RH %70) kuluçka işlemine tabi tutuldu.

### 2.4. Yumurtaların Açılması ve Doku Örneklerinin Alınması

Kuluçkanın 13, 18 ve 21. günlerinde her grup için 6' şar adet canlı erkek embriyo elde edilene kadar yumurtalar açıldı ve her bir embriyonun sol testis dokusu dikkatli bir biçimde çıkarıldı. Kuluçkanın 13 ve 18. günlerinde embriyolardan alınan testis dokularının tamamı, 21. gündeki testis dokularının ise bir kısmı %10' luk tamponlu formol-salin (pH 7,4) solüsyonunda tespit edildi. Dokular rutin histolojik metotlarla takip edilerek parafinde bloklandı. Bloklardan alınan 6 µm kalınlığındaki kesitlere ise Pappenheim' ın Panoptik boyaması (Cook 1990) ve Crossmon' ın üçlü boyama yöntemi uygulandı (Crossmon 1937). Yirmi bir günlük embriyolardan alınan testis dokularının diğer kısmı ise enzim demonstrasyonları için 24 saat formol-sükroz (+4 $^{o}$C, pH 6,8) solüsyonunda tespit edildikten sonra 22 saat de Holt solüsyonunda (+4 $^{o}$C) bekletildi. Bu son doku örneklerinden kriyostatta (Leica) alınan 12 µm kalınlığındaki kesitler, önceden formol-jelâtin karışımı ile muamele edilmiş olan lamlara alındı. Kriyostatta alınan doku kesitleri her bir enzim için ayrı hazırlanan ve aşağıda ayrıntıları verilen inkübasyon solüsyonları içerisinde oda sıcaklığında 15-30

dakika süreyle kontrollü bir şekilde inkübe edildi. Kırmızı-kahverengi granüllerin ortaya çıkmasının ardından birkaç kez distile su ile yıkanan preparatlara %1' lik methyl-green ile çekirdek boyası uygulandı.

## 2.5. Enzimhistokimyasal Yöntemler

### 2.5.1. Alfa Naftil Asetat Esteraz (ANAE) Enzimi Demonstrasyonu İçin İnkübasyon Solüsyonunun Hazırlanması

Bu amaçla pH' sı 5,0 olan tamponlu fosfat solüsyonunun 80 ml' sine 0,8 ml aseton (Merck) içerisinde eritilen 20 mg substrat (alpha-naphthylacetate, N–8505-Sigma) yavaş yavaş damlatıldı. Ardından 2,4 ml %4' lük sodyum nitrit (S–3421, Merck) solüsyonu ile 2,4 ml pararozanilin (P–3750, Merck) (1 gr pararozanilin, 20 ml distile su, 5 ml konsantre HCl) solüsyonu karışımının 2 dakika süreyle bekletilmesi sonucunda elde edilen 4,8 ml hekzazotize edilmiş pararozanilin solüsyonu substrat içeren tamponlu fosfat solüsyonuna eklendi. Hazırlanan solüsyonun pH' sı 1N NaOH solüsyonu ile 5,8' e ayarlandı (Dönmez ve ark 2012).

### 2.5.2. Asit Fosfataz (ACP-Az) Enzimi Demonstrasyonu İçin İnkübasyon Solüsyonunun Hazırlanması

Bu amaçla, pH' sı 5,0 olan tamponlu Michael' in Veronal-asetat solüsyonu ile substrat olarak 1 ml N,N-dimetilformamide içerisinde çözdürülmüş 10 mg Naphthol AS-BI phosphate (N–2125, Sigma) kullanıldı. Tampon solüsyonunun 5 ml' sine ilave edilen 1 ml substrat solüsyonu, 13 ml distile su ile karıştırıldıktan sonra 1,6 ml hekzazotize edilmiş (0,8 ml pararozanilin, 0,8 ml %4' lük sodyum nitrit) pararozanilin solüsyonu eklenerek karışımın son pH' sı 1N NaOH solüsyonu ile 5,0' e ayarlandı (Dönmez ve ark 2012). Hazırlanan her iki solüsyon inkübasyon öncesi süzgeç kağıdı ile süzüldü. Preparatlar DFC-320 model kamera ataçmanı olan Leica DM-2500 model ışık mikroskobunda incelenerek gerekli bölgelerin dijital görüntüleri kaydedildi.

## 2.6. Histometrik Ölçümler

Histometrik ölçümler kuluçkanın 21. gününde elde edilen testis dokusu kesitlerinde gerçekleştirildi.

### 2.6.1. Yüzey Alanı Ölçümleri

Tam orta hattan alınan 7 adet enine seri kesitte testis yüzey alanı ölçümleri gerçekleştirildi.

### 2.6.2. Korteks Kalınlığı Ölçümleri

Yüzey alanı ölçümlerinin yapıldığı seri kesitlerin farklı bölgelerinden toplam 30 adet korteks kalınlığı ölçümü yapıldı.

### 2.6.3. Seminifer Tubul Çapı Ölçümleri

Yukarıdaki ölçümlerin yapıldığı seri kesitlerde enine kesiti belirgin ve ölçüme uygun toplam 30 adet seminifer tubulün çapı ölçüldü.

### 2.6.4. İstatistiki Analizler

Ölçümlerden elde edilen sayısal veriler SPSS 10.0 programı yardımıyla One-Way Anova Testi (Tek Yönlü Varyans Analizi) ve ardından çoklu karşılaştırma testlerinden DUNCAN testiyle analiz edilerek grupların ortalama değerleri arasındaki farkların önem dereceleri belirlendi.

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK)' nun 29.01.2016 tarih ve 2016/11 sayılı etik kurul onayı alınarak gerçekleştirilmiştir (Bkz. EK-A).

# 3. BULGULAR

## 3.1. İnkübasyonun On Üçüncü Günü

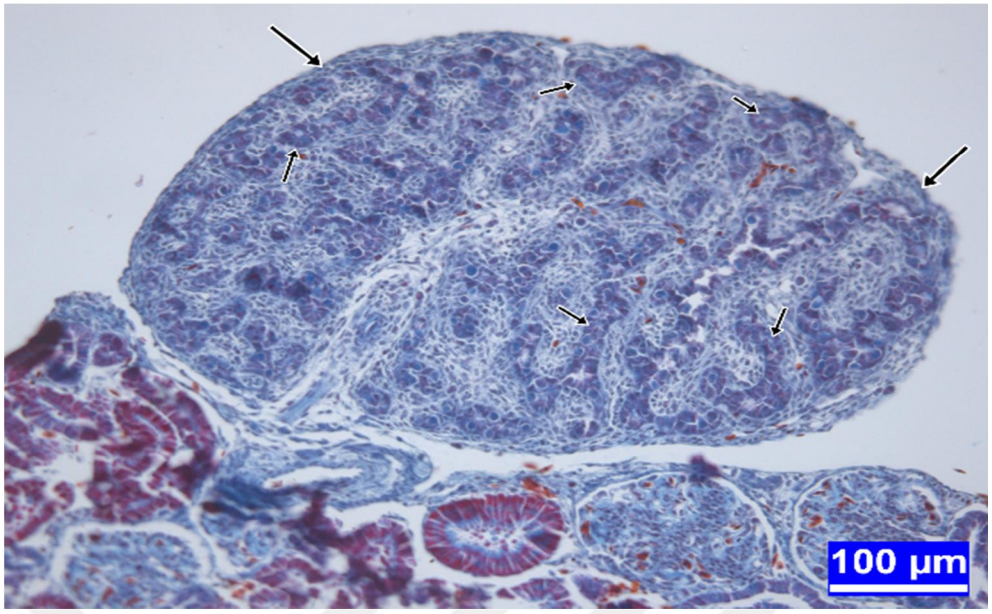
### 3.1.1. Morfolojik Bulgular

İnkübasyonun on üçüncü gününde testislerin embriyonun bel bölgesi hizasında ve gelişmekte olan böbrek dokusunun (mezonefroz) ventro-mediyalinde sağlı-sollu bir yerleşim gösterdiği görüldü. Beyaz renkte ve ince uzun bir yapıda olan testislerden sol tarafta olanlarının daima diğerinden biraz daha büyük olduğu tespit edildi.

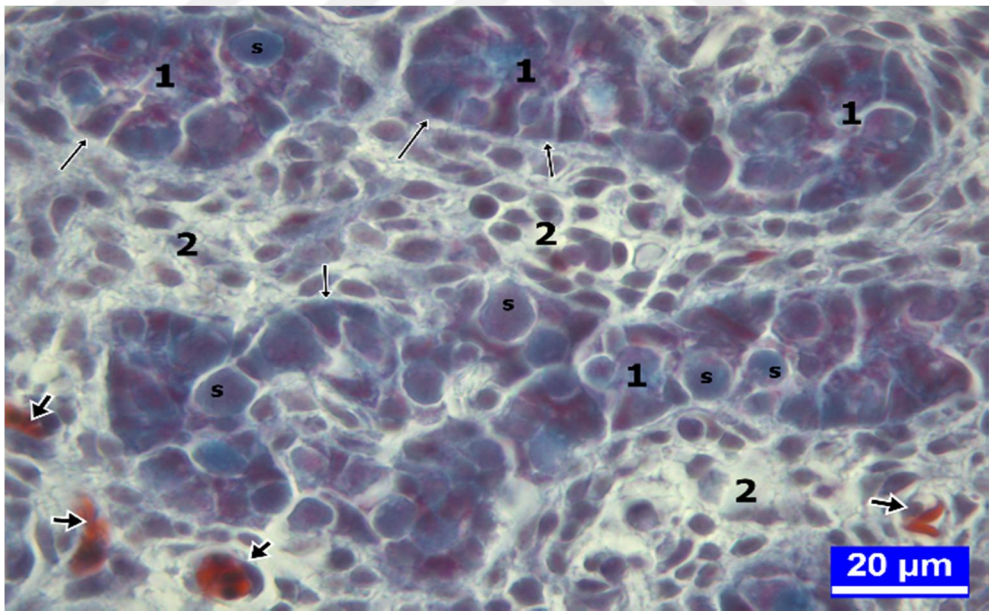
BPA verilen gruplardaki embriyolarda belirgin bir gelişme geriliği dikkati çekerken testislerin de buna bağlı olarak küçük kaldığı görüldü.

### 3.1.2. Histolojik Bulgular

Kontrol gruplarına ait embriyoların sol testis dokularından alınan histolojik kesitler üzerinde yapılan incelemelerde ileride tunika albugineya' yı oluşturacak olan birkaç hücre kalınlığında korteks tabakası ile bunun çevrelediği bir medula bölgesi gözlendi. Mezenşimal bağ doku karakterindeki medula bölgesinde hücre kordonları dikkati çekti (Şekil 3.1). İlerde seminifer tubulleri oluşturacak olan bu kordonlarda iri-yuvarlak çekirdekleri ile tanınan spermatogonyumlar ile bazal membran üzerine oturmuş üçgen biçiminde, geniş tabanları ile karakterize Sertoli hücreleri görüldü. Kordonlar arasında yer alan mezenşimal dokuda yer yer kan damarlarına rastlandı (Şekil 3.2).

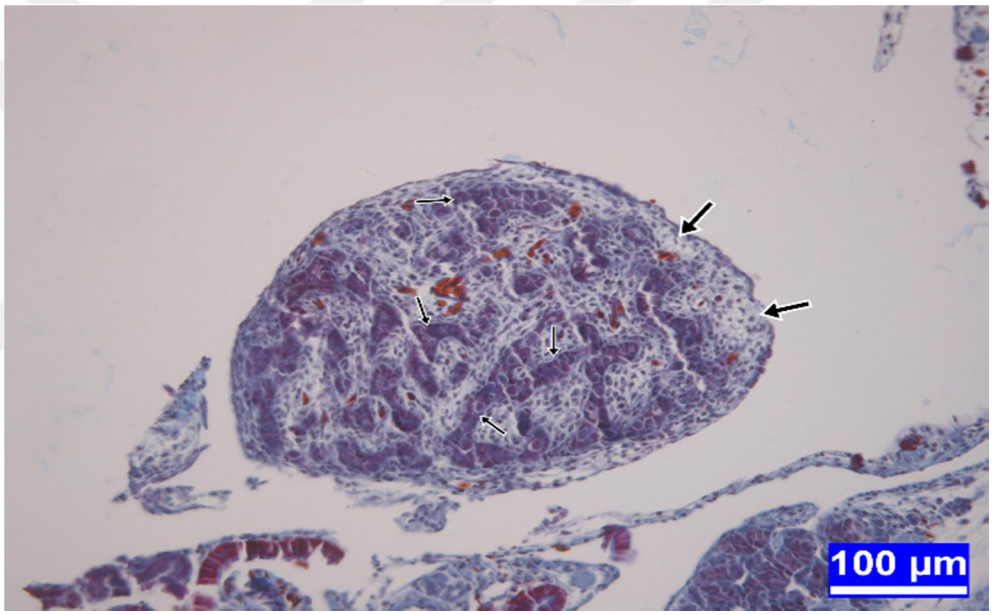



**Şekil 3.1.** İnkübasyonun on üçüncü gününde kontrol grubundan bir embriyoya ait testis dokusu kesiti. (Uzun oklar: Kapsül, Kısa oklar: Hücre kordonları. Üçlü boyama. Bar: 100µm.)

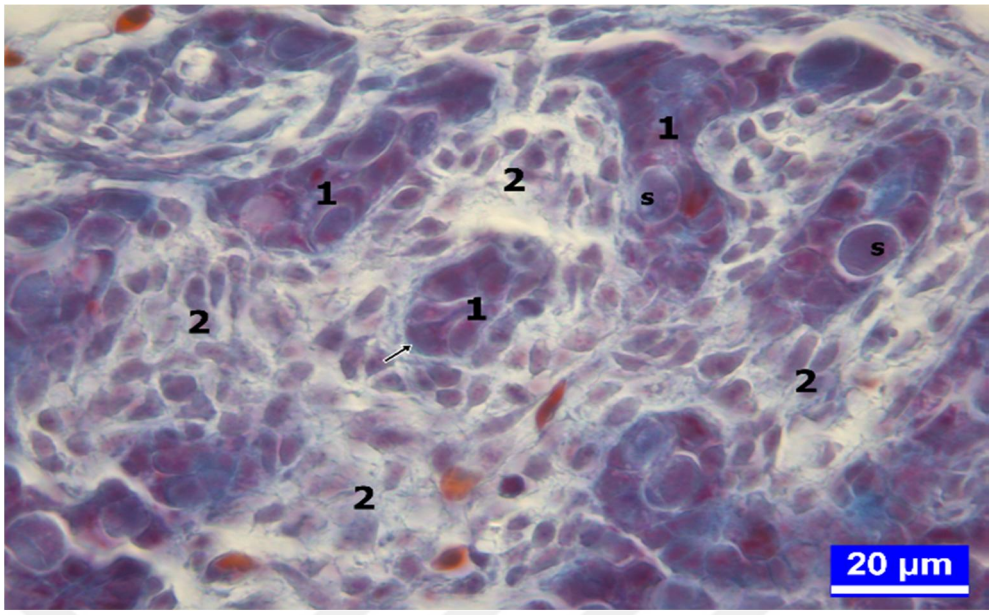



**Şekil 3.2.** İnkübasyonun on üçüncü gününde kontrol grubundan bir embriyoya ait testis dokusu kesiti. (Uzun oklar: Sertoli hücreleri, Kısa oklar: Kan damarları, s: Spermatogonyumlar, 1: Hücre kordonları, 2: Mezenşimal doku. Üçlü boyama. Bar: 20µm.)

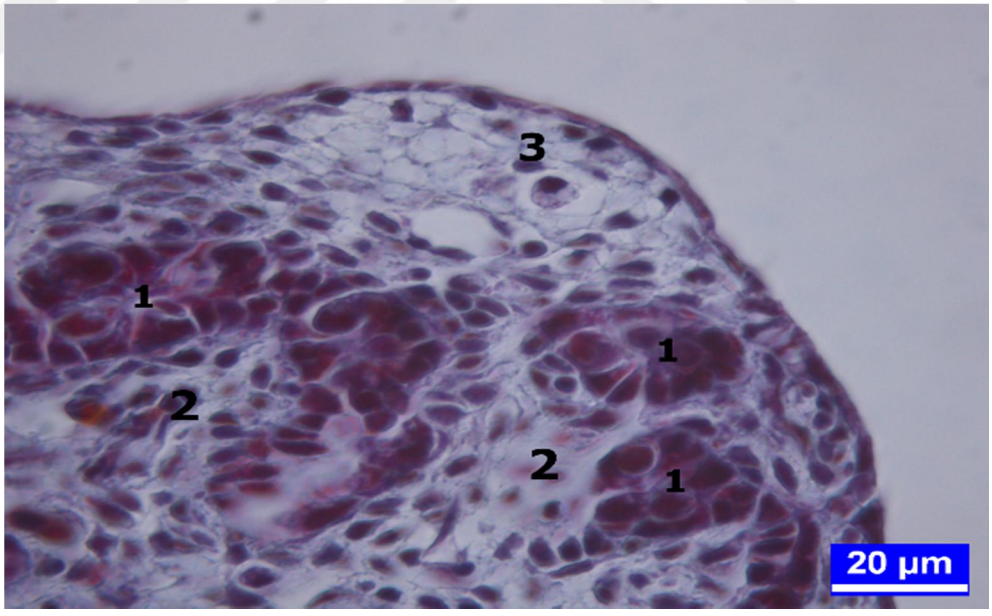
Genel histolojik organizasyon açısından kontrol gruplarına benzer bir yapıya sahip oldukları gözlenen deney gruplarından özellikle 100 ve 250 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan embriyolardan elde edilen testis dokusu kesitlerinde hücre kordonlarında gelişimin geri kaldığı, kordonlardaki hücresel organizasyonun zayıf olduğu ve mezenşimal dokunun göreceli olarak daha fazla yer kapladığı dikkati çekti (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4). Korteks tabakasında yer yer oosit benzeri hücre kümelerinin neden olduğu kalınlaşmalar gözlendi (Şekil 3.3 ve Şekil 3.5). Ovo-testis anomalisi gösteren testis dokusuna ait kesitlerde dokunun ovaryum gelişimini andırır biçimde uzadığı görüldü (Şekil 3.6).



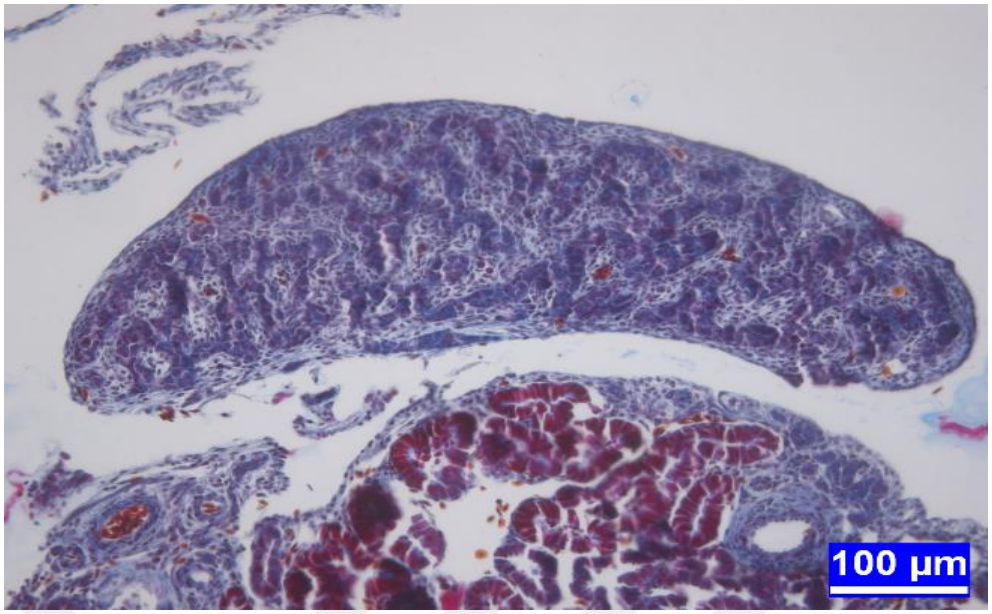

**Şekil 3.3.** İnkübasyonun on üçüncü gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir embriyoya ait testis dokusu kesiti.(Kalın oklar: Kapsülde yer yer kalınlaşmalar, İnce oklar: Hücre kordonları. Üçlü boyama. Bar: 100µm.)




**Şekil 3.4.** İnkübasyonun on üçüncü gününde 100 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir embriyoya ait testis dokusu kesiti. (1: Hücre kordonları, 2: Mezenşimal doku, s: Spermatogonyumlar, Ok: Sertoli hücreleri Üçlü boyama. Bar: 20µm.)




**Şekil 3.5.** İnkübasyonun on üçüncü gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir embriyoya ait testis dokusu kesiti.(1: Hücre kordonları, 2: Mezenşimal doku, 3: Kapsülde kalınlaşmaya neden olan oosit benzeri hücre topluluğu. Üçlü boyama. Bar: 20µm.)




**Şekil 3.6.** İnkübasyonun on üçüncü gününde 100 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir embriyoya ait testis dokusu kesiti. Ovo-testis anomalisi gösteren ve ovaryum gelişimini andırır biçimde uzayan testis dokusu. (Üçlü boyama. Bar: 100µm.)

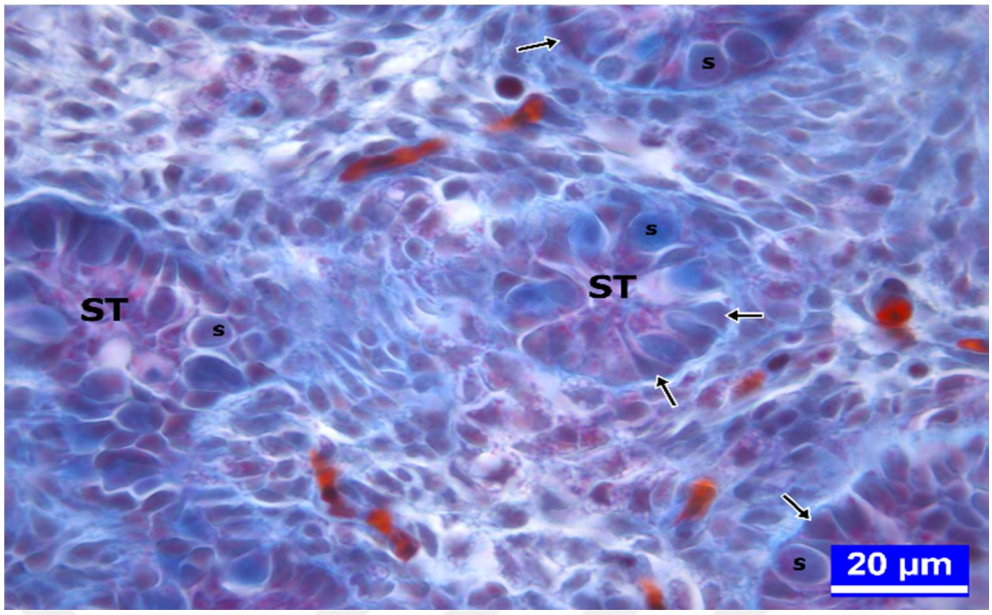
## 3.2. İnkübasyonun On Sekizinci Günü

### 3.2.1. Morfolojik Bulgular

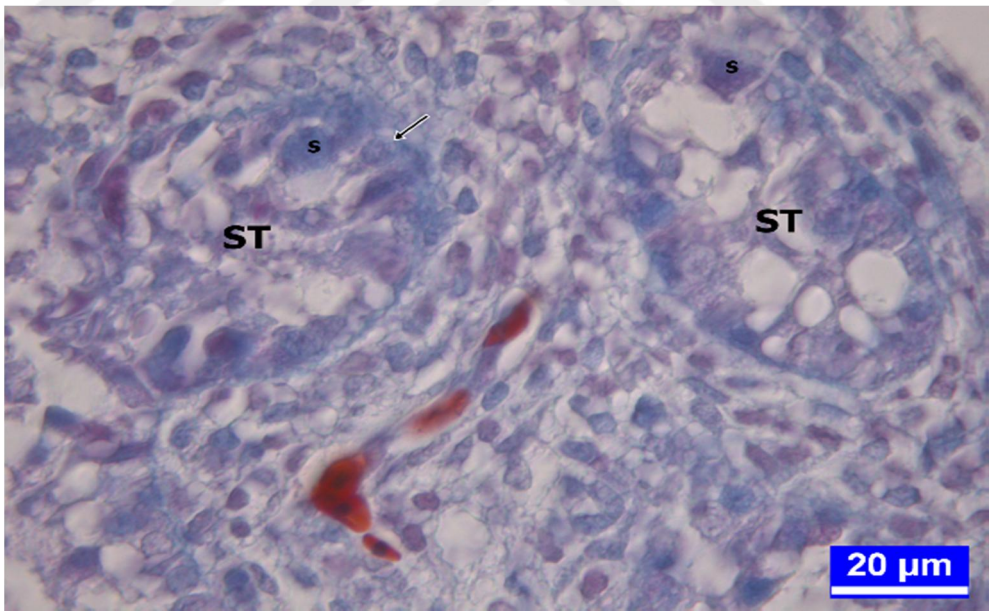
Bu dönemde embriyonun da gelişmesiyle birlikte testislerin morfolojik olarak biraz daha irileştiği görüldü. Ancak bir önceki döneme benzer şekilde BPA verilen gruplardaki embriyoların testislerinin daha küçük oldukları dikkati çekti.

### 3.2.2. Histolojik Bulgular

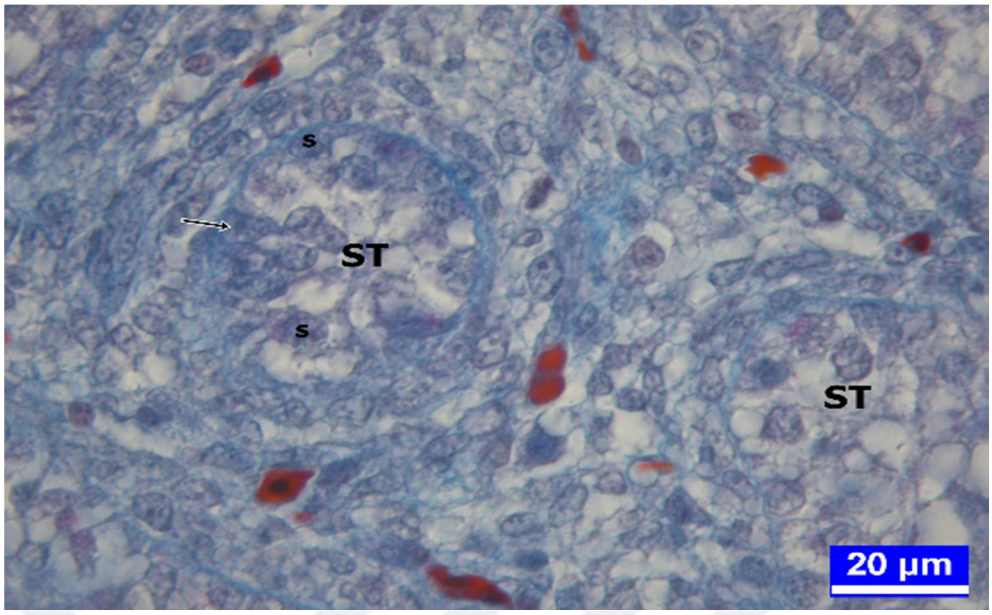
Hücre kordonlarının kontrol gruplarında gelişiminin ilerlediği, sayıca artan kordonlarda tubul formasyonunun daha belirgin hale geldiği görüldü (Şekil 3.7). Söz konusu hücre kordonlarının gelişiminin özellikle 100 ve 250 µg/yumurta dozunda BPA verilen yumurtalardan elde edilen embriyoların testis dokusunda geri kaldığı, sayıca da kontrol gruplarına göre nisbeten daha az oldukları gözlenen bu kordonların duvarını oluşturan çok az sayıdaki spermatogonyum ve Sertoli hücre organizasyonun da bozulmuş olduğu tespit edildi (Şekil 3.8, Şekil 3.9 ve Şekil 3.10).



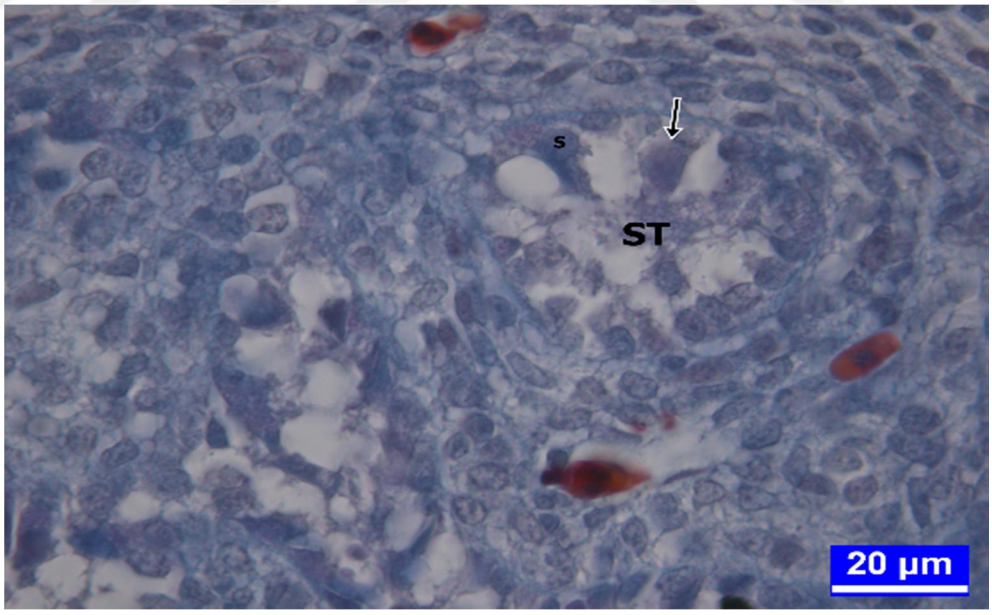

**Şekil 3.7.** İnkübasyonun on sekizinci gününde kontrol grubundan bir embriyoya ait testis dokusu kesiti. (Oklar: Sertoli hücreleri, s: Spermatogonyumlar, ST: Seminifer tubulleri oluşturacak olan hücre kordonlarının enine kesitleri. Üçlü boyama. Bar: 20µm.)




**Şekil 3.8.** İnkübasyonun on sekizinci gününde 50 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir embriyoya ait testis dokusu kesiti. (Ok: Sertoli hücresi, s: Spermatogonyumlar, ST: Seminifer tubulleri oluşturacak olan hücre kordonlarının enine kesitleri. Üçlü boyama. Bar: 20µm.)




**Şekil 3.9.** İnkübasyonun on sekizinci gününde 100 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir embriyoya ait testis dokusu kesiti. (Ok: Sertoli hücresi, s: Spermatogonyumlar, ST: Seminifer tubulleri oluşturacak olan hücre kordonlarının enine kesitleri. Üçlü boyama. Bar: 20µm.)

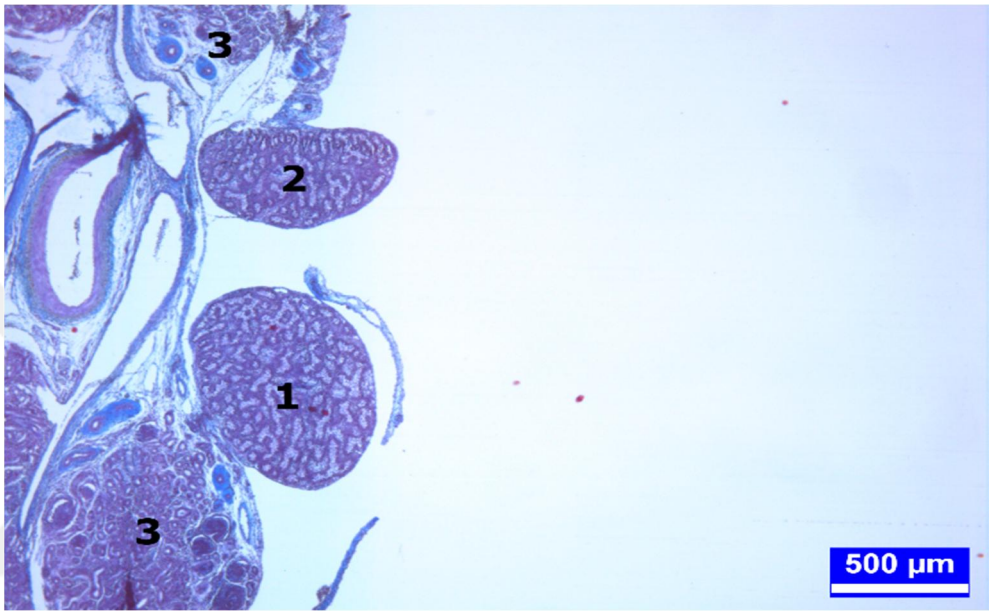



**Şekil 3.10.** İnkübasyonun on sekizinci gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir embriyoya ait testis dokusu kesiti. (Ok: Sertoli hücresi, s: Spermatogonyum, ST: Seminifer tubulleri oluşturacak olan hücre kordonlarının enine kesitleri. Üçlü boyama. Bar: 20µm.)

### 3.3. İnkübasyonun Yirmi Birinci Günü (Kuluçkadan Çıkışın İlk Günü)

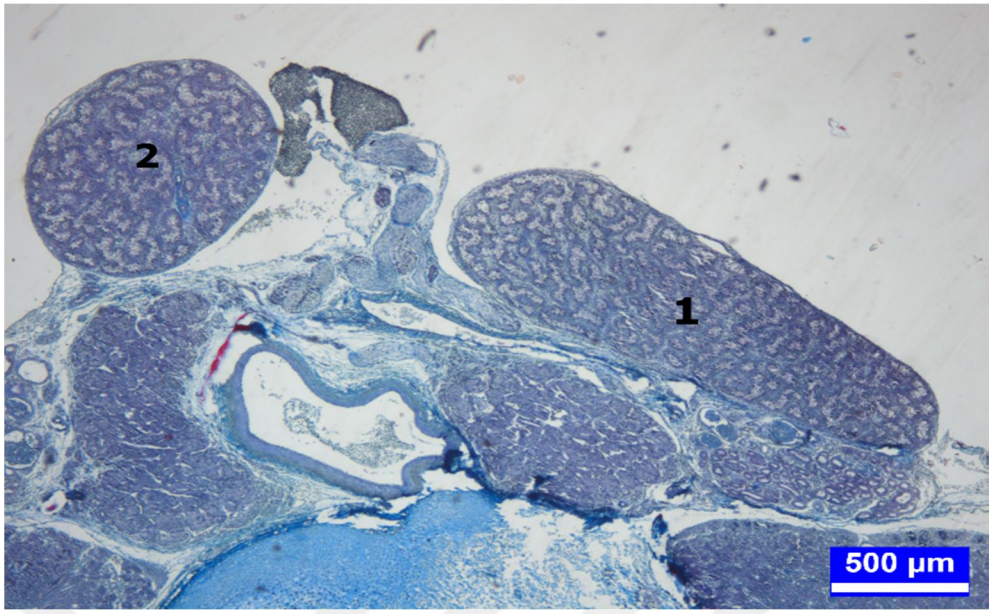
#### 3.3.1. Morfolojik Bulgular

Kuluçkadan çıkan civcivlerin testislerinin şekil ve büyüklük olarak inkübasyonun on sekizinci günündeki embriyoların testislerine benzediği görülürken, testislerden sol tarafta olanlarının daima diğerinden biraz daha büyük olduğu tespit edildi (Şekil 3.11).




**Şekil 3.11.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait testislerin kesiti. (1: Sol testis, 2: Sağ testis, 3: Böbrek dokusu. Üçlü boyama. Bar: 500µm.)

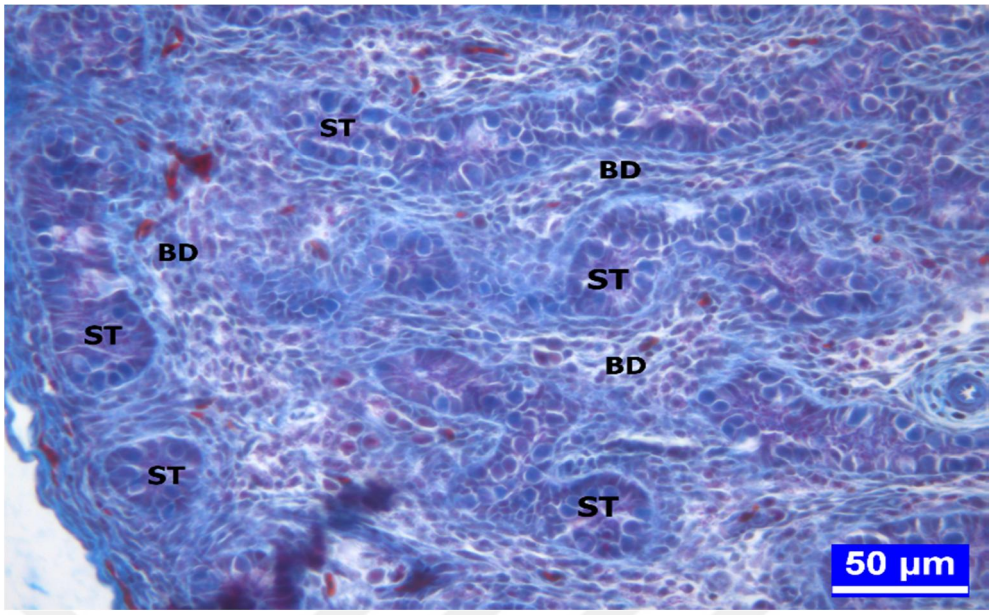
Bir önceki döneme benzer şekilde BPA verilen gruplardaki embriyoların testislerinde gelişme geriliği dikkati çekti. Yine BPA uygulanan gruplara ait bazı civcivlerin sol testis dokusunun ovaryum benzeri bir gelişim göstererek ince-uzun bir şekil aldığı izlendi (Şekil 3.12).



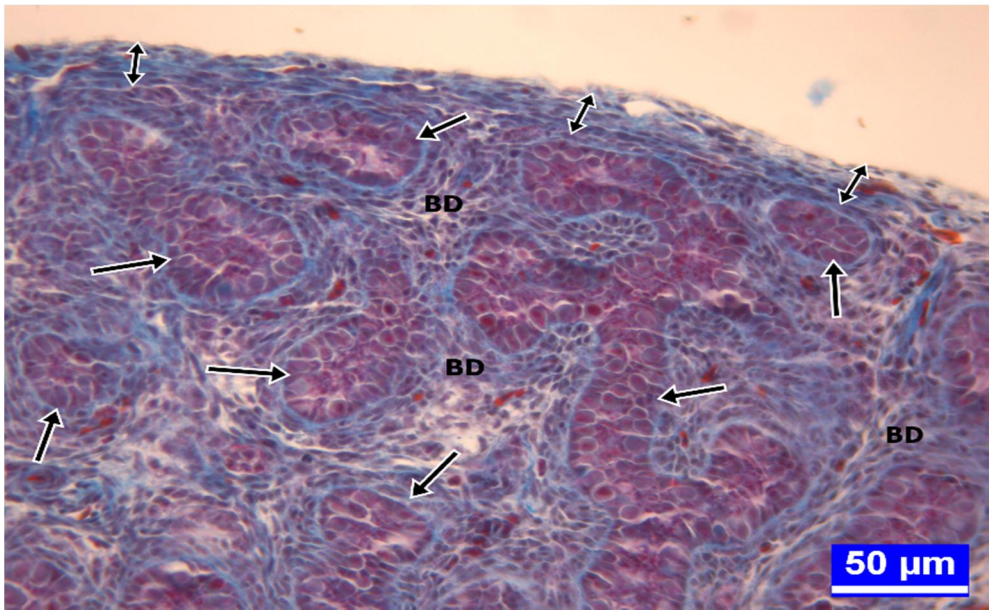

**Şekil 3.12.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 100 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir civcive ait testislerin kesiti. (1: Ovaryum benzeri bir gelişim göstererek ince-uzun bir şekil alan sol testis, 2: Sağ testis. Üçlü boyama. Bar: 500µm.)

### 3.3.2. Histolojik Bulgular

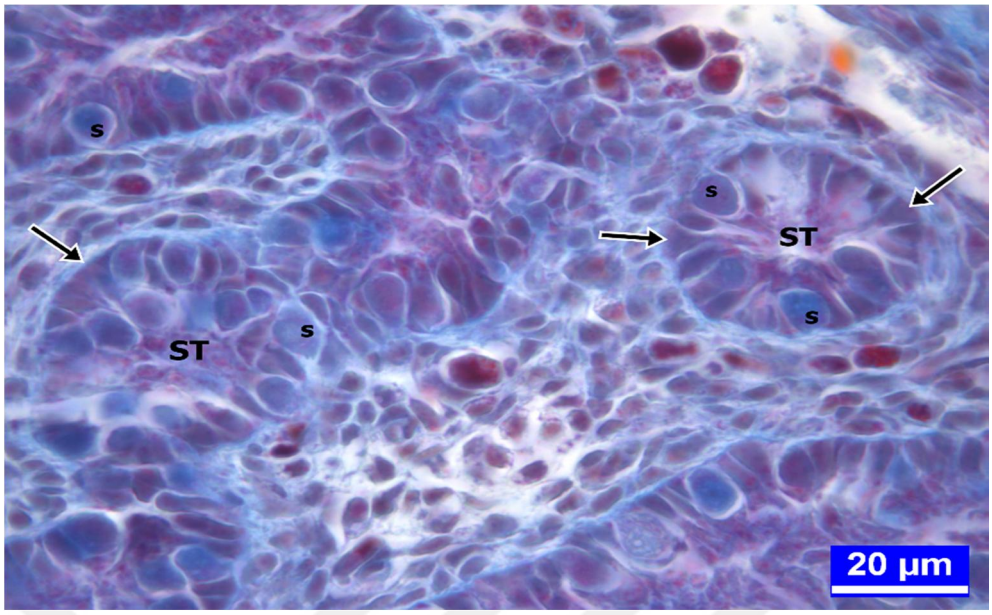
Kontrol gruplarında hücre kordonlarının gelişiminin biraz daha ilerlediği, tubul gelişiminin daha belirgin hale geldiği ancak tubul lümeninin henüz tam olarak şekillenmediği görüldü (Şekil 3.13 ve Şekil 3.14). Kordonların duvarını oluşturan ve bazal membran üzerine oturmuş üçgen biçimli Sertoli hücreleri ile oldukça iri ve yuvarlak şekilli spermatogonyumların daha da belirgin hale gelmiş oldukları dikkati çekti (Şekil 3.15 ve Şekil 3.16).



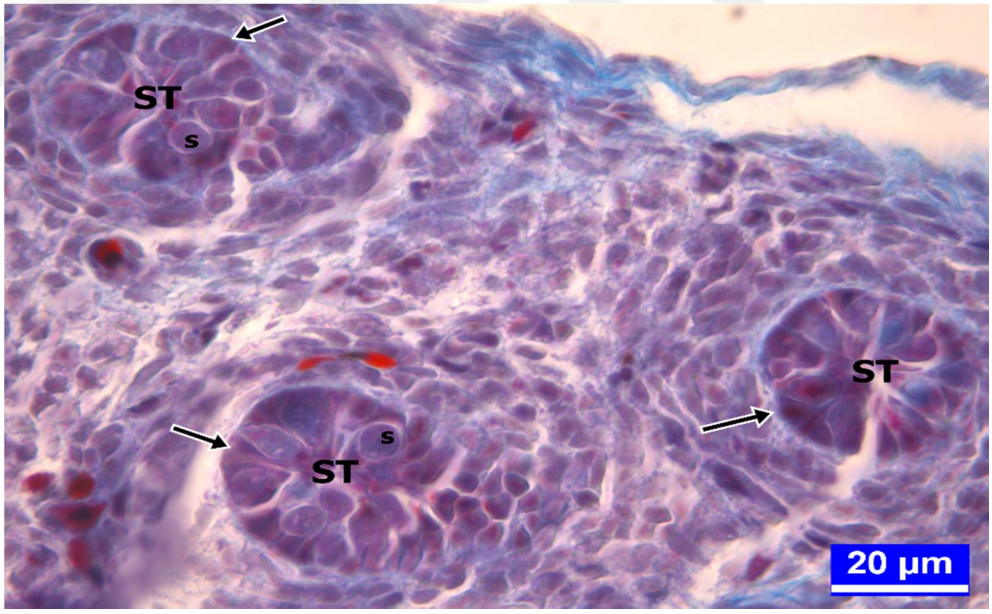

**Şekil 3.13.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait testis dokusu kesiti. (ST: Seminifer tubulleri oluşturacak olan hücre kordonları ve onların enine kesitleri. BD: Bağ doku. Üçlü boyama. Bar: 500µm.)




**Şekil 3.14.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol gruplarından çözücü-kontrol grubuna ait bir civcivin testis dokusu kesiti. (Oklar: Seminifer tubulleri oluşturacak olan hücre kordonları ve onların enine kesitleri, Çift yönlü oklar: Kapsül, BD: Bağ dokusu. Üçlü boyama. Bar: 50µm.)



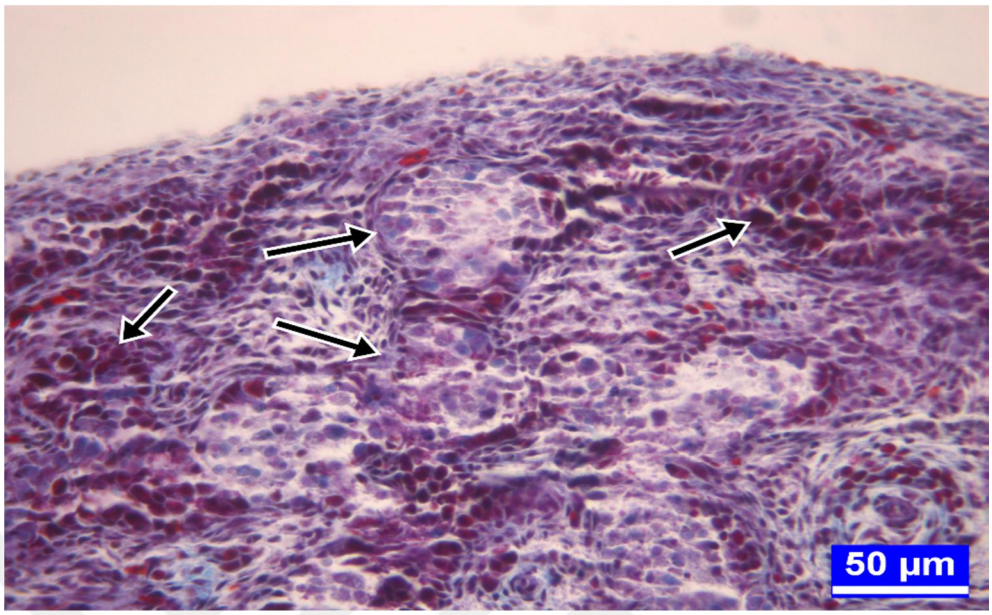

**Şekil 3.15.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait testis dokusu kesiti. (ST: Seminifer tubulleri oluşturacak olan hücre kordonları ve onların enine kesitleri, s: Spermatogonyumlar, Oklar: Sertoli hücreleri. Üçlü boyama. Bar: 20µm.)



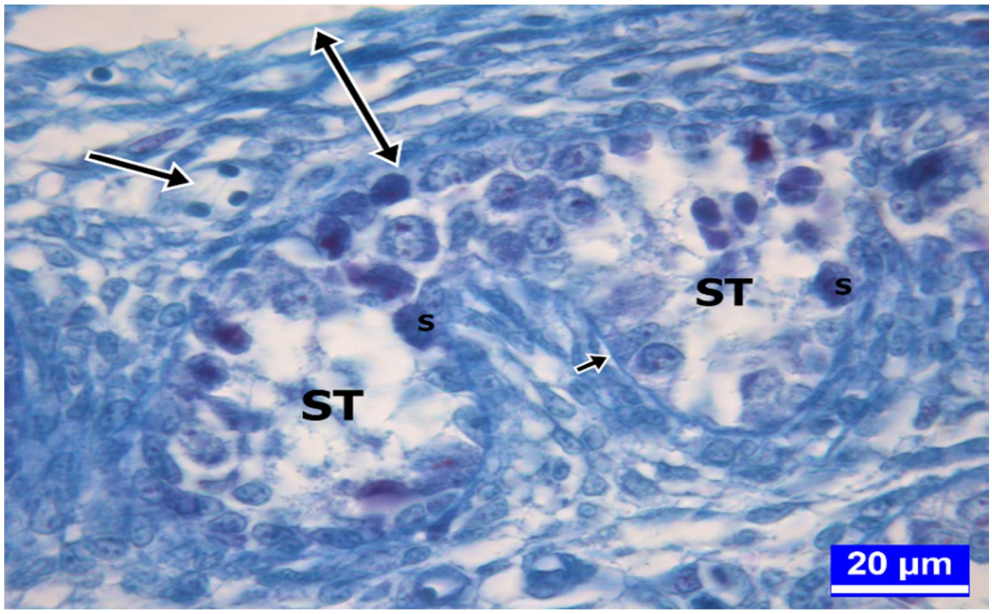

**Şekil 3.16.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol gruplarından çözücü-kontrol grubuna ait bir civcivin testis dokusu kesiti. (ST: Seminifer tubulleri oluşturacak olan hücre kordonlarının enine kesitleri, s: Spermatogonyumlar, Oklar: Sertoli hücreleri. Üçlü boyama. Bar: 20µm.)

Seminifer tubulleri oluşturacak olan hücre kordonlarının gelişiminin tüm BPA gruplarında geri kaldığı, sayıca da kontrol gruplarına göre nisbeten daha az oldukları gözlenen bu kordonların duvarını oluşturan çok az sayıdaki

spermatogonyum ve Sertoli hücre organizasyonun da bozulmuş olduğu tespit edildi (Şekil 3.17 ve Şekil 3.18).

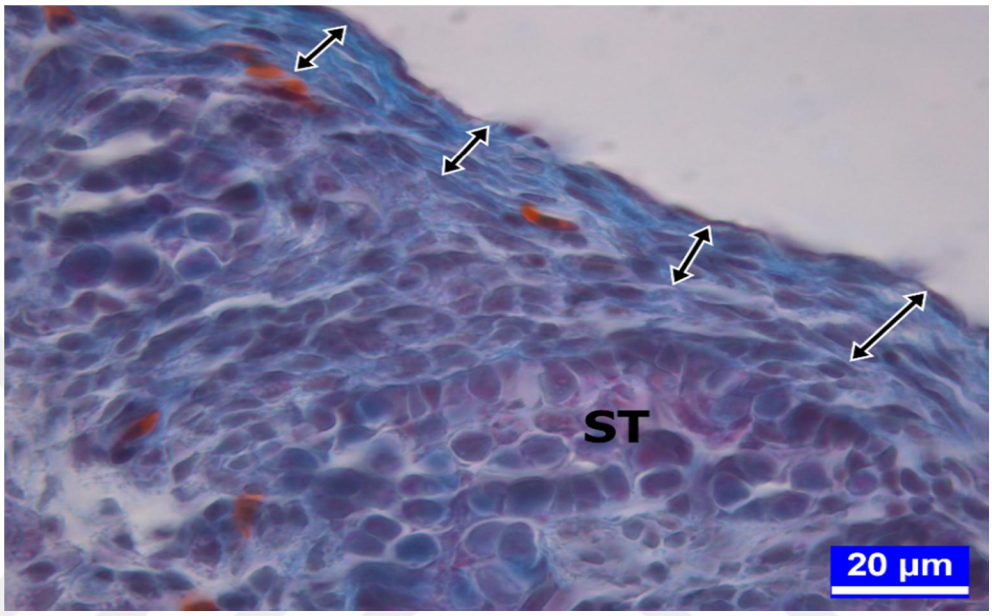



**Şekil 3.17.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir civcive ait testis dokusu kesiti. (Oklar: Seminifer tubulleri oluşturacak olan hücre kordonları ve onların enine kesitleri. Üçlü boyama. Bar: 50µm.)

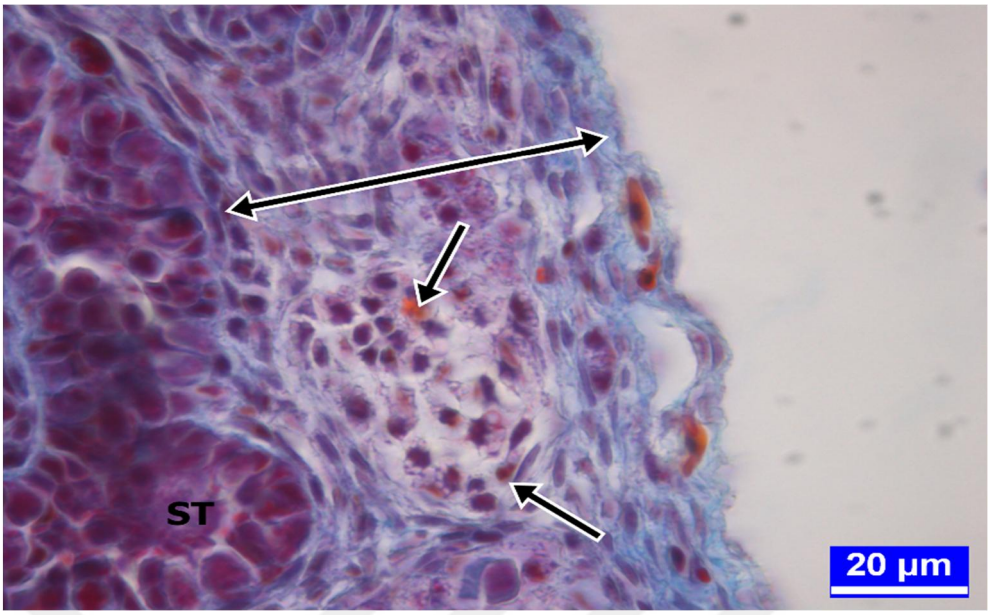



**Şekil 3.18.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 100 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir civcive ait testis dokusu kesiti. (ST: Seminifer tubulleri oluşturacak olan hücre kordonlarının enine kesitleri, s: Spermatogonyumlar, Kısa ok: Sertoli hücresi, Uzun ok: Oosit benzeri hücre grubu, Çift yönlü ok: Kalınlığı artmış korteks. Üçlü boyama. Bar: 20µm)

Yine BPA uygulanan gruplarda korteks kalınlıklarının arttığı; kontrol gruplarında birkaç hücre sırası kalınlığındaki korteksin (Şekil 3.19) deney gruplarında yer yer 5-10 hücre sırası kalınlığa ulaşırken bu bölgelerde oosit benzeri hücre gruplarının varlığı dikkati çekti (Şekil 3.20).




**Şekil 3.19.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait testis dokusu kesiti. (ST: Seminifer tubulleri oluşturacak olan hücre kordonu, Çift yönlü oklar: Normal kalınlıkta izlenen korteks. Üçlü boyama. Bar: 20µm.)




**Şekil 3.20.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 100 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir civcive ait testis dokusu kesiti. (ST: Seminifer tubulleri oluşturacak olan hücre kordonunun enine kesiti, Oklar: Oosit benzeri hücre grupları, Çift yönlü ok: Kalınlığı artmış korteks. Üçlü boyama. Bar: 20µm.)

### 3.4. Histometrik Bulgular

Kuluçkadan çıkışın ilk günü sol testis dokusundan alınan kesitlerde testis yüzey alanı, seminifer tubul çapı ve korteks kalınlıkları ölçülmüş ve yapılan histometrik ölçüm sonuçları Çizelge 3.1' de verilmiştir.

#### 3.4.1. Testis Yüzey Alanı Sonuçları

Kuluçkadan çıkışın ilk günü sol testis dokularından alınan kesitlerde testis yüzey alanı ölçümlerine bakıldığında en yüksek değerlerin düşük (50 µg/yumurta) ve orta (100 µg/yumurta) dozda BPA uygulanan gruplardan elde edildiği ve bu değerlerin kontrol grupları ve yüksek (250 µg/yumurta) dozda BPA uygulanan gruplardaki değerlerden önemli oranda farklı olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Bunun yanı sıra her ne kadar kontrol grupları ile yüksek (250 µg/yumurta) doz BPA uygulanan grup arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark tespit edilememiş olsa da yüksek (250 µg/yumurta) doz BPA uygulanan gruptan elde edilen değerlerin kontrol gruplarından daha düşük olduğu dikkati çekmektedir (Çizelge 3.1).

### 3.4.2. Seminifer Tubül Çapı Sonuçları

Kuluçkadan çıkışın ilk günü sol testis dokularından alınan kesitler üzerinde yapılan ölçümlerin histolojik bulguları destekler nitelikte olduğu görülmüştür. BPA uygulanan gruplarda tubül gelişiminde gözlenen gelişme geriliği ve düzensiz hücresel organizasyona paralel olarak seminifer tubül çapı ortalamalarının kontrol gruplarından daha düşük olduğu ve gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$, Çizelge 3.1).

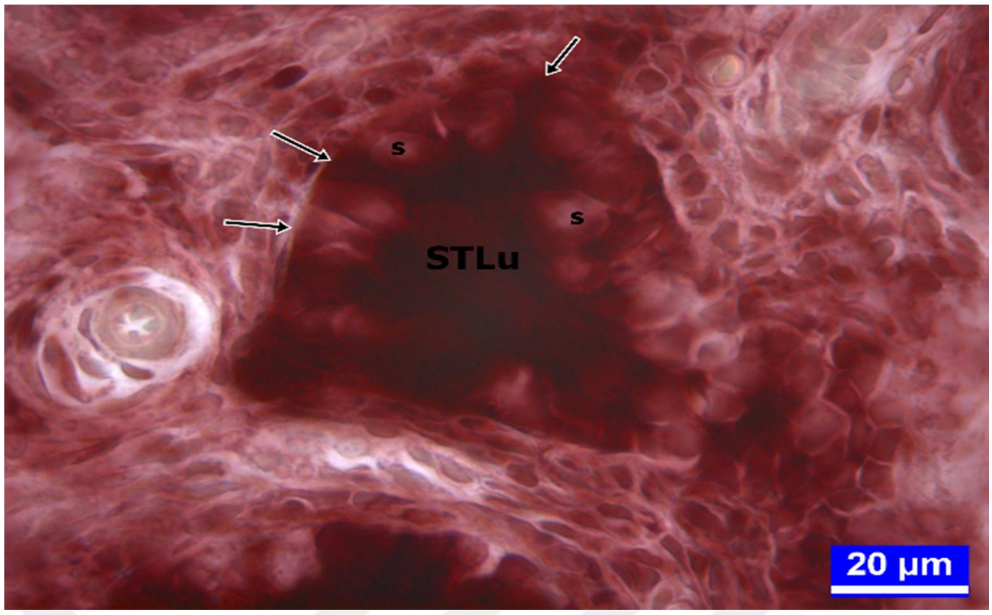
### 3.4.3. Korteks Kalınlığı Sonuçları

Kuluçkadan çıkışın ilk günü sol testis dokularından alınan kesitler üzerinde yapılan korteks kalınlığı ölçüm sonuçlarının da histolojik bulgularla örtüştüğü görülmüştür. BPA uygulaması yapılan gruplardan elde edilen sonuçların kontrol gruplarına nazaran daha yüksek olduğu belirlenirken özellikle düşük (50 µg/yumurta) ve orta (100 µg/yumurta) dozda BPA uygulanan gruplardaki artışın oldukça belirgin olduğu tespit edilmiş; bu gruplar ile yüksek (250 µg/yumurta) doz BPA uygulanan grup arasındaki farkın da istatistiksel olarak önemli olduğu dikkati çekmiştir ($p<0,05$, Çizelge 3.1).

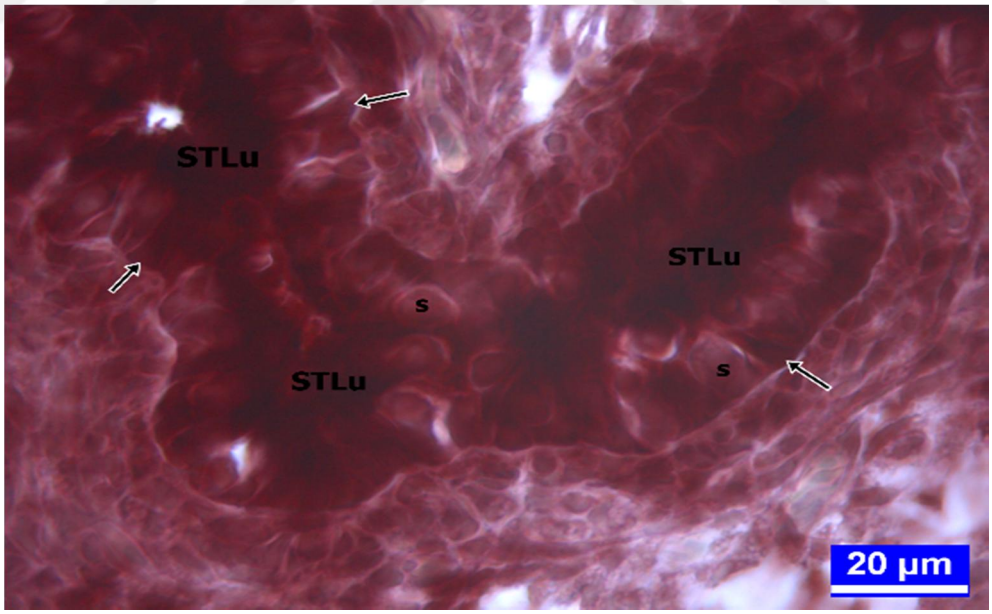
## 3.5. Enzim Histokimyasal Bulgular

### 3.5.1. Alfa Naftil Asetat Esteraz (ANAE) Enzimi Demonstrasyonu Sonuçları

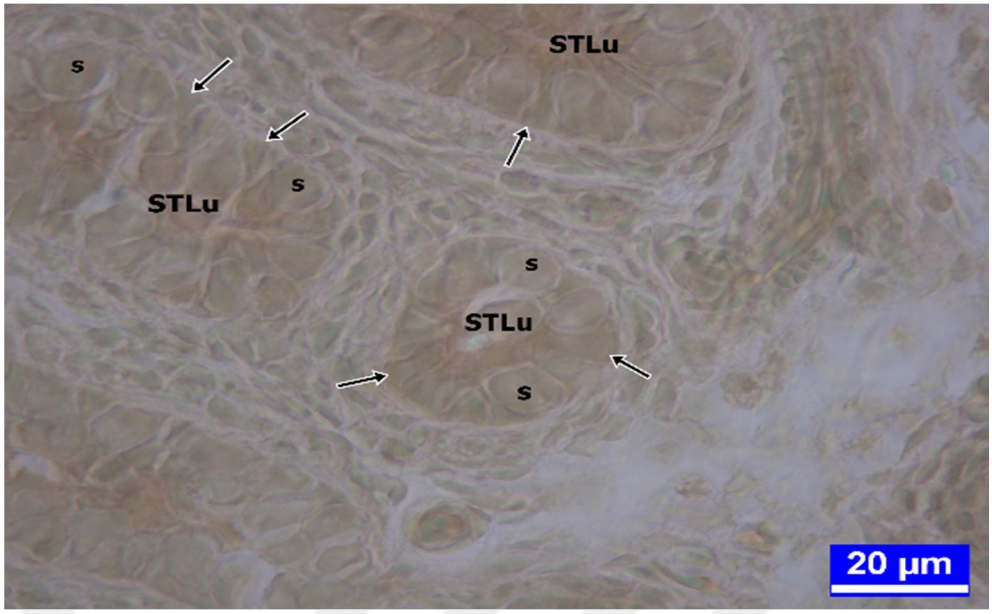
Kuluçkadan çıkışın ilk gününde sol testis dokularından alınan kriyostat kesitleri üzerinde gerçekleştirilen alfa naftil asetat esteraz (ANAE) enzimi demostrasyonu sonucunda söz konusu enzimin seminifer tubullerin duvarını oluşturan hücreler için spesifik olmadığı görülmüştür. Özellikle lümenin içinde gözlenen hücresel artıkların çok yoğun, spesifik olmayan pozitivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Tubul duvarında yer alan Sertoli hücreleri ve spermatogonyumların ise çok zayıf ve hücresel lokalizasyon açısından spesifik olmayan tarzda pozitiviteye sahip oldukları dikkati çekmiştir (Şekil 3.21). Kontrol grupları ile BPA uygulanan gruplardaki hayvanların testis dokularında tespit edilen enzim pozitivite tarzı ve yoğunluğu açısından belirgin bir fark izlenmemiştir (Şekil 3.22). Gerek lümenin içinde gözlenen ve gerekse Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlarda gözlenen enzim aktivitesinin sodyum floride (NaF) duyarlı oldukları dikkati çekmiştir (Şekil 3.23).




**Şekil 3.21.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait testis dokusunun kriyostat kesiti. (STLu: Seminifer tubulleri oluşturacak olan hücre kordonunun enine kesitinde yeni şekillenmekte olan lümen, Oklar: Sertoli hücreleri, s: Spermatogonyumlar. ANAE enzimi demonstrasyonu. Bar: 20µm.)



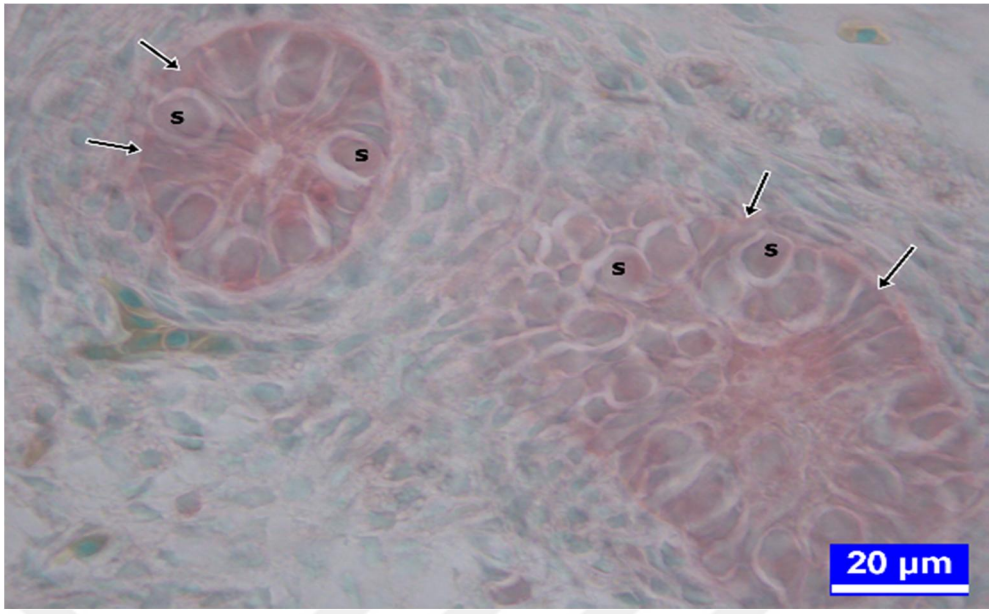

**Şekil 3.22.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir civcive ait testis dokusunun kriyostat kesiti. (STLu: Seminifer tubulleri oluşturacak olan hücre kordonlarında yeni şekillenmekte olan lümen, Oklar: Sertoli hücreleri, s: Spermatogonyumlar. ANAE enzimi demonstrasyonu. Bar: 20µm.)



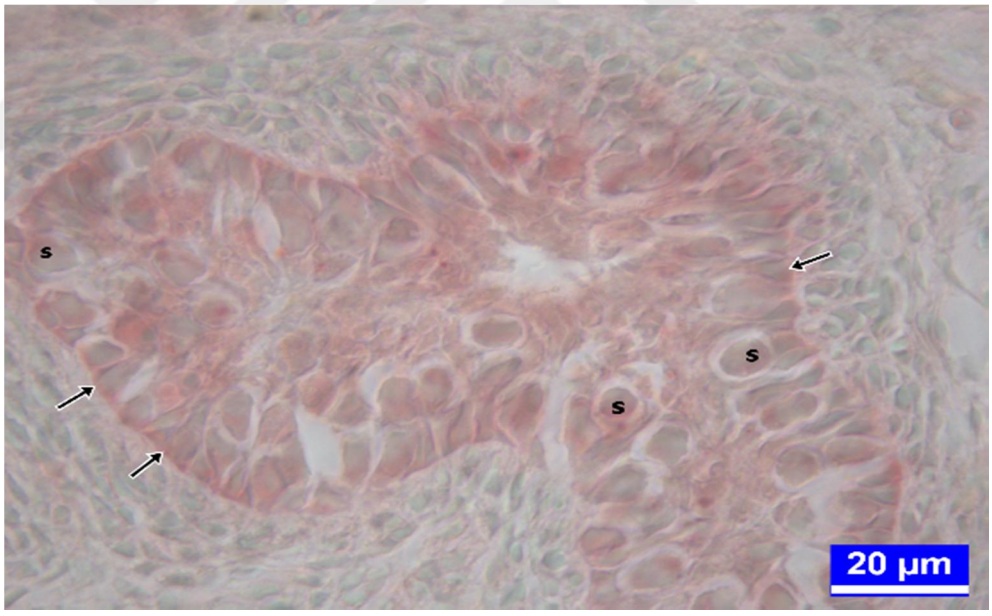

**Şekil 3.23.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait testis dokusunun kriyostat kesiti. (STLu: Seminifer tubulleri oluşturacak olan hücre kordonlarında yeni şekillenmekte olan lümen, Oklar: Sertoli hücreleri, s:Spermatogonyumlar. NaF inhibisyonu uygulanan ANAE enzimi demonstrasyonu. Bar: 20µm.)

### 3.5.2. Asit Fosfataz (ACP-Az) Enzimi Demonstrasyonu Sonuçları

Kuluçkadan çıkışın ilk gününde sol testis dokularından alınan kriyostat kesitleri üzerinde gerçekleştirilen ACP-az enzimi demonstrasyonu sonucunda ANAE enzimi demonstrasyonu sonuçlarına benzer şekilde yine non-spesifik ve oldukça zayıf bir pozitivite tespit edilirken gruplar arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 3.24 ve Şekil 3.25).




**Şekil 3.24.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait testis dokusunun kriyostat kesiti. (Oklar: Sertoli hücreleri, s: Spermatogonyumlar. ACP-az enzimi demonstrasyonu. Bar: 20µm.)

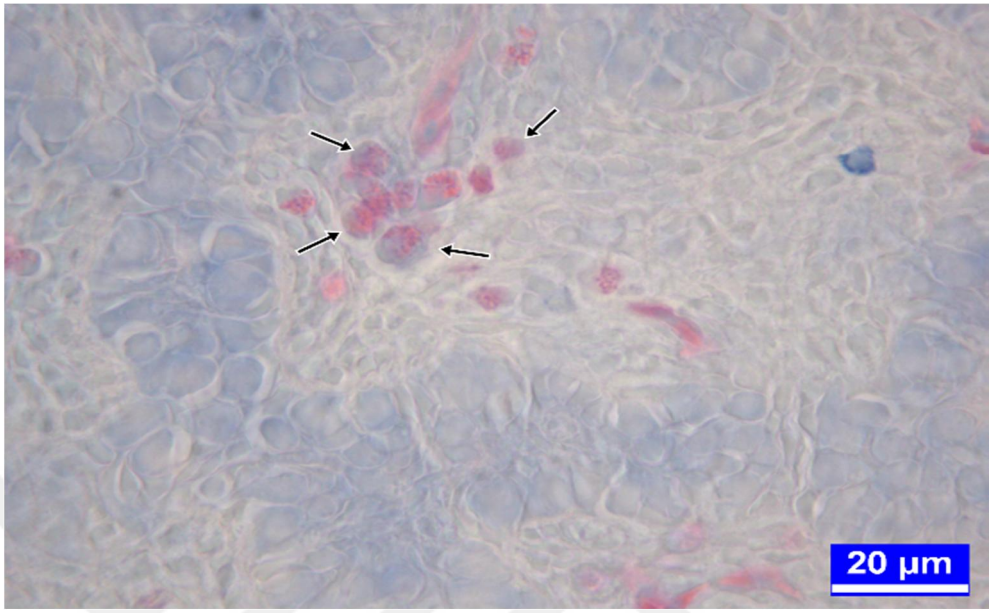



**Şekil 3.25.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir civcive ait testis dokusunun kriyostat kesiti. (Oklar: Sertoli hücreleri, s: Spermatogonyumlar. ACP-az enzimi demonstrasyonu. Bar: 20µm.)

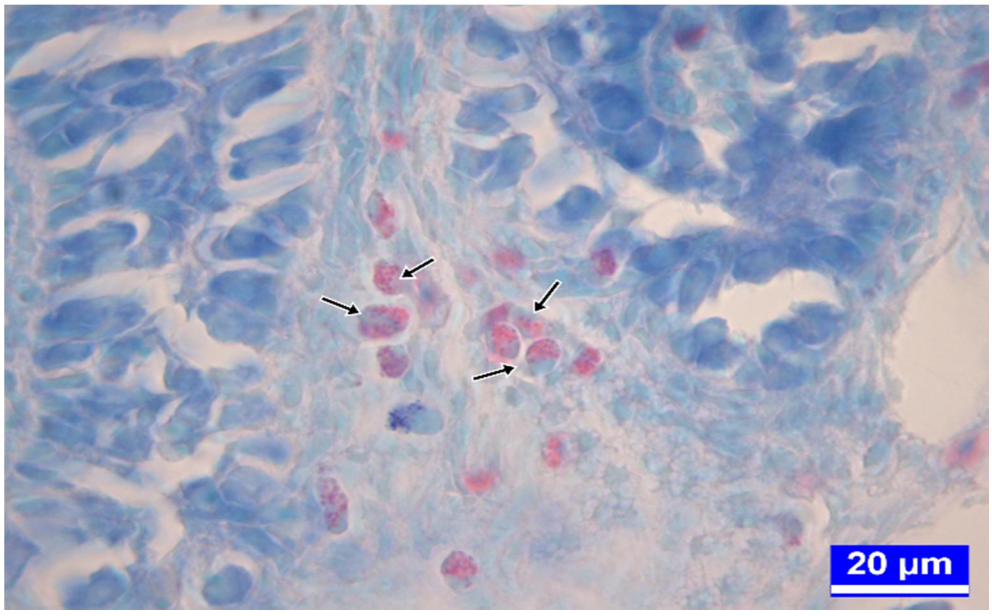
### 3.6. Pappenheim'ın Panoptik Boyaması Sonuçları

Kuluçkadan çıkışın ilk gününde hem kontrol grupları ve hem de BPA uygulanan gruplardaki hayvanların sol testis dokularından alınan kesitler üzerinde gerçekleştirilen Pappenheim' ın Panoptik boyaması sonucunda seminifer tubuller

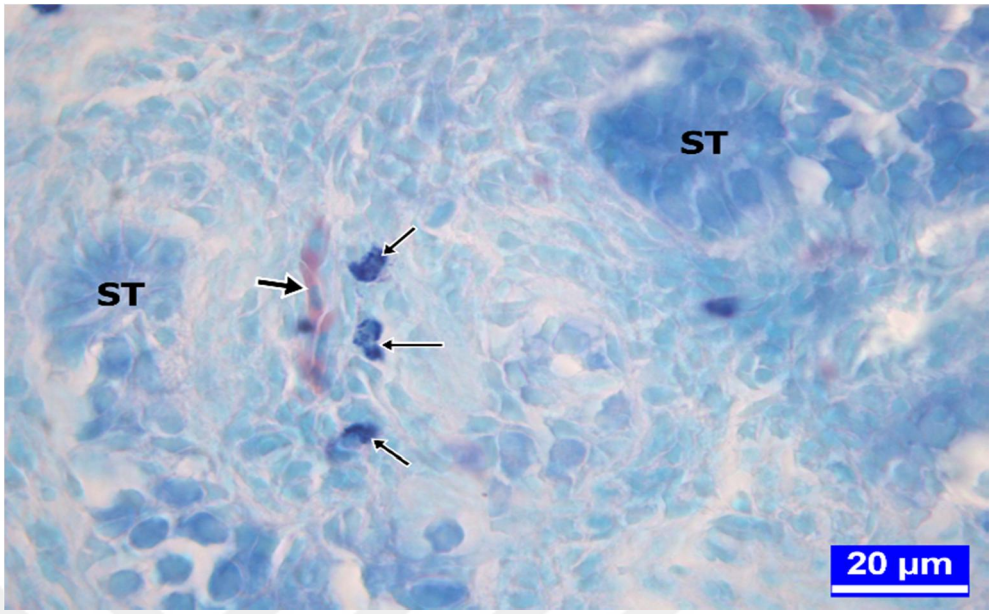
arasındaki mezenşimal doku içerisinde eozinofilik hücre toplulukları dikkati çekerken (Şekil 3.26 ve Şekil 3.27), kan damarlarına yakın yerleşimli mast hücreleri tespit edilmiştir (Şekil 3.28).




**Şekil 3.26.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde kontrol grubundan bir civcive ait testis dokusunun kriyostat kesiti. (Oklar: İntersitisyumda gözlenen eozinofilik hücre toplulukları. Papenheim' ın panoptik boyası. Bar: 20µm.)




**Şekil 3.27.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 250 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir civcive ait testis dokusunun kriyostat kesiti. (Oklar: İntersitisyumda gözlenen eozinofilik hücre toplulukları. Papenheim'ın panoptik boyası. Bar: 20µm.)




**Şekil 3.28.** Kuluçkadan çıkışın ilk gününde 50 µg/yumurta dozunda BPA' ya maruz bırakılan bir civcive ait testis dokusunun kriyostat kesiti.(ST: Seminifer tubulleri oluşturacak olan hücre kordonlarının enine kesitleri, Kalın ok: Kan damarı, İnce oklar: İntersitisyumda kan damarlarının etrafında gözlenen mast hücreleri. Papenheim'ın panoptik boyası. Bar: 20µm.)

**Çizelge 3.1.** Kuluçkadan çıkış gününde testislerde yapılan ölçümler.

| **Gruplar (n=6)** | **Testis Yüzey Alanı ($\mu m^2$) Mean±SE** | **Seminifer tubul çapı (µm) Mean±SE** | **Korteks kalınlığı (µm) Mean±SE** |
|---|---|---|---|
| **Kontrol** | 697106,56±38257,85$^{b}$ | 38,81±0,40$^{a}$ | 14,72±0,23$^{c}$ |
| **Taşıyıcı** | 664742,36±30269,02$^{b}$ | 38,41±0,43$^{a}$ | 15,78±0,27$^{c}$ |
| **50 µg/yumurta BPA** | 840774,62±37355,58$^{a}$ | 29,07±0,45$^{b}$ | 20,40±0,33$^{a}$ |
| **100 µg/yumurta BPA** | 857630,05±22990,35$^{a}$ | 28,75±0,47$^{b}$ | 20,68±0,36$^{a}$ |
| **250 µg/yumurta BPA** | 586920,07±15509,13$^{b}$ | 28,06±0,46$^{b}$ | 18,22±0,38$^{b}$ |

a-c: Aynı sütunda farklı harfler taşıyan gruplar arasında istatiksel açıdan önem vardır ($p<0.05$)

## 4. TARTIŞMA

Endokrin sistem, büyüme, gelişme ve metabolizma ile ilgili olayların yanı sıra embriyonik gelişim, gonadların oluşumu ve seksüel olgunlaşma gibi reprodüktif süreçler üzerinde de düzenleyici ve belirleyici etkisi olan bir sistemdir. Bazı çevresel kirleticilerin yanı sıra çeşitli kimyasal maddeler, sistemin etkisinden sorumlu olan hormonların hedef hücrelerdeki reseptörlerini bloke ederek ya da onlara bağlanarak sistemin düzenlediği süreçleri durdurmakta ya da tetiklemektedir. Bu etkilerinden dolayı endokrin bozucular olarak adlandırılan söz konusu maddelerden günlük hayatımızda en sık karşılaştığımız ve üzerinde belki de en çok çalışılan madde, östrojenik etkisi ile ön plana çıkan Bisfenol A (BPA)' dır (Crain ve ark 2007, Flint ve ark 2012).

Östrojenik etkili endokrin bozucular ve özellikle de BPA, plasentayı aşabilmesi ve yumurta sarısı ile atılması nedeniyle gerek memelilerde ve gerekse kanatlılarda gelişmekte olan embriyo üzerindeki olumsuz etkileri halk sağlığı açısından önemli bir sorun olarak karşımıza çıkarken, yaban hayatı ve kanatlı sektörü için de önemli bir tehdit oluşturmaktadır (Ikezuki ve ark 2002, Berg ve ark 2004, Crain ve ark 2007, Flint ve ark 2012). Ikezuki ve ark (2002) premenapozal kadınlar ile erken ve geç dönem hamile kadınlardan aldığı kan örneklerinin yanı sıra kordon kanı, ovaryum folikül sıvısı ve amniyotik sıvı örneklerinde BPA tespit ettiklerini bildirmektedirler. Araştırıcılar son yıllarda artan erkek çocuklardaki genital anomaliler ve kız çocuklarında görülen erken puberte vakalarının yanı sıra yetişkin erkeklerde sperm sayılarındaki düşüşler ile kadınlardaki göğüs kanserlerinin olası sebeplerinden birisinin de günlük hayatta maruz kalınan BPA ve benzeri endokrin bozucular olabileceği üzerinde durmaktadırlar. Berg ve ark (2004) ise embriyonik dönemin erken evrelerinde östrojenik etkili maddelere maruz kalan tavuklardan elde edilen yumurtaların ince kabuklu oldukları ve kabuk kalitelerinin de kötü olduğunu ortaya koymuşlardır.

BPA' nın östrojenik etkilerinin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde özellikle kanatlılarda gonadların embriyonik gelişimi ve üreme fonksiyonları üzerinde durulduğu dikkati çekmektedir. Bu çalışmalarda içerisinde farklı miktarlarda BPA içeren emülsiyonların embriyolu tavuk ya da bıldırcın yumurtalarına enjekte edildiği (Berg ve ark 2001, Halldin ve ark 2001, Oshima ve

ark 2012, El Gawish ve ark 2013), periton içi verildiği (Hanafy ve ark 2016) ya da yedirme çalışmaları (Furuya ve ark 2002) göze çarpmaktadır. Berg ve ark (2001) embriyolu bıldırcın ve tavuk döllü yumurtalarına sırasıyla 20 ve 100 µl emülsiyon içerisinde 67 ve 134 µg/g yumurta dozunda enjekte ettikleri BPA' nın bıldırcın embriyolarındaki öne çıkan etkisinin dişi embriyolarda Müller kanalı anomalisi, tavuk embriyolarında ise sol testis dokusunda ovaryum benzeri gelişimi ifade eden ovo-testis anomalisi oluğunu bildirmektedirler. Oshima ve ark (2012)' nın 20, 200, 2000 ve 20000 ng/yumurta dozunda BPA' yı bıldırcın yumurtalarına albumine enjeksiyon yoluyla verdikleri çalışmada ise kuluçkanın 16. gününde BPA' ya maruz kalan erkek embriyoların gonadlarında feminizasyonun en belirgin histolojik bulgularından birisi olan ovotestis oluşumuna rastladıkları bildirilmektedir. Yapılan bir başka çalışmada (Esener 2007) inkubasyonun 4. gününde embriyolu tavuk yumurtalarına sarı kesesi yoluyla 67 ve 134 mg/g yumurta dozunda verilen BPA' nın kuluçkadan çıkabilen erkek civcivlerin testis dokularında önemli değişikliklere neden olduğu ortaya konmuştur. Söz konusu çalışmada sol testis ağırlığının yüksek dozda BPA verilen grupta arttığı; bu testislerin histolojik incelemesinde ovotestis oluşumunun tespit edildiği ve tubulus duvarında germ hücre sayısı ile Sertoli hücre sayılarında da önemli azalmalar meydana geldiği bildirilmektedir. Yine yüksek doz BPA uygulanan gruptaki hayvanların testis dokusu kesitlerinde sadece Sertoli hücresi içeren seminifer tubullere rastlandığı da çalışmanın önemli bulguları arasında değerlendirilmektedir.

Hanafy ve ark (2016)' nın 3 haftalık erkek bıldırcınlara 1, 5 ve 10 mg/kg dozunda BPA' yı birer hafta arayla 3 kez periton içi enjekte ettikleri çalışmalarında seksüel libidonun kontrol grubu hayvanlarına nazaran azaldığı bildirilirken; semen hacmi ve kloakal bez alanının da belirgin bir biçimde düştüğü ortaya konulmuştur. Aynı çalışmada BPA' nın plazma testosteron seviyesini de önemli oranda düşürdüğü ve buna bağlı olarak ciddi gelişme geriliği gözlenen seminifer tubullerde spermatogenezisin aksadığı üzerinde durulmuştur.

Furuya ve ark (2002) ise 2 haftalık Leghorn ırkı erkek piliçlere 14 hafta boyunca oral yolla verdikleri 200 mg BPA' nın ibik ve testis gelişimini belirgin bir biçimde baskıladığını tespit etmişlerdir. Araştırıcılar testisler üzerinde yaptıkları histolojik incelemeler sonucunda seminifer tubullerin BPA uygulanan hayvanlarda

daha küçük olduğunu, yetersiz spermatogenezin bir göstergesi olarak da tubul lümeninde olgun spermatozoonlara rastlanmadığını ileri sürmüşlerdir.

Kanatlı embriyoları, bazı ilaç ve çeşitli kimyasal maddelerin yanı sıra günlük yaşamda maruz kalınan kimi endokrin bozucuların da embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin belirlenmesi için yapılan testlerde en çok tercih edilen materyallerden birisidir (Stoloff ve ark 1972, Berg ve ark 1999). Kanatlılarda seksüel farklılaşma östrojen hormonuna bağlı olduğu için östrojenik maddelerin etkilerinin belirlenmesinde döllü kanatlı yumurtaları özellikle tercih edilmektedir (Berg, 2000). Jelinek (1977) döllü tavuk yumurtalarının kullanıldığı ve Tavuk Embriyotoksisitesi Belirleme Testi (Chicken Embryotoxicity Screening Test-CHEST) olarak isimlendirilen bir yöntem geliştirmiş ve bu yöntem birçok kimyasal maddenin embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin test edildiği çalışmalarda kullanılmıştır. Embriyolu tavuk yumurtası kullanılarak gerçekleştirilen bu tekniğin sonuçlarının memelilere de uyarlanabildiği bildirilmektedir. CHEST yöntemi kullanılarak belirlenen toksik dozun sulandırma oranının $10^{-2}$ ile çarpılmasıyla elde edilen değerin, memelilerde annenin canlı ağırlığının kg' mı başına alması gereken toksik doz olduğu ileri sürülmektedir (Jelinek 1977). Teknik kolay olmasının yanı sıra, hem ucuz hem de basit laboratuar koşullarında bile gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca kısa sürede sonuç vermesi tekniğin tekrarlanabilirliğini kolaylaştırmakta ve bu sayede elde edilen sonuçların güvenilirliği de artmaktadır. Bu tekniğin en önemli avantajlarından birisi de memelilerdeki toksikolojik çalışmalarda kullanılacak olan deney hayvanı sayısı ile deneme sayısını azaltmasıdır. Bu sayede canlı bir organizmaya verilebilecek ağrı ve acı da en aza indirgenmekte, etik kurallar ve yasal kısıtlamalar ile Hayvan Haklarını Koruma Kanunu da ihlal edilmemiş olmaktadır (Jelinek ve ark 1985, Kemper ve Luepke 1986, Veselý ve Vesela 1991).

Tavuk Embriyotoksisite Belirleme Testinin teknik anlamda geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda hem maddenin yumurtaya veriliş yolunun hem de embriyo yaşının optimize edilmesi üzerinde durulmuştur. Kucera ve Burnand (1987) kanatlı embriyosunun, insan embriyosunun dış etkenlere karşı en duyarlı olduğu 2-5. haftaları arasına karşılık gelen ilk 3 günlük döneminin toksisite çalışmaları için uygun bir dönem olacağını bildirirlerken, Jelinek ve ark (1985) ile Prelusky ve ark (1987) ise test edilen maddenin karaciğerde metabolize edilmesi sonucu oluşacak

metabolitlerinin etkilerinin de belirlenmesinin amaçlandığı durumlarda daha geç dönemlerdeki embriyoların tercih edilmesi gerektiğine dikkati çekmektedirler.

Döllü kanatlı yumurtalarının kullanıldığı embriyotoksisite çalışmalarında, test edilecek etken maddelerin yumurtaya veriliş yolları üzerinde farklı görüşler ileri sürülmektedir. Prelusky ve ark (1987) oldukça toksik bir mikotoksin olan aflatoksin $B_1$ ($AFB_1$)' i hava kamarasına, 45º' lik açı ile albümine, ekvator bölgesinden albümine ve yumurta sarısına olmak üzere 4 farklı bölgeden yumurtaya enjekte etmişler ve söz konusu toksinin embriyotoksik etkisinin enjeksiyon bölgesinden etkilenmediğini bildirmişlerdir. Verrett ve ark (1964) ise yumurta sarısına yapılan enjeksiyonun, hava kamarasına yapılana nazaran daha az toksik etkiye sahip olduğunu ileri sürmektedirler. Uygulama kolaylığı açısından değerlendirildiğinde bir çok çalışmada hava kamarasına enjeksiyon yönteminin tercih edildiği dikkati çekse de (Stoloff ve ark 1972, Kemper ve Luepke 1986, Sur ve Celik 2003), Drake ve ark (2006)' nın *in vitro* embriyo kültürü, yumurta kabuğunda pencere açma yöntemi ve yumurta sarısına enjeksiyon yöntemini karşılaştırdıkları çalışmalarında embriyoya verilen hasarın en aza indirgendiği ve test edilecek etken maddenin en homojen dağılımının gerçekleştiği yöntemin yumurta sarısına enjeksiyon yöntemi olduğu ortaya konmuştur. Tüm bu bilgilere karşın etken maddenin veriliş yolu belirlenirken, çalışmanın amacı ile söz konusu etken madde ve taşıyıcı olarak kullanılan maddelerin kimyasal yapılarının da göz önünde bulundurulması gerektiği düşünülmektedir. Yumurta sarısının kanatlılar tarafından alınan lipofilik maddelerin atılım yolu olduğu bilinmektedir (Berg ve ark 1999). Bunun yanı sıra etanol gibi hidrofilik teratojenler ile bazı hidrofobik teratojenlerin de dağılımı ve etkilerinin test edilmesinde en uygun yöntemin yumurta sarısına enjeksiyon yöntemi olduğu bildirilmektedir (Drake ve ark 2006). Bu çalışmada test edilen BPA ve BPA' nın çözdürülmesi aşamasında kullanılan maddeler gibi lipofilik ve hidrofilik maddelerin bir arada kullanıldığı yöntemlerde söz konusu maddelerin en homojen dağılım gösterebilecekleri ve en etkin bir biçimde emilebildikleri yerin yumurta sarısı olduğu ileri sürülmektedir (Berg ve ark 1999). Bunun yanı sıra dişi kanatlılarda intravenöz veya oral yolla alınan BPA' nın esas olarak safra yoluyla atılsa da yapılan radyoaktif karbon ile işaretleme çalışmalarında ovidukt ve ovaryumlarda yer alan yumurta sarısı içerisinde de BPA' nın tespit edildiği bildirilmektedir (Halldin ve ark 2001). Ayrıca yumurtaya enjeksiyon yöntemi ile yapılan çalışmalardan elde edilecek sonuçların

memelilere de uyarlanabildiği noktasından hareketle; memelilerde anneden plasenta yoluyla yavruya geçen maddelerin yavru üzerindeki etkilerinin kanatlı yumurtasına enjeksiyon yöntemi kullanılarak test edildiği çalışmalarda en ideal modelleme yönteminin yumurta sarısına enjeksiyon olduğu açıktır. Zira yumurta sarısı bir dereceye kadar memelilerdeki plasentanın gördüğü fonksiyonu yerine getirmekte, içerdiği anne kaynaklı besin maddeleri ile yavrunun besin kaynağı olarak işlev görmektedir (Bauer ve ark 2013). Hatta kuluçkadan çıkmadan kısa bir süre önce yavrunun karın boşluğu içerisine alınan yumurta sarısı, kuluçka sonrası birkaç gün yavrunun besin ihtiyacını karşılamaktadır (Bhanja ve ark 2009). O nedenle memelilerde plasenta yoluyla gebelik/hamilelik gibi uzun bir süre boyunca anneden yavruya geçen maddelerin döllü tavuk yumurtası kullanılarak test edileceği çalışmalarda yumurta sarısına enjeksiyon yönteminin tercih edilmesinin uygun olduğu düşünülmektedir.

Yumurtaya enjeksiyon yönteminin kullanıldığı çalışmalarda etken maddenin çözdürülmesinde kullanılan taşıyıcı maddenin içeriği, hacmi, doz grupları ve her doz için kullanılacak yumurta sayısı oldukça önemlidir. BPA' nın yağda ve suda zor çözünen bir madde olduğu bilindiği için önce alkolde çözdürülmesi ve ardından fıstık yağı ve lesitin ilavesi ile ideal emülsiyonun hazırlanabileceği bildirilmektedir. Burada kullanılan fıstık yağı ve lesitin karışımının yağ içeriğinin yumurta sarısına benzemesi nedeniyle yumurta sarısı içerisinde homojen dağılımın sağlanmasında etkili olduğu, ayrıca bu emülsiyonun da embriyo tarafından kolaylıkla alınabildiği ifade edilmektedir (Berg 2000).

Yumurtaya enjekte edilen emülsiyon hacmi BPA' nın kullanılacak dozunun çözdürülebilmesi için ihtiyaç duyulan madde miktarı ve kullanılan kanatlı türü de dikkate alındığında 20-100 µl arasında olduğu görülmektedir (Berg 2000, El Gawish ve ark 2013, Yiğit ve ark 2013). Bıldırcın yumurtalarının kullanıldığı çalışmalarda 20 µl tercih edilirken (Berg 2000, Berg ve ark 2001, El Gawish ve ark 2013) tavuk yumurtalarının kullanıldığı çalışmalarda (Berg 2000, Berg ve ark 2001, Yiğit ve ark 2013) 100 µl tercih edilmiştir. Bu çalışmada da 100 µl emülsiyon hacmi tercih edilmiştir.

Söz konusu maddenin olası etkilerinin belirlenebilmesi için yapılan çalışmalarda farklı dozların kullanılması gerektiği bildirilmektedir. Verrett ve ark

(1964) her solüsyon için en az 2 farklı doz önerirlerken, Brown ve ark (1986) en az 3 farklı dozun denenmesi gerektiğini ileri sürmektedirler. Jelinek (1977) ise etkili dozun tespit edilebilmesi için etkisiz olduğu bilinen en yüksek doz ile etkili olduğu düşünülen en düşük doz arasındaki dozların tercih edilmesi gerektiğini bildirmektedir. Yumurta başına 2 mg BPA' nın verildiği çalışmalar olmasına karşın 1g yumurta başına 67 ile 134 µg dozların tercih edildiği çalışmalar da dikkati çekmektedir (El Gawish ve ark 2013). Yapılan bu çalışmada 50, 100 ve 250 µg/yumurta dozları tercih edilerek BPA' nın düşük, orta ve yüksek olarak kabul edilebilecek doz aralıklarındaki etkisi araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçların istatistiksel açıdan daha güvenilir olabilmesi açısından her doz grubu için kullanılan yumurta sayısı da oldukça önemlidir. Embriyotoksisite çalışmalarında her grupta en az 20 yumurta kullanılmasını öneren araştırıcıların (Verrett ve ark 1964, Kemper ve Luepke 1986) yanı sıra; BPA' nın östrojenik etkisinin test edildiği çalışmalarda 20-50 arasında yumurta kullanıldığı görülmektedir (Berg 2000, El Gawish ve ark 2013, Yiğit ve ark 2013). Bu çalışmada da test edilen doza bağlı olarak artan sayılarda olmak üzere her bir grup için 45-85 adet yumurta kullanılmıştır.

Kanatlılarda gonadların embriyonik gelişimi genital kabartı oluşumu, gonadal farklılaşma ve gonadal fonksiyon gelişimi olmak üzere 3 fazda incelenmektedir (Intarapat ve Satayalai 2014). İnkübasyonun ilk günlerinde henüz farklılaşmayan gonadlarda histolojik olarak dışta kalınlaşmış sölom epitelinden köken alan kortikal tabaka ile bunun çevrelediği medula bölgesi dikkati çeker. Primordiyal germ hücrelerinin kortekste yoğunlaştığı gözlenirken çoğalan sölom epitelinden köken alan ve az sayıda hücreden oluşan hücre kordonlarının gevşek mezenşimal dokudan oluşan medula bölgesinde belirdiği bildirilmektedir. Yaklaşık olarak kuluçkanın 6,5. gününde morfolojik farklılaşmayla birlikte erkek embriyoların gonadlarının medula bölgesinde ileride seminifer tubülleri oluşturacak olan hücre kordonları kalınlaşır ve kordonlar arasındaki mezenşimal dokuda ileride Leydig hücrelerini oluşturacak olan hücreler dikkati çeker. Dişi embriyoların gonadlarında ise somatik ve germ hücrelerindeki artışla birlikte korteks kalınlaşırken medulladaki kordonları oluşturan hücrelerde vakuoller meydana gelir ve lakunlar oluşur. İlerleyen dönemlerde erkeklerde her iki gonad birlikte gelişimlerine devam ederken dişilerde ise sağ gonad

geriler ve sadece sol gonad aktif bir ovaryum olma yönünde gelişimine devam eder (Smith ve Sinclair 2004, Chang ve ark 2012, Lambeth ve ark 2014).

Kanatlı embriyoları üzerinde östrojenik etkili endokrin bozucuların test edildiği pek çok çalışmada (Berg ve ark 2001, Halldin ve ark 2001, Mattsson ve ark 2008) olduğu gibi bu çalışmada da sol testis dokusu kullanılmıştır. Daha öncede bahsedildiği gibi dişi kanatlılarda sol gonad fonksiyonel ovaryum dokusu olarak gelişirken sağ gonad geriler. Dişi kanatlılarda belirgin bir biçimde kendini gösteren bu gonadal asimetri erkek kanatlılarda ise sol testisin daha büyük olması şeklinde kendini gösterir (Birkhead ve ark 1998, Vatsalya ve Arora 2012, Elbajory ve ark 2013). Söz konusu bu asimetrinin nedeninin, embriyonik sürecin erken aşamalarında sağ ve sol gonadlarda farklı derecelerde eksprese edilen östrojen reseptörleri olduğu ileri sürülmektedir. Nakabayashi ve ark (1998)' nın tavuk embriyolarında yaptıkları çalışmada östrojen reseptörlerini kodlayan genlerin erken dönemde her iki cinsiyette de sadece sol gonadların korteks bölgelerindeki epitelde eksprese edilirken sağ gonadlarda eksprese edilmediği; erkek embriyoların sol gonadlarındaki ekspresyonun da geçici olup bir süre sonra ortadan kalktığı gösterilmiştir. Intarapat ve Satayalai (2014)' da bıldırcın embriyolarında yaptıkları çalışmalarında inkübasyonun 8. gününde erkek embriyoların sol testislerinin korteks bölgesindeki germinal epitelde östrojen reseptörü immünoreaktivitesini tespit ederlerken medulla bölgesindeki hücrelerde immünoreaktiviteye rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Sonuç olarak kanatlılarda sol gonadların östrojenik etkili maddelere daha duyarlı olması ve daha öncede bahsedildiği gibi kanatlılarda seksüel farklılaşmanın östrojen hormonuna bağlı olması, kanatlılarda sol gonadların östrojenik etkili maddelerin test edilmesinde tercih nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır.

Yapılan bu çalışmada 100 µl hacminde taşıyıcı emülsiyon içerisinde 50, 100 ve 250 µg/yumurta dozunda çözdürülen BPA, döllü tavuk yumurtasına inkübasyonun hemen başında yumurta sarısına enjeksiyon yolu ile verilmiştir. İnkübasyonun 13. ve 18. günlerinde erkek embriyoların sol testis dokuları üzerinde histolojik incelemeler yapılırken; kuluçkadan çıkışın ilk gününde erkek civcivlerin yine sol testis dokuları üzerinde ise histolojik, histometrik ve enzim histokimyasal değerlendirmeler yapılmıştır. İnkübasyonun 13. ve 18. günlerindeki embriyoların testis dokularında yapılan histolojik incelemelerde kontrol ve taşıyıcı gruplarına ait embriyoların testis

dokularına nazaran BPA verilen grupların testis dokularında belirgin bir gelişme geriliği dikkati çekmiştir. İleride seminifer tubülleri oluşturacak olan hücre kordonlarının hem sayıca daha az olduğu, hem de hücresel organizasyonun zayıf olması BPA' nın testis dokularının gelişimi üzerindeki olumsuz etkisini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde kuluçkadan çıkışın ilk günü yapılan histolojik incelemelerde de BPA gruplarındaki civcivlere ait testis dokularında seminifer kordon gelişiminin ve kordonlardaki hücresel organizasyonun kontrol gruplarına göre daha zayıf olduğu, tubullerin birçoğunda spermatogenetik hücrelerin bulunmadığı gözlenmiştir. Bununla birlikte kuluçkadan çıkışın ilk günü korteks kalınlığı ve testis yüzey alanı üzerinde yapılan histometrik ölçümler, özellikle düşük (50 µg/yumurta) ve orta (100 µg/yumurta) doz BPA' nın testis dokusu üzerindeki östrojenik etkisini bariz bir şekilde ortaya koymaktadır (Çizelge 3.1).

Bu çalışmada kuluçkadan çıkışın ilk günü yapılan histometrik ölçümler sonucunda yukarıda bahsedilen histolojik bulguları destekler nitelikte seminifer tubül çapı değerlerinin tüm BPA gruplarında kontrol gruplarına nazaran belirgin bir biçimde düştüğü görülmektedir (Çizelge 3.1). Buna karşın korteks kalınlığı değerlerinin yine tüm BPA gruplarında arttığı; bu artışın düşük (50 µg/yumurta) ve orta (100 µg/yumurta) doz BPA gruplarında daha belirgin olduğu dikkati çekmektedir (Çizelge 3.1). Yüksek doz (250 µg/yumurta) BPA grubunda ise korteks kalınlığı kontrol gruplarından bir miktar yüksek olsa da düşük (50 µg/yumurta) ve orta (100 µg/yumurta) doz BPA gruplarındaki değerlerden düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Testis yüzey alanı değerleri incelendiğinde de diğer gruplara göre düşük (50 µg/yumurta) ve orta (100 µg/yumurta) doz BPA gruplarında belirgin bir artış göze çarparken kontrol grupları ile yüksek (250 µg/yumurta) doz BPA grubu arasında istatistiksel açıdan herhangi bir fark bulunamamıştır. Buna karşın yüksek (250 µg/yumurta) doz BPA grubuna ait testis yüzey alanı değerinin rakamsal olarak kontrol gruplarından daha düşük olması dikkat çekici bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. Zira korteks kalınlığı değerlerinde düşük (50 µg/yumurta) ve orta (100 µg/yumurta) doz BPA gruplarına nazaran yüksek (250 µg/yumurta) doz BPA grubunda ortaya çıkan belirgin düşüşle birlikte testis yüzey alanında tespit edilen bu düşüş yüksek (250 µg/yumurta) doz BPA' nın toksik etkisini düşündürmektedir. İlk bakışta çelişkili bir durum gibi algılansa da yapılan çalışmalar BPA' nın bifazik etkili bir endokrin bozucu olduğunu ortaya koymuştur (Wetherill ve ark 2002, 2002,

Miyawaki ve ark 2007, Ge ve ark 2014). Kanserden obesiteye ve diyabetten infertiliteye kadar birçok olumsuz etkisi bilinen BPA' nın bu çoklu etkisinin altında yatan mekanizmaların östrojen reseptörlerine bağlanarak diğer nükleer ve non-nükleer reseptörleri engellemesi, hormon sentezi ya da metabolizmalarını değiştirmesi ve epigenetik düzenlemeleri bozması olduğu düşünülmektedir. Bu mekanizmalar BPA' nın toksikolojik anlamda bilinen farmasötik etkilerini ortaya çıkaran doz aralığının daha altındaki BPA konsantrasyonlarında karşımıza çıkmaktadır. Bu durum "U" ya da "Ω" şeklinde ifade edilen "non-monotonik doz eğrisi" ya da "çizgisel olmayan doz eğrisi" ni ortaya çıkarmaktadır (Acconcia ve ark 2015). Wetherill ve ark (2002)' nın yaptıkları bir çalışmada 1 nmol/L BPA' nın prostat tümör hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin 100 nmol/L BPA' dan daha fazla olduğu ortaya konulmuştur. Benzer şekilde Miyawaki ve ark (2007) 150 ng/g vücut ağırlığına karşılık gelen 1 µg/mL içme suyundaki BPA' nın dişi farelerde yağ dokusu artışına sebep olurken 1,5 µg/g vücut ağırlığına karşılık gelen 10 µg/mL içme suyundaki BPA' nın aynı farelerde etkisiz olduğu bildirilmektedir. Ge ve ark (2014) ise mikromolar düzeyde BPA' nın oksidatif stresi artırarak Sertoli hücre çoğalmasını baskıladığını, buna karşın nanomolar düzeydeki BPA' nın ise enerji metabolizmasını artırarak Sertoli hücre çoğalmasını uyardığını tespit etmişlerdir. BPA' nın güvenli doz aralığının belirlenmesini de oldukça güçleştiren bu paradoksal durum, hormonlar ve onlara benzeyen endokrin bozucuların etki mekanizmaları da dikkate alınırsa bir ölçüde açığa kavuşmaktadır. Bilindiği gibi hormonlar reseptörlerine olan yüksek affinitelerinden dolayı çok düşük dozlarda bile etkili olabilen kimyasal maddelerdir. Hormon konsantrasyonu ve bağlandığı reseptör sayısı ile bağlanılan reseptör sayısı ve ortaya çıkan güçlü biyolojik etkilerin nedeni de hormonlar ve reseptörleri arasındaki bu ilişkidir. Endokrin bozucular da aynı hormon reseptörleri ile ilişkiye girdiklerinden aynı mekanizmaların burada da etkili olduğu ileri sürülmektedir. Ayrıca hormonlar ve endokrin bozuculara maruz kalınan biyolojik süreçler de önemlidir. Söz konusu maddelere bazı kritik dönemlerde maruz kalınması durumunda geri dönüşü olmayan sonuçlar karşımıza çıkmaktadır. Özellikle gelişimin erken dönemlerinde maruz kalınan endokrin bozucular ve özellikle de BPA' nın hücresel farklılaşma ve organogenezis üzerindeki etkilerinin son derece ciddi sorunlara neden olduğu bildirilmektedir (Vandenberg ve ark 2013).

Bu çalışmada kuluçkadan çıkışın ilk gününde sol testis dokularından alınan kriyostat kesitleri üzerinde gerçekleştirilen enzim histokimyasal demonstrasyonlar, gerek alfa naftil asetat esteraz (ANAE) ve gerek asit fosfataz (ACP-az) enzimlerinin seminifer tubullerin duvarını oluşturan hücreler için spesifik olmadığını ortaya koymuştur. ANAE enzimi demonstrasyonları yapılan kesitlerde özellikle lümeni dolduran ve lümenin oluşumu sürecinde ortaya çıktıkları düşünülen hücresel artıkların çok yoğun, spesifik olmayan ve sodyum floride (NaF) duyarlı pozitivite gösterdikleri; bunun yanı sıra Sertoli hücreleri ve spermatogonyumların ise çok zayıf, hücresel lokalizasyon açısından non-spesifik ve yine NaF duyarlı pozitiviteye sahip oldukları dikkati çekti. ACP-az enzimi demonstrasyonu yapılan kesitlerde ise yine non-spesifik ve oldukça zayıf pozitivitenin varlığı tespit edildi. Gruplar arasında dikkati çeken herhangi bir boyanma farklılığı gözlenmezken, söz konusu enzimlerin gelişmekte olan testis dokusundaki yerleşim ve fonksiyonları üzerinde daha detaylı incelemelerin yapılması gerektiği sonucuna varıldı.

Kuluçkadan çıkışın ilk gününde sol testis dokularından alınan kriyostat kesitleri üzerinde yapılan Pappenheim' ın panoptik boyamasında ise seminifer tubüller arasındaki bağ dokuda eozinofilik hücre odakları ile özellikle kan damarlarının yakınında çok sayıda mast hücrelerinin varlığı dikkati çekti. Kanatlı testislerindeki mast hücreleri üzerinde yapılan az sayıda çalışma mevcut olup, bu çalışmalarda da mast hücrelerinin daha çok intersitisyumda kan damarları etrafında yerleştikleri bildirilmektedir (Razi ve ark 2010, Kadhem 2014). İnsan testislerinde yer alan mast hücreleri ile ilgili yapılan çalışmalar ise daha çok erkeklerde karşılaşılan infertilite olguları ile ilişkilendirilmektedir. Nagai ve ark (1992) genel olarak toplam mast hücre sayısının özel olarak da kondroitin sülfat içeren mast hücre sayılarının erkeklerde ortaya çıkan idiyopatik infertilite olgularında arttığı ve bu durumun hastalığın etiyolojisinde değerlendirilmesi gereken önemli bir kriter olduğunu ileri sürerlerken, Yamanaka ve ark (2000) ise testis dokusunda artan triptaz ve şimaz pozitif mast hücre sayılarının spermatogenezde yaşanan bazı problemler ve testiküler fibröz olgularına eşlik ettiğini bildirmektedirler. Haidl ve ark (2011)' da testis dokusunda seminifer tubüllerle yakın temas halindeki mast hücre sayılarındaki artışın kan-testis bariyerinin bütünlüğünü tehdit eden bir durum olduğunu iddia etmektedirler. Bu çalışmalardan anlaşıldığı gibi testis dokusundaki mast hücre sayıları fertilite problemlerinin etiyolojisinde oldukça önemli bir kriter olarak

karşımıza çıkmaktadır. Bundan sonra testis dokusu üzerinde yapılacak olan çalışmalarda mast hücre populasyonları ve mast hücre heterojenitesinin de değerlendirilerek ileride yapılması planlanan ve klinik önemi olan çalışmalara referans değerler elde edilmesinin önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak döllü tavuk yumurtasına inkübasyondan hemen önce verilen BPA' nın erkek embriyolarda sol testis dokusunda genel olarak seminifer tubüllerde gelişme geriliğine neden olduğu; düşük (50 µg/yumurta) ve orta (100 µg/yumurta) dozda verilen BPA' nın ise ovo-testis oluşumu ile de açıklanan ve kortekste oosit benzeri hücre artışına paralel olarak meydana gelen kalınlaşmaya ve morfolojik olarak ovaryum benzeri gelişme ile açıklanabilecek testis yüzey alanlarında artışlara neden olduğu tespit edilmiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsanların yaşamlarını kolaylaştırmak için teknolojinin günden güne gelişmesi ile birlikte çevreye ve canlılara zarar veren kimyasal maddelerin üretimi ve kullanımı da oldukça artmıştır. Bu kimyasalların başında endokrin sisteme zarar veren endokrin bozucular gelmektedir. Östrojenik etkisi ile ön plana çıkan Bisfenol A (BPA) günlük hayatımızda en sık karşılaştığımız ve dünya genelinde üretimi en yüksek olan endokrin bozucu kimyasallardan bir tanesidir. İçtiğimiz suda, soluduğumuz havada, yediğimiz çoğu ürünlerde ve ambalajlarında BPA' nın bulunması canlıların söz konusu maddeye sürekli maruz kalmalarına neden olmaktadır. Özellikle prenatal ve postnatal dönemde bu maddeye maruz kalan canlılarda başta üreme sistemi olmak üzere etkilenen tüm sistemlerde fonksiyonel veya morfolojik bozukluklar ortaya çıkabilmektedir.

Avrupa Gıda Komisyonu Bilimsel Komitesi BPA' nın günlük tolere edilebilir miktarının 10 µg/kg/gün olarak belirlemiştir. Sunulan bu çalışmada elde edilen bulgular ve yapılan diğer çalışmalar değerlendirildiğinde BPA' nın çok düşük dozlarda da ciddi sorunlara yol açtığı dikkati çekmektedir. Bu durum söz konusu kimyasal maddenin güvenilir doz aralıklarının belirlenmesini de güçleştirmektedir. İnsan sağlığı açısından kanserden obeziteye ve diyabetten üreme sorunlarına kadar pek çok olumsuz etkisi göz önüne alındığında bu maddenin kullanımı ile ilgili yasal düzenlemelerin de yeniden gözden geçirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

# 6. KAYNAKLAR


Acconcia F, Pallottini V, Marino M, 2015. Molecular mechanisms of action of BPA. Dose-Response: An International Journal, 13, 4, 1-9.

Aire TA, 1997. The structure of the interstitial tissue of the active and resting avian testis. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 64, 291-9.

Aire TA, Ozegbe P, 2007. The testicular capsule and peritubular tissue of birds: morphometry, histology, ultrastructure and immunohistochemistry. J. Anat, 210, 6, 731-40.

Al-Tememy H, 2010. Histological study of testis in quail (Coturnix coturnix japonica). Al-Anbar Journal Veterinary Sciences, 3, 2, 36-44.

Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A, 2006. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic β-cell function in vivo and induces insulin resistance. Environmental Health Perspectives, 114, 1, 106-12.

Arakawa C, Fujimaki K, Yoshinaga J, Imai H, Serizawa S, Shiraishi H, 2004. Daily urinary excretion of bisphenol A. Environmental Health and Preventive Medicine, 9, 1, 22-6.

Arenas MI, Bethencourt FR, Fraile B, Paniagua R, 1997. Immunocytochemical and quantitative study of the tunica albuginea testis in young and ageing men. Histochem Cell Biol, 107, 6, 469-77.

Balthazart J, De Clerck A, Foidart A, 1992. Behavioral demasculinization of female quail is induced by estrogens: studies with the new aromatase inhibitor, R76713. Hormones and Behavior, 26, 2, 179-203.

Banks FC, Knight GE, Calvert RC, Turmaine M, Thompson CS, Mikhailidis DP, Morgan RJ, Burnstock G, 2006. Smooth muscle and purinergic contraction of the human, rabbit, rat, and mouse testicular capsule. Biology of Reproduction, 74, 3, 473-80.

Bauer R, Plieschnig JA, Finkes T, Riegler B, Hermann M, Schneider WJ, 2013. The developing chicken yolk sac acquires nutrient transport competence by an orchestrated differentiation process of its endodermal epithelial cells. Journal of Biological Chemistry, 288, 2, 1088-98.

Berg C, 2000. Environmental pollutants and the reproductive system in birds, PHD Thesis, Acta Universitatis Upsaliensis Faculty of Science and Technology, Uppsala.

Berg C, Blomqvist A, Holm L, Brandt I, Brunström B, Ridderstråle Y, 2004. Embryonic exposure to oestrogen causes eggshell thinning and altered shell gland carbonic anhydrase expression in the domestic hen. Reproduction, 128, 4, 455-61.

Berg C, Halldin K, Brunström B, 2001. Effects of bisphenol A and tetrabromobisphenol A on sex organ development in quail and chicken embryos. Environmental Toxicology and Chemistry, 20, 12, 2836-40.

Berg C, Halldin K, Fridolfsson AK, Brandt I, Brunström B, 1999. The avian egg as a test system for endocrine disrupters: effects of diethylstilbestrol and ethynylestradiol on sex organ develop. Science of the Total Environment, 233, 1, 57-66.

Bhanja S, Anjali Devi C, Panda A, Shyam Sunder G, 2009. Effect of post hatch feed deprivation on yolk-sac utilization and performance of young broiler chickens. Journal of Animal Science, 22, 8, 1174-9.

Birkhead T, Fletcher F, Pellatt E, 1998. Testes asymmetry, condition and sexual selection in birds: an experimental test. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 265, 1402, 1185-9.

Brown LP, Flint OP, Orton TC, Gibson GG, 1986. Chemical teratogenesis: testing methods and the role of metabolism. Drug Metabolism Reviews, 17, 3, 221-60.

Brunström B, Axelsson J, Mattsson A, Halldin K, 2009. Effects of estrogens on sex differentiation in Japanese quail and chicken. General and Comparative Endocrinology, 163, 1, 97-103.

Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL, 2005. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. Environmental Health Perspectives, 113, 4, 391-5.

Carson R, 1962. Silent spring, Boston, Houghton Mifflin Harcourt.

Chang G, Chen R, Qin Y, Zhang Y, Dai A, Chen G, 2012. The development of primordial germ cells (PGCs) and testis in the quail embryo. Pakistan Veterinary Journal, 32, 1, 88-92.

Cook H, 1990. Carbonhydrates. In: The theory and practice of histological techniques. Eds: Bancroft JD, Stewens A. Avon: The Both Press, p. 143-53.

Crain DA, Eriksen M, Iguchi T, Jobling S, Laufer H, LeBlanc GA, Guillette LJ, 2007. An ecological assessment of bisphenol-A: evidence from comparative biology. Reproductive Toxicology, 24, 2, 225-39.

Crossmon G, 1937. A modification of Mollory' s connective tissue stain with a discussion of the principles involved. The Anotomical Record, 69, 1, 33-8.

Deviche P, Hurley LL, Fokidis HB, 2011. Avian testicular structure, function, and regulation. Hormones and Reproduction in Vertebrates, 4, 27-69.

Dönmez HH, Eken E, Beşoluk K, Sur E, 2012. The histological characteristics and localisation of ACP and ANAE positive lymphocytes in the oesophageal tonsil of the duck (Anas platyrhynchos). Avian Biology Research, 5, 1, 11-5.

Drake VJ, Koprowski SL, Lough JW, Smith SM, 2006. Gastrulating chick embryo as a model for evaluating teratogenicity: a comparison of three approaches. Clinical and Molecular Teratology, 76, 1, 66-71.

El Gawish R, Ghanem M, Maeda T, 2013. Effects of bisphenol A and DDT on mRNA expression of vitellogenin II in liver of quail embryos. Iranian Journal of Veterinary Research, 14, 3, 237-40.

Elbajory SIA, El Tingari MD, Abdalla PA, 2013. Morphological study of the testis of adult Sudanese duck (Anas platyrhynchos). International Journal of Animal and Veterinary Advances, 5, 3, 103-7.

Erdoğan S, Kılınç M, 2009. Kuşlarda hava keselerinin (sacci pneumatici) morfolojisi ve fonksiyonel özellikleri. Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2, 3, 51-6.

Erdost H, 2011. Dişi genital sistem. In: Veteriner Özel Histoloji. Eds: Özer A. Ankara: Nobel, s. 219-49.

Ergün L, 2011. Veteriner özel histoloji. In: Erkek genital sistem. Eds: Özer A. Ankara: Nobel, s. 251-68.

Esener OBB, 2007. Çevresel östrojenlerin erkek kanatlı hayvanların genital organlari üzerine etkisi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Flint S, Markle T, Thompson S, Wallace E, 2012. Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. Journal of Environmental Management, 104, 19-34.

Frey R, Goymann W, 2009. A single functional testis and long deferent duct papillae: the peculiar male reproductive tract of the classically polyandrous, sex-role reversed Black Coucal (Centropus grillii). Journal of Ornithology, 150, 4, 827-38.

Furuya M, Sasaki F, Hassanin AM, Kuwahara S, Tsukamoto Y, 2002. Effects of bisphenol-A on the growth of comb and testes of male chicken. Canadian Journal of Veterinary Research, 67, 1, 68.

Ge LC, Chen ZJ, Liu H, Zhang KS, Su Q, Ma XY, Huang HB, Zhao ZD, Wang YY, Giesy JP, 2014. Signaling related with biphasic effects of bisphenol A (BPA) on Sertoli cell proliferation: a comparative proteomic analysis. Biochimica et Biophysica Acta 1840, 9, 2663-73.

Goldman JM, Laws SC, Balchak SK, Cooper RL, Kavlock RJ, 2000. Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat. A focus on the EDSTAC recommendations. Critical Reviews in Toxicology, 30, 2, 135-96.

Gustafsson JA, 1999. Estrogen receptor β-a new dimension in estrogen mechanism of action. Journal of Endocrinology, 163, 3, 379-83.

Haidl G, Duan YG, Chen SJ, Kohn F-M, Schuppe HC, Allam JP, 2011. The role of mast cells in male infertility. Expert Review of Clinical İmmunology, 7, 5, 627-34.

Halldin K, 2005. Impact of endocrine disrupting chemicals on reproduction in Japanese quail. Domestic Animal Endocrinology, 29, 2, 420-9.

Halldin K, Axelsson J, Brunström B, 2005. Effects of endocrine modulators on sexual differentiation and reproductive function in male Japanese quail. Brain Research Bulletin, 65, 3, 211-8.

Halldin K, Berg C, Bergman A, Brandt I, Brunström B, 2001. Distribution of bisphenol A and tetrabromobisphenol A in quail eggs, embryos and laying birds and studies on reproduction variables in adults following in ovo exposure. Archives of Toxicology, 75, 10, 597-603.

Hanafy A, Khalil H, Abdel-Rahim W, Abdel-Ghany A, 2016. Testicular functions and sexual behavior in male Japanese Quail after exposure to bisphenol A. Asian Journal of Poultry Science, 10, 1, 40-51.

Heindel JJ, 2007. Role of exposure to environmental chemicals in the developmental basis of disease and dysfunction. Reproductive Toxicology, 23, 3, 257-9.

Hess-Wilson J, Knudsen K, 2006. Endocrine disrupting compounds and prostate cancer. Cancer Letters, 241, 1, 1-12.

Hodges RD, 1974. The histology of the fowl, London, Academic Press, p. 300-325.

Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y, 2002. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. Human Reproduction, 17, 11, 2839-41.

Intarapat S, Satayalai O, 2014. Microanatomical study of embryonic gonadal development in Japanese Quail (Coturnix japonica). Anatomy Research İnternational, 2014, 1-9.

Jelinek R, 1977. Methods in prenatal toxicology. In: The chick embryotoxicity screening test (CHEST). Eds: Neubert D, Merker H, Kwasigrooh T. Stutgort: Georg Thieme, p. 381-6.

Jelinek R, Peterka M, Rychter Z, 1985. Chick embryotoxicity screening test-130 substances tested. Indian Journal of Experimental Biology, 23, 10, 588-95.

Kabir ER, Rahman MS, Rahman I, 2015. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. Environmental Toxicology and Pharmacology, 40, 1, 241-58.

Kadhem A, 2014. The cycle event of spermatogenesis and spermiogenesis in the testes of indigeneous duck (Anas Platyrhynhos). Bas J. Vet. Res, 1, 2, 16-22.

Kahvecioğlu O, Çalışlar T, 2002. Ürogenital ve endokrin sistemi. In: Evcil kuşların anatomisi. Eds: Dursun N. Ankara: Medisan, s. 103-28.

Kemper F, Luepke N, 1986. Toxicity testing by the hen's egg test (HET). Food and Chemical Toxicology, 24, 6-7, 647-8.

Kirby J, Froman D, 2000. Reproduction in male birds. In: Sturkie's avian physiology. Eds: Whittow G. Hawaii: Acedemic Press, p. 597-615.

Kucera P, Burnand MB, 1987. Routine teratogenicity test that uses chick embryos in vitro. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, 7, 5, 427-47.

Kumaran J, Turner CW, 1949. The normal development of the testes in the White Plymouth Rock. Poultry Science, 28, 4, 511-20.

Lambeth LS, Raymond CS, Roeszler KN, Kuroiwa A, Nakata T, Zarkower D, Smith CA, 2014. Over-expression of DMRT1 induces the male pathway in embryonic chicken gonads. Developmental Biology, 389, 2, 160-72.

Lan W, Peng KM, Liu H, Song H, WANG Y, TANG L, 2011. Histological examination of testicular cell development and apoptosis in the ostrich chick. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 35, 1, 7-14.

Lee YJ, Ryu H-Y, Kim H-K, Min CS, Lee JH, Kim E, Nam BH, Park JH, Jung JY, Jang DD, 2008. Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. Reproductive Toxicology, 25, 4, 413-9.

Leydig F, 1850. Ueber die Schleimkanäle der Knochenfische. Mull Arch Anat Physiol, 170-81.

Lintelmann J, Katayama A, Kurihara N, Shore L, Wenzel A, 2003. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry, 75, 5, 631-81.

Markey CM, Rubin BS, Soto AM, Sonnenschein C, 2003. Endocrine disruptors: from wingspread to environmental developmental biology. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 83, 1, 235-44.

Mattsson A, Mura E, Brunström B, Panzica G, Halldin K, 2008. Selective activation of estrogen receptor alpha in Japanese quail embryos affects reproductive organ differentiation but not the male sexual behavior or the parvocellular vasotocin system. General and Comparative Endocrinology, 159, 2, 150-7.

Michałowicz J, 2014. Bisphenol A–sources, toxicity and biotransformation. Environmental Toxicology and Pharmacology, 37, 2, 738-58.

Miyawaki J, Sakayama K, Kato H, Yamamoto H, Masuno H, 2007. Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 14, 5, 245-52.

Nagai T, Takaba H, Miyake K, Hirabayashi Y, Yamada K, 1992. Testicular mast cell heterogeneity in idiopathic male infertility. Fertility and Sterility, 57, 6, 1331-6.

Nakabayashi O, Kikuchi H, Kikuchi T, Mizuno S, 1998. Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos. Journal of Molecular Endocrinology, 20, 2, 193-202.

Nakamura Y, Yamamoto Y, Usui F, Mushika T, Ono T, Setioko A, Takeda K, Nirasawa K, Kagami H, Tagami T, 2007. Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. Poultry Science, 86, 10, 2182-93.

Nam SH, Seo YM, Kim MG, 2010. Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. Chemosphere, 79, 9, 949-52.

Nicholls TJ, Graham GP, 1972. Observations on the ultrastructure and differentiation of Leydig cells in the testis of the Japanese quail (Coturnix coturnix japonica). Biology of Reproduction, 6, 179-92.

Okpe G, Nwatu U, Anya K, 2010. Morphometric study of the testes of the Nigerian local breed of chicken. Animal Research International, 7, 2, 1163-8.

Oshima A, Yamashita R, Nakamura K, Wada M, Shibuya K, 2012. In ovo exposure to nonylphenol and bisphenol A resulted in dose-independent feminization of male gonads in Japanese quail (Coturnix japonica) embryos. Environmental Toxicology and Chemistry, 31, 5, 1091-7.

Prelusky D, Hamilton R, Foster B, Trenholm H, Thompson B, 1987. Optimization of chick embryotoxicity bioassay for testing toxicity potential of fungal metabolites. Journal-Association of Official Analytical Chemists, 70, 6, 1049-55.

Razi M, Hasanzadeh S, Najafi G, Feizi S, Moshtaghi M, Janbaz H, Amin M, 2010. Histological and anatomical study of the White Rooster of testis, epididymis and ductus deferens. Int. J. Vet. Res., 4, 4, 229-36.

Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I, 2002. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. Environmental Health Perspectives, 110, 11, 703-7.

Sertoli E, 1865. Dell'esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi del testicolo umano. Morgagni, 7, 31-40.

Shimada K, 2002. Sex determination and sex differentiation. Avian and Poultry Biology Reviews, 13, 1, 1-14.

Smith CA, Sinclair AH, 2004. Sex determination: insights from the chicken. Bioessays, 26, 2, 120-32.

Stachel B, Ehrhorn U, Heemken O-P, Lepom P, Reincke H, Sawal G, Theobald N, 2003. Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries. Environmental Pollution, 124, 3, 497-507.

Staples CA, Dome PB, Klecka GM, Oblock ST, Harris LR, 1998. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. Chemosphere, 36, 10, 2149-73.

Stoloff L, Verrett MJ, Dantzman J, Reynaldo EF, 1972. Toxicological study of aflatoxin P1 using the fertile chicken egg. Toxicology and Applied Pharmacology, 23, 3, 528-31.

Sun Y, Irie M, Kishikawa N, Wada M, Kuroda N, Nakashima K, 2004. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. Biomedical Chromatography, 18, 8, 501-7.

Sur E, Celik I, 2003. Effects of aflatoxin B1 on the development of the bursa of fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken. British Poultry Science, 44, 4, 558-66.

Swift CH, 1916. Origin of the sex-cords and definitive spermatogonia in the male chick. American Journal of Anatomy, 20, 3, 375-410.

Usman A, Ahmad M, 2016. From BPA to its analogues: Is it a safe journey?. Chemosphere, 158, 131-42.

Van Krey H, 1993. Reproductive biology in relation to breeding and genetics. In: Poultry breeding and genetics. Eds: Cramford R. Amsterdam: Elsevier p. 61-87.

Vandenberg LN, Ehrlich S, Belcher SM, Ben-Jonathan N, Dolinoy DC, Hugo ER, Hunt PA, Newbold RR, Rubin BS, Saili KS, 2013. Low dose effects of bisphenol A: An integrated review of in vitro, laboratory animal, and epidemiology studies. Endocrine Disruptors, 1, 1, e25078-20.

Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV, 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). Reproductive Toxicology, 24, 2, 139-77.

Vatsalya V, Arora KL, 2012. Allometric growth of testes in relation to age, body weight and selected blood parameters in male Japanese quail (Coturnix japonica). International Journal of Poultry Science, 11, 4, 251-8.

Verrett MJ, Marliac J, McLaughlin J, 1964. Use of the chicken embryo in the assay of aflatoxin toxicity. JAOAC, 47, 6, 1003-6.

Veselý D, Vesela D, 1991. The use of chick embryo for prediction of some embryotoxic effects of mycotoxins in mammals. Vet. Med. Praha, 36, 3, 175-81.

Vom Saal FS, Hughes C, 2005. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. Environmental Health Perspectives, 113, 8, 926-33.

Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, Watson CS, Zoeller RT, Belcher SM, 2007. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. Reproductive Toxicology, 24, 2, 178-98.

Wetherill YB, Petre CE, Monk KR, Puga A, Knudsen KE, 2002. The xenoestrogen bisphenol a induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells 1. Molecular Cancer Therapeutics, 1, 7, 515-24.

Yamanaka K, Fujisawa M, Tanaka H, Okada H, Arakawa S, Kamidono S, 2000. Significance of human testicular mast cells and their subtypes in male infertility. Human Reproduction, 15, 7, 1543-7.

Ye X, Kuklenyik Z, Needham LL, Calafat AM, 2005. Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2, 5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction–high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 383, 4, 638-44.

Yiğit F, Aktaş A, Dağlıoğlu S, 2013. Effects of bisphenol a and diethylstilbestrol on the involution of bursa of fabricius in the hens. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 39, 2, 168-74.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

03.01.1990 tarihinde İzmir Konak ilçesinde doğdu. İlköğretim hayatını 1997-2002 yılları arasında Şehit Cesur İlköğretim Okulu, 2002-2005 yılları arasında Şehit Öğretmen Gürhan Yardım İlköğretim Okulu' nda tamamladı. Lise eğitimini ise 2005-2009 yılları arasında IMKB Beşikdüzü Anadolu Öğretmen Lisesi' nde bitirdi.

2009 yılında girdiği Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden 2013 yılında mezun oldu.

2014 yılında Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı' na araştırma görevlisi olarak atandı. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı' nda yüksek lisans eğitimine başladı.